

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



DUYUSAL SİNİR HÜCRELERİNDE
AGOMELATİNİN HÜCRE İÇİ
KALSİYUM SİNYALLEŞMESİ
ÜZERİNE ETKİSİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Batuhan BİLGİN

2018

ONAY SAYFASI

Prof. Dr. Mustafa KAPLAN

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Bu tez Yüksek Lisans standartlarına uygun bulunmuştur.

Prof. Dr. Mete ÖZCAN

M. Özcan

Biyofizik Anabilim Dalı Başkanı

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

Prof. Dr. Mete ÖZCAN

M. Özcan

Danışman

Yüksek Lisans Sınav Jüri Üyeleri

Prof. Dr. M. Zülkefî Akdağ

Prof. Dr. Mete ÖZCAN

Yrd. Doç. Dr. İhsan SERHAATLI ÖZEL

Z. Akdağ

M. Özcan

I. Serhatlı Özel

.....

.....

.....

.....



ETİK BEYAN

Kendime ait çalışmalar ile bu tez çalışmasını gerçekleştirdiğimi, çalışmaların planlanmasından, bulgularının elde edilmesine ve yazım aşamasına kadar tüm aşamalarında etiğe aykırı davranışım olmadığını, bu tezdeki tüm bilgileri ve verileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışması içinde yer alan ancak bu tez çalışmasının bulguları arasında yer almayan verilere, bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi beyan ederim.

Batuhan BİLGİN

03.01.2018

Prof. Dr. Mete ÖZCAN

Biyofizik Anabilim Dalı

ELAZİĞ

TEŞEKKÜR

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

Tez çalışması süresince yardımlarını gördüğüm Biyofizik Anabilim Dalı Öğretim üyesi Sayın Yrd. Doç. Dr. İhsan SERHATLIOĞLU'na, yüksek lisans öğrencisi Gökhan ZORLU'ya, Fizyoloji Anabilim Dalı Öğretim üyeleri Sayın Prof. Dr. Haluk KELEŞTİMUR, Prof. Dr. Sinan CANPOLAT, Yrd. Doç. Dr. Emine KAÇAR, Dr. Fzt. Zübeyde ERCAN, Arş. Gör. Nazife ÜLKER, Arş. Gör. Ahmet YARDIMCI, yüksek lisans öğrencisi Fatih TAN'a ve bütün hayatım boyunca bana destek olan aileme,

Bu tezin gerçekleşmesi için gerekli desteği 115S290 numaralı proje kapsamında sağlayan TÜBİTAK'a teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

BAŞLIK SAYFASI	i
ONAY SAYFASI	ii
ETİK BEYAN	iii
TEŞEKKÜR	iv
İÇİNDEKİLER	v
TABLO LİSTESİ	viii
ŞEKİL LİSTESİ	ix
KISALTMALAR LİSTESİ	xi
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	13
3.3.3. Klor Kanalları	14
3.3.4. Voltaj Kapılı Kalsiyum Kanalları	15
3.3.4.1. L tipi kalsiyum kanalları	17
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. Agomelatin	23
3.5. Ağrı	26
3.5.1. Ağrı Tipleri ve Özellikleri	27
3.5.1.1. Nositif Ağrı	28
3.5.1.2. Nöropatik Ağrı	29
3.5.2. Ağrının Bastırılması (Analjezi)	29
3.5.3. Antidepresanların Analjezik Özellikleri	32
3.6. Dorsal Kök Gangliyonu Nöronlarının Sınıflandırılması ve Özellikleri	33
4. GEREÇ VE YÖNTEM	37
4.1. Sıçan Dorsal Kök Gangliyon Hücrelerinin Primer Kültürü	37
4.1.1. Kültür İçin Kullanılan Solüsyonlar ve Kimyasal Ajanlar	37
4.1.2. Kültür Vasatı	38
4.1.3. Kültür İçin Kullanılan Ekipman ve Sarf Malzemeleri	38
4.1.4. Diseksiyon Malzemeleri	39
4.1.5. Diğer Ekipmanlar	39
4.1.6. Dorsal Kök Gangliyon Hücre Kültürü Protokolü	39
4.2. Hücre İçi Kalsiyum Görüntüleme ve Görüntü Analizleri	41
4.2.1. Floresan Kalsiyum Görüntüleme	41
4.3. Agomelatin Uygulaması	42
4.4. Agomelatin ile Hücresel Yolak İnhibitörü Uygulaması	43
4.5. İstatistik	43
5. BULGULAR	44

6. TARTIŞMA	54
7. KAYNAKLAR	59
8. ÖZGEÇMİŞ	72



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, agomelatinin (1, 10 ve 100 μM) uygulamasına, $[\text{Ca}^{+2}]_i$ düzey (% olarak 340 nm/380 nm floresan oranları) cevapları.	45

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 3.1: Voltaj Kapılı Sodyum Kanalı	12
Şekil 3.2: Kalsiyum kanal alt tipleri	16
Şekil 3.3: Agomelatinin etki mekanizması	25
Şekil 3.4: Duyusal Nöron Tipleri	28
Şekil 3.5: Sinir Lifi Tiplerinin Sınıflandırılması	35
Şekil 4.1: Kalsiyum Görüntüleme Sisteminin Genel Görünüşü.	43
Şekil 5.1: Dorsal kök gangliyonu nöronlarında $[Ca^{+2}]_i$ düzeyleri A. 1 μM agomelatin uygulaması öncesi $[Ca^{+2}]_i$ düzeyini gösteren orijinal resim B. 1 μM agomelatin uygulaması sonrası $[Ca^{+2}]_i$ düzeyini gösteren orijinal resim. C. KCl (30 mM) uygulaması D. 1 μM agomelatin uygulamasının DKG hücrelerindeki $[Ca^{+2}]_i$ düzeyine etkisi (n = 43)	46
Şekil 5.2: Dorsal kök gangliyonu nöronlarında $[Ca^{+2}]_i$ düzeyleri A. 10 μM agomelatin uygulaması öncesi $[Ca^{+2}]_i$ düzeyini gösteren orijinal resim B. 10 μM agomelatin uygulaması sonrası $[Ca^{+2}]_i$ düzeyini gösteren orijinal resim. C. Agomelatinin (10 μM) $[Ca^{+2}]_i$ miktarında meydana getirdiği artışın geri dönüşümü D. Agomelatin (10 μM) uygulaması sonrası $[Ca^{+2}]_i$ miktarı değişimi	47
Şekil 5.3: Dorsal kök gangliyonu nöronlarında $[Ca^{+2}]_i$ düzeyleri A. 100 μM agomelatin uygulaması öncesi $[Ca^{+2}]_i$ düzeyini gösteren orijinal resim B. 100 μM agomelatin uygulaması sonrası $[Ca^{+2}]_i$ düzeyini gösteren orijinal resim. C. Agomelatinin (100 μM) $[Ca^{+2}]_i$ miktarında meydana getirdiği artışın geri dönüşümü D. Agomelatin (100 μM) uygulaması sonrası $[Ca^{+2}]_i$ miktarı değişimi	48
Şekil 5.4: Dorsal kök gangliyonu nöronlarında $[Ca^{+2}]_i$ düzeyleri A. Bazal B. PTX uygulaması sonrası $[Ca^{+2}]_i$ düzeyini gösteren orijinal resim. C. PTX	

muamelesi ardından 100 μ M agomelatin uygulaması ile $[Ca^{+2}]_i$ düzeyini gösteren orijinal resim. **D.** Agomelatin (100 μ M) uygulamasının meydana getirdiği artış %100 kabul edildiğinde, PTX'in bu etkiyi büyük ölçüde ortadan kaldırdığını gösteren grafik. 50

Şekil 5.5: Dorsal kök gangliyonu nöronlarında $[Ca^{+2}]_i$ düzeyleri **A.** Bazal **B.** U-73122 uygulaması sonrası $[Ca^{+2}]_i$ düzeyini gösteren orijinal resim. **C.** U-73122 muamelesi ardından 100 μ M agomelatin uygulaması ile $[Ca^{+2}]_i$ düzeyini gösteren orijinal resim. **D.** Agomelatin (100 μ M) uygulamasının meydana getirdiği artış %100 kabul edildiğinde, U-73122'in bu etkiyi büyük ölçüde ortadan kaldırdığını gösteren grafik 52

Şekil 5.6: Dorsal kök gangliyonu nöronlarında $[Ca^{+2}]_i$ düzeyleri **A.** Bazal **B.** Şelettrin klorit uygulaması sonrası $[Ca^{+2}]_i$ düzeyini gösteren orijinal resim. **C.** Şelettrin klorit muamelesi ardından 100 μ M agomelatin uygulaması ile $[Ca^{+2}]_i$ düzeyini gösteren orijinal resim. **D.** Agomelatin (100 μ M) uygulamasının meydana getirdiği artış %100 kabul edildiğinde, Şelettrin klorit'in bu etkiyi ortadan kaldırdığını gösteren grafik 53

KISALTMALAR LİSTESİ

ADİK	: Aside Duyarlı İyon Kanalları
AEİ	: Anti Epileptik İlaçlar
AP	: Aksiyon Potansiyeli
Ca⁺²	: Kalsiyum İyonu
[Ca⁺²]_i	: Hücre İçi Serbest Kalsiyum
Cl⁻	: Klor İyonu
COX	: Siklooksijenaz Enzimi
DKG	: Dorsal Kök Gangliyonları
DVAKK	: Düşük Voltajla Aktive Olan Kalsiyum Kanalları
IP₃	: İnoзитol Trifosfat
K⁺	: Potasyum İyonu
mM	: Milimolar
MSS	: Merkezi Sinir Sistemi
mV	: Milivolt
Na⁺	: Sodyum İyonu
nm	: Nanometre
NSAİİ	: Non Steroidal Antienflamatuar İlaçlar
TRP	: Transient (geçici) Reseptör Potansiyel
VKKK	: Voltaj Kapılı Kalsiyum Kanalları
VKPK	: Voltaj Kapılı Potasyum Kanalları
VKSK	: Voltaj Kapılı Sodyum Kanalları
YVAKK	: Yüksek Voltajla Aktive Olan Kalsiyum Kanalları

1. ÖZET

Valdoksan ticari ismiyle 2009 yılında Avrupa Birliği İlaç Ajansı tarafından onaylanan yeni bir antidepresan olan agomelatinin, ağrı üzerindeki etkinliği son zamanlarda yapılan çalışmalar ile ortaya konmuştur. Ancak analjezik etkinliğini hangi mekanizma ile meydana getirdiği bilinmemektedir. Bu çalışmada, agomelatinin periferel nosisepsiyondaki etki mekanizması incelendi. Bu amaçla izole edilmiş sıçan dorsal kök gangliyon (DKG) nöronlarında agomelatinin hücre içi kalsiyum ($[Ca^{+2}]_i$) düzeyine etkilerine bakıldı.

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 kayıt edildi. $[Ca^{+2}]_i$ konsantrasyonundaki değişim, DKG nöronlarındaki 340 nm/380 nm floresan oranındaki değişimle belirlendi. Agomelatin, doz bağımlı olarak $[Ca^{+2}]_i$ miktarının artmasına neden oldu. 340 nm/380 nm oranları, (bazal $100,0 \pm 0,0$ % vs agomelatin): % $103,4 \pm 2,7$ (1 μ M agomelatin, n=43), % $113,8 \pm 4,2$ (10 μ M agomelatin, n=62) ve % $161,2 \pm 6,1$ (100 μ M agomelatin, n=48) tespit edildi. G protein inhibitörü pertusis toksin (PTX), agomelatinin $[Ca^{+2}]_i$ düzeyinde meydana getirdiği artışı baskılamaktadır (% $100,0 \pm 0,0$ 'dan % $7,9 \pm 3,6$ 'a, n=61). Fosfolipaz C (PLC) inhibitörü U-73122 muamelesi sonrasında ve protein kinaz C (PKC) inhibitörü şeletrin klorit muamelesi sonrasında agomelatin uygulandığında, agomelatinin meydana getirdiği artış önemli ölçüde azalmaktadır ((% $100,0 \pm 0,0$ 'dan $12,3 \pm 3,5$ 'e, n=39) $100,0 \pm 0,0$ 'dan $28,6 \pm 4,2$ 'e, n=27).

Bu çalışma ile ilk kez DKG hücre kültüründe agomelatinin $[Ca^{+2}]_i$ miktarında meydana getirdiği değişimin, periferik nosiseptif sinyalde rol oynayan G protein, PLC ve PKC bağımlı mekanizma aracılığıyla olduğu gösterildi. Yüksek afiniteli melatonergic (MT1 ve MT2) reseptör agonisti (MT1: $pK_i=9.92$; MT2: $pK_i=9.24$) ve düşük duyarlılıkta serotoninergic 5-HT 2C ($pK_i=6.2$) reseptör antagonisti özelliğine sahip bir antidepresan olan agomelatinin, artı olarak ağrı algılama sürecinde de rol aldığı düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Agomelatin, Kalsiyum Görüntüleme, Dorsal Kök Gangliyonu, Ağrı

2. ABSTRACT

THE EFFECT OF AGOMELATINE ON INTRACELLULAR CALCIUM SIGNALING IN SENSORY NEURONS

The efficacy of agomelatine, a new antidepressant approved by the European Union Pharmaceutical Agency in 2009 under the trade name valdoxan, on pain has recently been demonstrated by studies done. However, it is not known which mechanism leads to the formation of analgesic activity. In this study, the mechanism of action of agomelatine in peripheral nociception was investigated. For this purpose, effects of agomelatine on intracellular calcium ($[Ca^{+2}]_i$) levels were looked in isolated rat dorsal root ganglion (DRG) neurons.

Isolated DRG neurons were loaded with 1 μ mol fura-2 AM and Ca^{+2} responses were assessed by using proportional measurement. 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. Change in $[Ca^{+2}]_i$ concentration determined with a change in fluorescence ratio of 340 nm / 380 nm in DRG neurons. Agomelatine caused to increase dose-dependent in $[Ca^{+2}]_i$. The mean 340 nm/380 nm ratios were detected (baseline 100,0 $\pm$ 0.0 % vs agomelatine): % 104,8 $\pm$ 3,2 (1 μ M agomelatine, n=43), % 117,6 $\pm$ 2,4 (10 μ M agomelatine, n=62) and % 164,2 $\pm$ 2,8 (100 μ M agomelatine, n=48). The G protein inhibitor pertussis toxin (PTX) suppresses the agomelatine-induced calcium responses (from 100,0 $\pm$ 0.0 % to 7,9 $\pm$ 3,6 %, n=61 cells). When agomelatine is administered after treatment with the phospholipase C (PLC) inhibitor U-73122 and after treatment with the protein kinase C (PKC) inhibitor chelerythrine chloride, the increase in agomelatine-induced calcium responses significantly

decreases (from $100,0 \pm 0,0$ % to $12,3 \pm 3,5$ %, n=39 cells) (from $100,0 \pm 0,0$ % to $28,6 \pm 4,2$ %, n=27 cells).

We first demonstrated that agomelatine mediate peripheral nociceptive signalling through mechanism that involves G protein, PLC and PKC-dependent changes in intracellular calcium levels in rat primary sensory neurons. Agomelatine which a antidepressant that high affinity melatonergic (MT1 and MT2) receptor agonist (MT1: $pK_i=9.92$; MT2: $pK_i=9.24$) and serotonergic (5-HT_{2C}) ($pK_i=6.2$) receptor antagonist in low sensitivity, it is also thought to play a role in pain recognition process.

Key Words: Agomelatine, Calcium Imaging, Dorsal Root Ganglion, Pain,

3. GİRİŞ

Canlı organizmaların temel ögeleri hücrelerdir. Tek hücreli canlılarda olduğu gibi, bir tek hücre de tamamen bağımsız yaşayabilmektedir. Doku yapılarına giren hücreler de, tıpkı bağımsız hücreler gibi açık sistem olmaktadır. Hücrelerarası sıvı adı verilen ortam içinde bulunan doku ve hücreler, bu ortamdan hücre membranı ile ayrılmaktadırlar. Hücre membranının temel işlevi hücre bütünlüğünü korumaktır. Hücre membranları, iç ortam özelliklerinin sabit kalmasını, dış ortamdan etkilenmemesini sağlamaktadır. Hücrenin çevresiyle seçici madde alış verişi yapması, ihtiyaç duyulan maddelerin kolaylıkla içeriye alınması, reaksiyonlar sonucu artık ürünlerin dışarıya atılması hücre membranı vasıtasıyla gerçekleşmektedir. Biyoelektrik olaylar da hücre membranlarının bir görevidir.

Hücre membranlarının kalınlıkları 6-10 nm arasında değişmektedir. Elektriksel bakımdan yalıtkan özelliklere sahip lipit çift tabakasının dielektrik sabiti 2 ile 3 F/m arasında değişmektedir. Hücre membranının, kalınlığının çok küçük olması yüzünden, $1 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ gibi çok büyük bir sığaya sahip olabilmektedir. Kapasitif davranış yanında iletkenlik özelliği de gösteren membranların sızıntı direnci 10^2 - 10^5 ohm.cm^2 arasında değişmektedir. 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 kurulmaktadır. Bu potansiyel fark 150 mV'a çıkarıldığında dielektrik yapı bozulur ve membrandan büyük bir akım geçer (1).

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

geçirgenlik özelliğidir. Bunun sonucunda bu iyonlar membranın iki tarafında farklı konsantrasyonlarda bulunmaktadır. Luigi Galvani'nin 1791 yılında kurbağalarda yaptığı deneylerde tanık olduğu elektriksel olayların temelinde de bu potansiyel fark yatmaktadır. 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 gelişmesinde temel basamak olmuştur (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 kuvvetli bir şekilde difüze olma eğilimindedir. Böylece, K^+ iyonları membranın dışına geçerek membranın dış yüzünü elektropozitif yapmaktadır. K^+ iyonuyla dışarıya difüze olmayan, içeride kalan negatif anyonlar, membranın iç kısmını elektronegatif yapmaktadırlar. Membranın dış kısmının pozitif, iç kısmının negatif olmasından dolayı oluşan bu yeni potansiyel fark, pozitif yüklü K^+ iyonlarının, dışarıdan içeriye doğru geçişinde etkili olmaktadır. Bu potansiyel fark 1 ms içinde, K^+ iyonlarının daha fazla dışarıya geçişini engelleyecek düzeye gelmektedir. Bunlara ek olarak istirahat halinde K^+ 'un hücre membranından, Na^+ 'a göre 50-100 kat daha kolay geçebildiği bilinir (4).

K^+ iyon konsantrasyonuna karşı Na^+ konsantrasyonu ise, membranın dışında çok yüksek iken içinde çok düşüktür. Na^+ iyonlarının içeriye doğru difüzyonu, membranın dış kısmını negatif, iç kısmını pozitif yaparak yeni bir

membran potansiyeli yaratmaktadır. Membran potansiyeli, saniyeler içinde Na⁺ iyonlarının içeriye net difüzyonunu durduracak düzeye yükselmektedir. Böylece membranın iç kısmındaki iyonların konsantrasyonu ile dış kısmındaki iyonların konsantrasyonları arasında oluşan fark, bir membran potansiyeli meydana getirmektedir. 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 belirlenir (4).

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

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

E_I = I iyonu için denge potansiyeli

R = Gaz sabiti

T = Mutlak sıcaklık

F = Faraday sabiti

z_I = I iyonunun değeri

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

$[I_{iç}]$ = 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 (mV)
	Hücre Dışı (μmol/cm ³)	Hücre İçi (μmol/cm ³)	
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 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 potansiyellerinin hızlı bir şekilde değişmesi ile ortaya çıkan aksiyon potansiyel (AP) lerini iletmektedirler. Her AP, olağan sükun negatif potansiyelden pozitif membran potansiyeline ani bir değişme ile başlar ve yaklaşık aynı hızla yine negatif potansiyele geri dönmektedir. Bir sinir sinyalinin iletisinde AP, sinir lifi boyunca sinir ucuna ulaşınca kadar yayılmaktadır. Pozitif yükler öncelikle liften içeriye doğru akmaktadır ve sonra tekrardan dışarıya dönmektedir. Daha sonra membran potansiyelinde, saniyenin onbinde biri gibi çok kısa zamanda birbiri ardına oluşan değişimler AP'ler ortaya çıkar.

Dinlenim Dönemi: Bu dönem AP oluşmadan önceki membran dinlenim potansiyelini belirtmektedir. Bu dönem içerisinde membran güçlü bir negatif membran potansiyeline sahip olduğundan dolayı “polarize” durumdadır.

Depolarizasyon Dönemi: Bu dönemde membran bir anda Na^+ ’a karşı geçirgen duruma gelmektedir ve çok fazla miktarda pozitif yüklü Na^+ iyonunun aksondan içeri doğru akmasına neden olmaktadır. Normalde “polarize” durum, potansiyelin hızlı bir şekilde pozitif yönde yükselmesi ile kaybolmaktadır. Buna “depolarizasyon” denmektedir. Kalın sinir liflerindeki membran potansiyelleri çoğunlukla sıfır seviyesini geçerek pozitif olmaktadır, fakat bazı küçük sinir lifleri ve merkezi sinir sistemindeki nöronların genelinde potansiyel ancak sıfır seviyesine yaklaşır ve pozitif duruma gelmez.

Repolarizasyon Dönemi: Membranda Na^+ ’a geçirgenlik çok fazla arttıktan sonra, saniyenin onbinde biri gibi kısa bir zamanda Na^+ kanalları kapanmaya başlamaktadır ve K^+ kanalları normaldeki durumuna göre daha fazla açılmaktadır. K^+ iyonlarının dışa doğru hızlı difüzyonu membranın negatif istirahat

potansiyelinin tekrardan oluşmasını sağlamaktadır. Buna membranin “repolarizasyonu” denilmektedir (4).

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

3.3. Membran İyon Kanalları

Yapıları son onbeş yılda daha iyi anlaşılmaya başladı. 19. yüzyıldan itibaren iyonların çift katlı fosfolipid yapıdan geçemeyeceği ancak, bir şekilde membranın diğer tarafına geçebildikleri biliniyordu. Ernst Brücke osmoz gerçekleştiğine göre, membranda bazı delik veya açıklıklar olmalı hipotezini kurdu. William Bayliss iyonların çevresi su ile kaplandığına göre, bu iyonlar ancak su dolu kanallardan geçiyor olabilir ihtimali üzerinde durdu. Daha sonrasında su dolu bir kanaldan iyonlar çok hızlı bir şekilde geçtiği esnada bir yandan da seçici olabildiği ortaya çıktı (5).

Kanalın yapısını meydana getiren integral membran proteinleri, iç çeperleri polar grup ve yüklü gruplarca kaplanmış içi su dolu bir gözenek oluşturur. Bu gözenek genellikle bir iyondan daha geniştir. Ancak sınırlı bir bölgesinde atomik boyutlara kadar daralmakta ve bu dar bölge iyon seçici bir filtre olarak davranır (6).

Kapılı kanalları oluşturan makro moleküllerin açık ve kapalı gibi iki farklı konformasyonu bulunmaktadır. 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 bağlanmasıdan doğan kimyasal kuvvetlerle veya bazı duyuşal sinir uçlarında gerilme ve basınç gibi mekanik kuvvetlerle yönetilmektedirler. Buna göre de kanallar, voltaj kapılı, ligand kapılı ve mekanik kapılı olarak isimlendirilirler. Günümüzde ise moleküler biyoloji, farmakoloji ve biyofizik alanında yapılan çalışmalar çok sayıda iyon kanalı ve bu kanalların alt tiplerinin olduğunu ortaya çıkarmıştır (1).

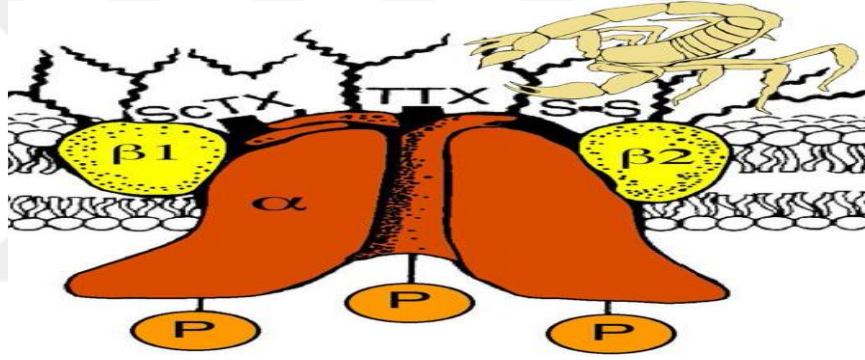
Kanalların seçicilikleri oldukça yüksektir ancak bir kanal, göreceli olarak zayıf da olsa, birçok farklı türden iyonu geçirebilir. Uyarının yayılması ile ilgili olan en önemli kanallar Na^+ , K^+ , Cl^- ve Ca^{+2} kanallarıdır. Bir membranda aynı tür iyonla geçirgen farklı özelliklerde kanallar bulunabilir. Bir nöronun farklı bölgelerinde kanal dağılımı farklılıklar göstermektedir. Böylece nöronun farklı bölgeleri farklı işlevler üstlenebilir. Örneğin; Ca^{+2} kanalları sinir son uçlarında çok yoğundur ve bu kanallardan içeri Ca^{+2} girişı ile transmitter madde salınmaktadır.

Günümüzde kanalların işlevlerinin incelenmesinde “patch” kenetleme adı verilen yöntem yaygın olarak kullanılır. Bu tekniğı geliştirenlerin öncülerinden Erwin Neher ve Bert Sakmann 1991 Nobel Tıp ve Fizyoloji Ödölünü kazanmıştır (7).

3.3.1. Voltaj Kapılı Sodyum Kanalları

Voltaj kapılı sodyum kanalları, nöronlarda ve diğler uyarılabilir hücrelerde aksiyon potansiyeli başlatmada önemli rol oynar ve bunların işlev bozuklukları kalıtsal epilepsiye, kronik ağrıya ve hipereksitabilitenin diğler hastalıklarına neden olmaktadır. VKSK iletkenliğı, AP'nin geçici olarak depolarizasyonuna neden olur. Sodyum kanallarının temel fonksiyonel özelliklerinin çoğı, nöron

aksonlarının kapsamlı voltaj kenetleme çalışmalarında analiz edildi (8). Moleküler sınıflandırmaya göre dokuz farklı sodyum kanalının olduğu bilinmektedir ve şimdi bunlara selektif blokörler geliştirilmektedir. Dört kanal ağrı için potansiyel hedef teşkil etmektedir (Nav1.3, Nav1.7, Nav1.8, Nav1.9) (9). Voltaj kapılı sodyum kanalları, α (260 kDa) (Nav1.1- Nav1.9) ve β alt ünitelerinden (33- 45 kDa) (β_1 , β_1A , β_2 ve β_3) oluşmuştur (10-13). Önemli fonksiyonları olduğu bilinen, α alt ünitesinin 9 izoformu bulunur. β alt ünitesi ve diğer sitozolik kanal çiftleri, hücre membranında kanalların açılmasını ve kanalların biyofiziksel özelliklerini düzenler.



Şekil 3.1: Voltaj Kapılı Sodyum Kanalı (Kaynak 9'dan değiştirilerek alınmıştır)

Farmakolojik ve biyofiziksel özelliklerine göre Na^+ kanalları, hızlı tetrodotoksine duyarlı Na^+ kanalları ve yavaş tetrodotoksine duyarlı Na^+ kanalları olmak üzere iki sınıfa ayrılmaktadır (14, 15). Na^+ kanalları, istirahat halinde inaktif ve kapalıdır. Geçici kanal açılışı, konsantrasyon gradiyentinin düşüşüyle Na^+ iyonlarının akışına izin vermektedir. Böylece, AP oluşumu için eşige yakın olan depolarize nöronlar, içe doğru transmembran akımını oluşturmaktadırlar. Bazı kanallar, açılışından birkaç milisaniye sonra hızlıca inaktive olurlar ve böylece konformasyon değişimlerinin inaktivasyonunu geri kazanırlar (16, 17).

Duyusal nöronlarda VKSK, hasarlı bir dokudan periferel sinirlere doğru ortaya çıkan kronik ağrılı nöropatide direk olarak önemli rol oynar. Bu kanalların antikonvülzanlar, antiaritmikler ve lokal anestezikleri içeren blokörleri nöropatik ağrının tedavisinde etkili olmaktadır (4). Nöropatik ağrının altında yatan mekanizmanın araştırılması için VKSK önemli rol oynar (15).

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 oynarlar. Presinaptik VKPK, beynin tamamından hem eksitatör hem de inhibitör nörotransmitter salınımını düzenlemektedir (18).

VKPK, K^+ iyonlarının akışına izin vermesiyle birlikte uyarılabilir hücrelerde repolarizasyona neden olur (16, 19). VKPK'nın α alt üniteleri, polipeptidden oluşmuştur. Her bir polipeptid, 6 transmembran heliks yapıya sahiptir (S1-S6). S5-S6 bölgeleri arasındaki iki ilave bileşen kanalın gözenek bölgesini oluşturmaktadır (20-22). S4 bölgesi ise pozitif yüklüdür ve önemli voltaj sensörü olarak etki eder. S4 dışarı doğru etki ettiği zaman plazma membranı, konformasyon değişimlerine uğramaktadır. S5-S6 ise heliks ve depolarize duruma gelmektedir. Bu nedenle, kapının açılışı ile K^+ iyonları dışarı çıkar (20-22).

Moleküler olarak incelendiğinde α_{1-9} (23-27) ve β_{1-4} (27) alt birimleri bulunan VKPK, gecikmiş-doğrultucu K^+ kanalları, içeriye yönelik K^+ kanalları, hızlı geçici A tipi K^+ kanalları (K_A) (28-31), yavaş aktive olan K^+ kanalları, ATP'ye duyarlı K^+ kanalları (K_{ATP}) ve Ca^{+2} ile aktive olan K^+ kanalları şeklinde ayrılmıştır (31, 32). Gecikmiş doğrultucu tipteki kanallar, blokörlerden tetraetilamonyuma duyarlı iken K_A kanalları 4-aminopiridine daha duyarlıdır

(31, 33). Gecikmiş doğrultucu ve K_A kanallarının birlikte bulunduğu membranlarda, sabit depolarize edici bir puls akımına çoklu ateşlemeli aksiyon potansiyeli şeklinde yanıtların oluştuğu gösterilmiştir (31, 16). K_{ATP} 'nın, pankreas β hücrelerinde varlığı belirlenmiştir. Bu kanallar, insülin sekresyonunda rol oynar ve böylece glukoz homeostazisinde çok önemli rolü vardır (34). K_{ATP} , hücrel metabolik değişimlere karşı yanıt oluşturmaktadırlar. Bu kanallar, ATP ve sulfonilüreler tarafından inhibe edilmektedirler. (35, 36). Ca^{+2} ile aktive edilen K^+ kanalları ise, 2 şekilde isimlendirilmiştir. Bunlar; büyük iletkenliğe sahip olan Ca^{+2} ile aktive edilen K^+ kanalları ve küçük iletkenliğe sahip olan Ca^{+2} ile aktive edilen K^+ kanalları olarak tanımlanmışlardır. Bu kanalların her ikisi de, homotetramer yapıya sahiptir ve Ca^{+2} 'a duyarlı olan intrasellüler sekans geliştirmişlerdir (37).

3.3.3. Klor Kanalları

Canlılarda bol miktarda bulunan Cl^- iyonlarının zarın iki tarafındaki dağılımı denge durumundadır. Çok farklı tipleri saptanmış Cl^- kanallarının bilinen en önemli işlevi membran potansiyelini stabilize duruma getirmektir (1). Bu kanallar, plazma membranında ve çoğu dokunun hücre içi organellerinde bulunur (38). Cl^- kanalları için yüksek affiniteli ve selektif antagonist çok azdır. Bilinen en selektif ve güçlü antagonistler arasında niflumik asit, 5-nitro-2-benzoat (39), akrep venomunda izole edilen klorotoksin, sezyum ve rubidyum yer alır (1). Cl^- kanalları memelilerde 9 gen tarafından kodlanır (38). Çeşitli sinir dokularında üç farklı tipte Cl^- kanalı bulunur. Ligand kapılı Cl^- kanalları (40), voltaj bağımlı Cl^- kanalları (41), Ca^{+2} ile aktive olan Cl^- kanallarıdır (42).

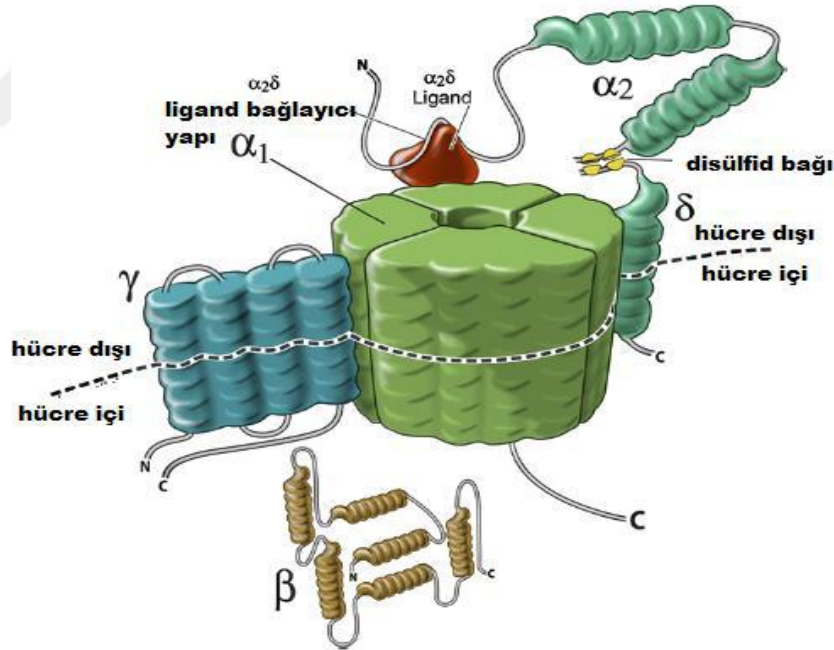
3.3.4. Voltaj Kapılı Kalsiyum Kanalları

Voltaj kapılı kalsiyum kanalları (VKKK), nöronlarda hücre içine Ca^{+2} girişinin temel düzenleyicisi olarak görev yapar. Ca^{+2} iyonu çeşitli yollarla hücreye girdikten sonra birçok sahada ikincil mesajcı gibi davranmaktadır. Ca^{+2} , kas kontraksiyonunu, nörotransmitter salınımını ve gen ekspresyonunu düzenleme gibi birçok fonksiyonda görev almaktadır. Aşırı hücre içi kalsiyum ($[\text{Ca}^{+2}]_i$) artışı da, nöronal hasara yol açar. (43, 44). 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 gerçekleşmektedir.

VKKK'nın, biyofiziksel, farmakolojik ve moleküler olarak 3 ayrı sınıflandırılması yapılmıştır. VKKK moleküler olarak; α_1 , β , γ ve $\alpha_2\delta$ alt birimlerden oluşur (45-47) (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 (48) ve kalsiyum geçiren gözenekleri şekillendirmede görev almaktadır (47, 49). α_1 alt ünitesi, yaklaşık 2000 aminoasitin oluşturduğu 4 homolog bölgeden (I-IV) oluşmaktadır. α_1 alt ünitesi, 6 transmembran bölgeden oluşan heliks (S1-S6) bir yapısı vardır. 10 tane gözenek oluşturuca α_1 alt birimi tanımlanmıştır ve 3 alt sınıfa ayrılır. 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 tanımlanır (50). Na^+ , K^+ ve Ca^{+2} kanallarının alt üniteleriyle ilgili yapısal ve fonksiyonel çalışmalar, bu kanalların fonksiyonlarının tanımlanmasına yol gösterir (48, 51). S5 ve S6 transmembran segmentleri, P

düğümü arasındaki por modülasyonunu sağlar. S1 ve S4 segmentleri ise voltaj sensörü olarak görev yapar (48).

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 kodlanmaktadır. 4 transmembran segmente sahip γ alt ünitesi ise iskelet kasında, Ca^{+2} kanallarının tamamlayıcı bir kısmıdır. Ca^{+2} kanallarının yardımcı alt üniteleri, kanal fonksiyonları üzerinde önemli görevlere sahiptirler (48, 52, 53). VKKK'nın β alt üniteleri, α_1 alt ünitelerinin hücre yüzeyindeki ekspresyonunu etkilemekte ve bunların kinetik yapılarını büyük ölçüde artırırlar. $\alpha_2\delta$ alt üniteleri, α_1 alt ünitelerinin hücre yüzey ekspresyonlarını artırmaktadır ve voltaj bağımlı kapılar üzerindeki etkileri kalıcı değildir (48, 54).



Şekil 3.2: Kalsiyum kanal alt tipleri. Voltaja duyarlı kalsiyum kanalları 4 alt birimden oluşmaktadır. α_1 alt birimi birbirine benzer 4 alandan oluşmuştur ki her biri 6 transmembran segment içermektedir. β alt birimi intrasellülerdir. γ alt biriminin 4 transmembran segmenti vardır. δ alt biriminin 1 tane transmembran segmenti vardır ve disülfid bağı ile ekstraselüler α_2 alt birimine bağlıdır (Kaynak 43'den değiştirilerek alınmıştır).

VKKK biyofiziksel olarak; L, P/Q, N, R ve T tipi olarak sınıflandırılmaktadırlar. Bunlar; voltaj aktivasyonu, kanal iletkenliği, spesifik blokörlere duyarlılık gibi durumlarda özellik bakımından farklılık göstermektedirler (43, 45) (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 (55) ve kalp kası, iskelet kası ve sinir hücrelerinde bulunurlar (43). 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 oluşmaktadır (48, 49). $Ca_v1.1$ (α_{1s}), $Ca_v1.2$ (α_{1c}), $Ca_v1.3$ (α_{1D}) alt birimleri, kalp kasında Ca^{+2} regülasyonunda çok önemli fonksiyonları vardır. Kas kontraksiyonunun 2 membran proteini arasındaki etkileşimi, L tipi VKKK ve ryanodin reseptörlerinin hücre içi Ca^{+2} konsantrasyonunu arttırması ile meydana gelir (56).

Nöronlarda bulunan L tipi VKKK akımları, nöronal fonksiyonların büyük bir kısmına katkı sağlamaktadır. L tipi VKKK, nörotransmitter salınımında, hücre içi fonksiyonlar için gereksinim duyulan Ca^{+2} 'nin sağlanmasında ve Ca^{+2} ile aktive edilen K^+ kanallarının regülasyonunda önemli rol oynar. Ca_v1 kanalları yüksek eşikte aktive olan kanallar olarak bilinirken, $Ca_v1.3$ ve $Ca_v1.4$ kanalları düşük eşikte aktive olurlar (57, 58). L tipi VKKK, hücresel ağırlı 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 bulunurlar (59, 60).

3.3.4.2. N tipi kalsiyum kanalları

N tipi kalsiyum kanalları, nöronların presinaptik sinir terminallerinden transmitter salınması işlevini yürütmektedirler (50, 61). 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 açmaktadır (43, 62-63). 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 kullanılır. (43, 64-66). Zikonotidin intratekal uygulanmasıyla, sinir hasarı meydana gelmiş farelerde de ağrı yanıtının azaldığı gözlenmiştir (43, 67-68). N tipi VKKK blokörleri, P maddesinin salınımını azaltır (43, 69-70). P maddesinin salınımı ise nöronal hipereksitabilitayı meydana getirir (43, 71-73).

3.3.4.3. P/Q tipi kalsiyum kanalları

Güçlü depolarizasyonla aktive olan P tipi kalsiyum kanalları, serebellar purkinje hücrelerinde tanımlanmıştır (74) ve α_{1A} , $\alpha_{2\delta}$ ve β_{4A} alt birimlerinden oluşurlar. P tipi kalsiyum kanalları, transmitter salınımından sorumludurlar ve ω -agotoksin IVA ile baskılanmaktadırlar (48, 61, 75). P/Q tipi VKKK nakavt farelerde nosiseptif uyarıcılara duyarlılık azaldığı gözlenmiştir (76).

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 olmaktadır. Bu kanallar, α_{1E} , $\alpha_{2\delta}$ ve β_{1B} alt birimlerinden oluşmaktadırlar (50, 75, 77-79). R tipi Ca^{+2} kanalları transmitter salınımında sorumludurlar. Ayrıca hipokampal nöronların ateşlemesine ve depolarize edici ard potansiyelin oluşumuna da katkıda bulunmaktadırlar (80, 81).

R tipi VKKK, omuriliğin dorsal kök kısmını kapsayan tüm sinir sisteminde bulunmaktadır (82). R tipi VKKK'nın, spinal ve supraspinal seviyede

hem nosiseptif hemde antinosiseptif ağrıyı azaltmış olabileceği düşünülmektedir (43, 83). Ağrı ile ilgili çalışmalarda, R tipi VKKK blokörü olan Hysterocrates gigas venomlarından elde edilmiş SNX-482 kullanılır (43, 84-85).

3.3.4.5. T tipi kalsiyum kanalları

T tipi kalsiyum kanalları membran dinlenim potansiyeline yakın depolarizasyonlarla aktive olan düşük eşeğe sahip kanallardır. T tipi VKKK, kalp kası, düz kas, DKG hücre gövdesinde ve serbest sinir uçlarında bulunmaktadır (43, 86). Düşük voltajla aktive olan T tipi kalsiyum kanalları, istirahat potansiyeline yakın negatif membran potansiyellerinde aktifleşmektedirler. Bu kanallar, repolarizasyon aktivitesine ve uyarılabilirliğe katkıda bulunarak AP için eşeği düşürebilirler (43, 87-88). T tipi VKKK'nin, α_1 alt birimlerine göre 3 alt türü bulunmuştur. Bunlar; $Ca_v3.1$, $Ca_v3.2$ ve $Ca_v3.3$ tür (89).

T tipi VKKK inhibitörlerinin özel seçici bir alt türleri yoktur. T tipi VKKK blokörlerinden etosuksimid, mibefradil ve $(3\beta, 5\alpha, 17\beta)$ -17- hidroksiedtran-3-karbonitril (ECN), hayvan ağrı modellerinde ağrı yanıtını azalttığı gözlenmiştir (43, 89-91). Talamustaki T tipi VKKK'nin, pacemaker aktivitesini de azalttığı düşünülmektedir (43, 92).

Tablo 3.2: Kalsiyum Kanal Sınıflandırılması (Kaynak 50'den değiştirilerek alınmıştır).

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

3.3.5. TRP Kanalları

Transient (geçici) reseptör potansiyel (TRP) kanalları ilk kez 1998 yılında *Drosophila* ırkı sirke sineklerinin göz hücrelerinde bulunmuştur (93-96). Genetik araştırmalar sonucunda TRP kanallarının 7 alt tipi belirlenmiştir. Bu alt tipler; A) TRP cononcial (TRPC) 7 ayrı alt tipi, B) TRP vaniloid (TRPV) 6 ayrı alt tipi, C) TRP polisistin (TRPP) 3 ayrı alt tipi, D) TRP mukolipin (ML) 3 ayrı alt tipi, E)

TRP ankyrin (TRPA) 1 alt tipi, F) TRP Drosophila NOMPC (TRPN), G)TRP melastatin (TRPM) 8 ayrı alt tipi bulunmaktadır (93, 97-102).

Bütün TRPC kanalları aynı ya da farklı akım özellikleriyle heterotetramerler olarak görev yapan seçici olmayan Ca^{+2} geçirgen katyon kanallarıdır (103). Kendi içinde 7 farklı alt grubu vardır (104). TRPV kanalları, katyonlar için seçici olmayan ve Ca^{+2} 'ya geçirgen olan polimodal ısı ve kemosenitif kanallardır (105). TRPM kanalları, Ca^{+2} ve Mg^{+2} arasında oldukça değişken geçirgenlikler göstermektedir (106). TRPML kanalları, seçici olmayan katyon kanalıdır ve $[\text{Ca}^{+2}]_i$ ile aktive olur (104). TRPP kanalları, seçici olmayan katyon kanalıdır ve $[\text{Ca}^{+2}]_i$ artışı ile aktive olmaktadır (104). TRPA kanalları ise, seçici olmayan katyon kanallarıdır ve $[\text{Ca}^{+2}]_i$ artışı ile aktive olmaktadır. Bu iyon kanallarının birçoğu Na^+ ve Ca^{+2} 'ya her ikisine geçirgen yani tek bir iyon seçici olmayan iyon kanallarıdır.

Sonuç olarak biyolojik mekanizmalara ilişkin birbirinden bağımsız yapılan çok sayıdaki çalışma TRP ailesinin varlığını ortaya koymuştur (98). 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 açılır. 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 görür (97, 107).

TRPV1, TRP kanalları içinde ağrı modülasyonu ile ilgili olarak ilgiyi en fazla çeken kanal olmuştur. Kapsaisin (CAP) veya CAP benzeri etki oluşturabilen resinoferatoksin (RTX), ısı, asit, oksidatif stres ürünleri ve endokanabnoidler gibi etkenler vanilloidler olarak adlandırılır. TRPV1, vanilloidlerle aktive olan bir iyon kanal reseptörüdür ve esas olarak duysal iletimde rol alır. TRPV1'in ağrı duyusunun taşınması ve belirlenmesinde rol alan duysal nöronları uyarmasındaki rolü çok sayıda çalışmada ele alınmış ve bu kanalların nosiseptif ve inflamatuvar ağrıda önemli düzenleyiciler olduğu gösterilmiştir. TRPV1 kanalı prostaglandinler, bradikinin, endojen lipid türevleri gibi inflamatuvar medyatörlerle allosterik olarak düzenlenmektedir.

TRPV1 kanallarının, arka kök gangliyon nöronları (DRG), trigeminal gangliyon ve vagal gangliyonlarda; ayrıca bu gangliyonların bipolar duysal nöronlarının periferik ve santral uzantıları üzerinde yoğun olarak eksprese edildiği bildirilmiştir. TRPV1 eksprese eden bu nöronlar, C ve A δ olarak sınıflandırılan miyelinsiz veya ince miyelinli sinir lifleridir. Rodentlerde TRPV1 eksprese eden nöronların tüm duysal nöronların % 30-50'sini oluşturduğu rapor edilmiştir. CAP duyarlı bu sinir lifleri substans P (SP) ve kalsitonin geni-ilişkili peptid (CGRP) içerirler ve bu lifler üzerindeki TRPV1 kanallarının uyarılması bu nöropeptidlerin salınımına neden olur (108).

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 (109, 110). Bu kanallar ekstrasellüler pH seviyesindeki değişikliklerle (pH=7.4 ile 4)

açılıp kapanırlar. ADİK, sadece pH'nın hızla azalması sonucu aktive olurlar ve bu kanallar asidik pH'nın sürekliliğinde duyarsızlaşmaktadırlar (110-112).

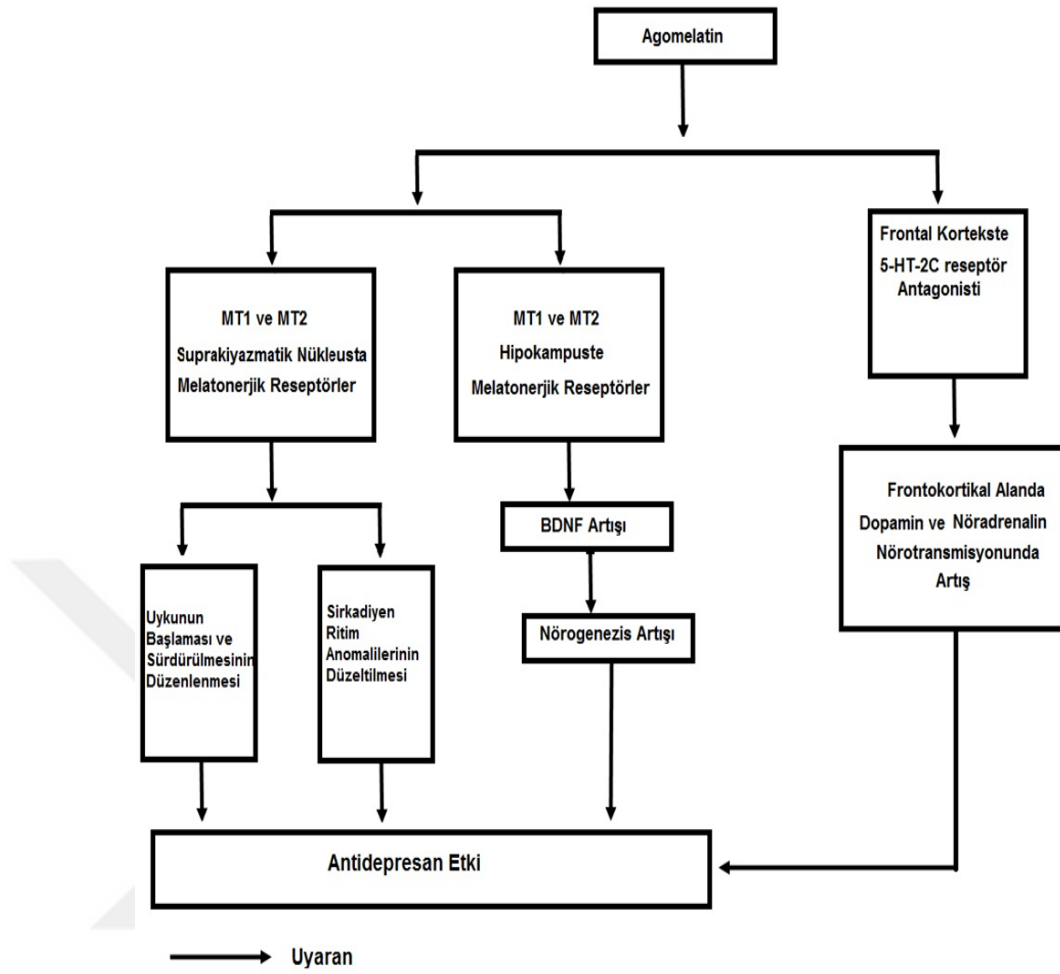
Bugüne kadar, ADİK'nın 7 alt ünitesi bulunmuştur. Bunlar; 1a, 1b1, 1b2, 2a, 2b, 3 ve 4 dir ve bunlar 4 gen tarafından kodlanmıştır (113, 114). ADİK, vasküler düz kas hücreleri (115) ve kemik (116) gibi nöronal olmayan dokularda bulunurlar. Homomerik olan ADİK1a, kalsiyuma geçirgenlik gösterirken, diğer homomerik ve heteromerik olan ADİK ise kalsiyuma geçirgen değildir (114, 117-119). Her ADİK alt ünitesi, 2 transmembran bölge (TM1 ve TM2) içermektedir. Bu bölgelerden TM2 bölgesi, bu kanalların iyon geçirgenliği için büyük öneme sahiptir (113, 115, 120). Periferik duyu nöronlarda ADİK'nın temel fonksiyonları, noisepsiyonu (121-127) ve ağrıdaki mekanik duyarlılığı (128-130) sağlamaktır. ADİK, tat iletiminde de rol oynar (131-133). ADİK1a ve ADİK3, yüksek duyarlılık ağrı sinyallerinin tonik inhibisyonunda rol oynamaktadırlar. ADİK3 miyelinsiz küçük çaplı peptiderjik noiseptörler ve büyük çaplı mekanoreseptörlerin yanı sıra duyu sinir terminallerinde ve serbest sinir uçlarında da bulunur (134, 135). ADİK2a ise retinal bütünlüğün korunması (136), baroreseptör duyarlılığı (137) ve nöronların işlevlerinin yerine getirilmesi için gereklidirler (138). Kalsiyum geçirgenliğine sahip ADİK1a'nın sensitizasyonu, asidozun meydana getirdiği nöronlarda hasara neden olur (117, 139-142).

3.4. Agomelatin

Melatoninin naftalenik analogu olan agomelatin (S20098), valdoksan ticari ismiyle 2009 yılında Avrupa Birliği İlaç Ajansı tarafından onaylanan yeni bir antidepresandır (143). Agomelatin yüksek afiniteli melatonerjik (MT1 ve MT2) reseptör agonisti (MT1: pKi=9.92; MT2: pKi=9.24) ve düşük duyarlılıkta

serotoninerjik 5-HT 2C (pKi=6.2) reseptör antagonisti özelliğine sahiptir (144, 145).

Depresif hastalarda yapılan klinik gözlemler duygudurum, anksiyete ve bazı fizyolojik fonksiyonların, sirkadiyen ritim anomalilerinden etkilendiğini (146), agomelatinin etki mekanizması düşünüldüğünde depresif hastaları bu yolla etkileyebileceği ifade edilmektedir (147). Agomelatinin, çeşitli hayvan modellerinde depresyon ve anksiyete tedavisinde etkili olduğu gösterilmiştir ve majör depresif bozukluk, bipolar bozukluk ya da mevsimsel duygulanım bozukluğu hastalarında yararlı etkileri vardır. Agomelatin özelliklerinin arasında olan hızlı etki başlangıcı ve sirkadiyen ritim anormalliklerini düzeltmesi, uyku/uyanıklık döngüsünü geliştirmek adına belirgin bir etkinliği olduğunu göstermiştir (148).



Şekil 3.3: Agomelatinin etki mekanizması (149).

Agomelatinin ağrı üzerindeki etkinliği son zamanlarda çalışılan konulardan biri olmuştur. Bu çalışmalarda taşikardi ve prekordial ağrı ve fibromiyalji tedavisinde agomelatinin etkinliği irdelenmiştir (150-151). Gabapentin ile kombine edilmiş agomelatinin antihipersensitivite etki ürettiğinde görülmüştür (152). Bu çalışmada agomelatin (40 mg / kg ve 60 mg / kg), hem tail-clip hem de hot-plate(santral etkili yolak araştırılması) testlerinde farelerin tepki süresini önemli ölçüde uzattı, antinöseptif aktivitenin spinal ve supraspinal mekanizmalarla ilişkili olduğunu düşündürdü. Agomelatinin ağrı tedavisinde terapötik potansiyelinin olduğu ortaya çıkmıştır (153). Bu çalışmada da

agomelatinin antinosiseptif etkisi hot plate(santral etkili yolak araştırılması) ve mekanik pençe testi(periferik etkili yolak araştırılması) yöntemleriyle araştırılmış. Antinosiseptif etkisinin periferik yolak üzerinde olabileceği ve bu etkinin MT1 ve MT2 agonist ve 5-HT_{2C}'e antagonist yolaklarının sinerjik etkisi nedeniyle olabileceği ileri sürülmektedir (148). Agomelatinin nöropatik ağrı üzerindeki küratif etkisinin yükselen sinaptik katekolamin seviyeleri vasıtasıyla ve hem α hem de β -adrenoseptörleri ile etkileşimler yoluyla aracılık ettiğini düşündürmektedir (154).

3.5. Ağrı

Uluslararası Ağrı Çalışmaları Derneği (International Association for the Study of Pain) ağrıyı 'gerçek veya potansiyel doku hasarıyla ilişkili, duyuşsal ve emosyonel hoş olmayan oldukça subjektif deneyim' olarak tanımladı (155). Başka bir tanıma göre de ağrı; nörofizyolojik, biyokimyasal, psikolojik, kültürel, bilişsel ve çevresel boyutları olan çok yönlü bir tecrübedir. Bundan dolayı ağırlı bir uyarana karşı cevapta bireyden bireye değışkenlikler görölmektedir (156,157).

Çok bileşenli ve kişinin deneyimleri ile ilgili bir olgu olan ağrının başlaması, algılanması, iletimi ve ağrıya karşı verilen cevap bir dizi karmaşık mekanizmalar sonucu gelişmektedir. Ağrı, karmaşık bir olgu olmasına rağmen, sinirlerle kaplı vücut yüzeyinde ve iç organlarda, duyuşsal sinirlerdeki elektriksel aktiviteye dayanan periferik bir kökeni vardır (17). Canlı organizmalar potansiyel tehlikelerden korunmak için yakın çevrelerindeki tehlikeleri algılayan özel sistemleri vardır. Ortamdaki zararlı uyarıları algılayan bu özel yapı "nosiseptör" olarak isimlendirilmektedir. Uyarılmaları için nispeten yüksek bir eşik değere sahip olan bu nosiseptörlerin şiddetli uyarılması, periferik nosiseptif uçlarda

aksiyon potansiyellerinin oluşmasına ve bu elektriksel uyarıların uygun yolla merkezi sinir sistemine ulaşarak ağrı duyusunun oluşmasına ve bu yolla tehlikeli durumdan korunmak için cevapların ortaya çıkmasına yol açmaktadır (158).

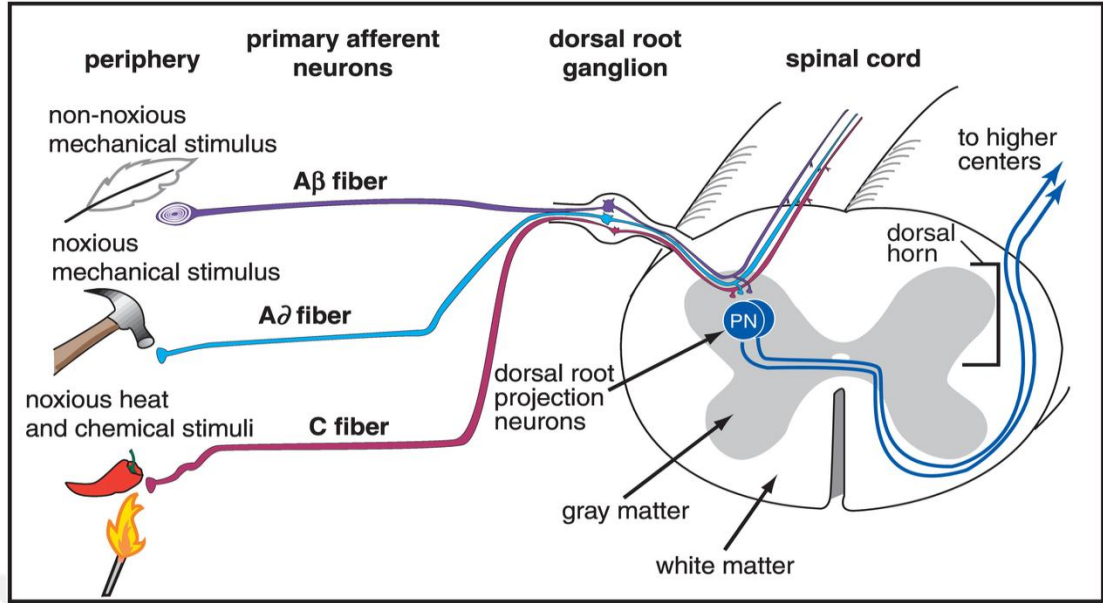
Ağrı çocukluk çağından itibaren yaşanan deneyimler ile öğrenilmektedir. Ağrıya karşı oluşan reaksiyon değişkenlik göstermektedir. Kişilik özellikleri, duygu durumu, etnik alt yapısı, geçmiş deneyimleri, ağrı ile baş edebilme becerisi ve ailenin tutumu gibi faktörler ile belirlenmektedir (159).

3.5.1. Ağrı Tipleri ve Özellikleri

Ağrı duyusunun duyu organları, vücudun hemen her noktasında bulunan çıplak sinir uçlarıdır. Ağrı dürtüleri, merkezi sinir sistemine (MSS) dorsal kök gangliyon (DKG) nöronları ile taşınmaktadır. DKG nöronları fonksiyonel olarak üç subsellüler bölüme ayrılır.

1. Ağrı duyusuna neden olan stimulusu (mekanosensitizasyon, termal sensitizasyon, nosisepsiyon) algılayan nosisseptör periferel terminal.
2. Nosisseptif sinyali ileten akson.
3. Ağrı sinyalinin ilerleyip bir sonraki nörona ve beyine ulaşmasını sağlayan presinaptik terminal.

Duyusal nöronların hücre gövdeleri üç dallıdır ve DKG'nuna yerleşmişlerdir (160). Primer duyusal nöronların morfolojik ve fonksiyonel olarak; A α / β , A δ ve C tipi lifleri bulunur (Şekil 3.4).



Şekil 3.4: Duyusal Nöron Tipleri (Kaynak 161 'den değiştirilerek alınmıştır).

Ağrı sinyalleri iletim hızlarına göre farklı tip liflerle taşınır. Hızlı ağrı sinyalleri miyelinli A δ lifleri (1.5-6.5 m/sn) ile, kronik ağrı sinyalleri ise yavaş miyelinsiz C tipi lifler (≤ 0.8 m/sn) ile medulla spinalise iletilmektedir (162, 163).

Kronik ağrılı hastalarda C tipi liflerin iletim hızının daha da düşük olduğu gösterilmiştir (164). C tipi lifler, arka köklerin lateral bölümünde yer alır ve çoğunlukla arka kök C lifleri olarak isimlendirilir (165).

Ağrının çok çeşitli sınıflandırılmaları bulunur (4). Ancak bu tezde ağrı temel olarak iki tipte incelenmiştir. 1- Nosiseptif ağrı ve 2- Nöropatik ağrı

3.5.1.1. Nosiseptif Ağrı

Fizyopatolojik olayların deride, kasta, bağ dokusunda ve iç organlarda yaygın olarak bulunan ağrı reseptörlerini (nosiseptörler) uyarmasına bağlı olarak ortaya çıkmaktadır. Somatik ve visseral ağrı olarak iki tipi vardır. Bunlar arasındaki en önemli farklılık somatik ağrının duysal lifler ile visseral ağrının ise sempatik lifler ile taşınıyor olmasıdır. Somatik ağrı, sızlama tarzında, bıçak saplanır gibi, zonklama, basınç hissi gibi ifade edilmektedir. İç organlardan

kaynaklanan ağrı, obstrüksiyona bağlı ise kemirici ve kramp şeklinde, organ kapsülü ve mezenteri etkilemişse sızlama ve zonklama şeklinde olmaktadır.

3.5.1.2. Nöropatik Ağrı

Nöropatik ağrı yaklaşık olarak populasyonun % 1'ini etkiler. Öncelikli olarak sinir sistemi lezyonu veya disfonksiyonunda meydana gelmektedir. Nöropatik ağrı lezyon veya disfonksiyonun meydana geldiği yere bağlı olarak periferik veya santral olmak üzere iki sınıfa ayrılmaktadır. Periferik nöropatik ağrıya metabolik hastalıklar neden olurken, santral nöropatik ağrıya spinal kord veya beyin hasarı neden olmaktadır (166).

Nöropatik ağrıda, ağrı spontane olarak gelişebilmektedir. Ağrı eşliği düştüğünden dolayı normalde ağrısız olan uyarı ağrı yapabilmektedir (allodini). Uyarıya cevap hem devamlı hem de amplitüd açısından abartılı olabilmektedir (hiperaljezi). Ağrı hissi sağlam bölgelere yansıyabilmektedir (156).

3.5.2. Ağrının Bastırılması (Analjezi)

Ağrıdan dolayı insanlarda oluşan reaksiyon dereceleri çok farklıdır. Bu farklı tepkiler kısmen beynin kendisinin analjezi sistemi denen bir ağrı kontrol sistemini kontrol ederek, sinir sistemine giren ağrı sinyallerini bastırabilmesine bağlıdır. Periferik ağrı lifleri ile omurilikteki arka boynuz hücreleri arasındaki kavşak bağlantıları, oldukça önemli plastisite bölgeleridir. Bu nedenle arka boynuz, ağrı dürtülerinin “kapılandığı”, yani ağrı duyusunun şiddetinin denetlendiği değişikliğe uğradığı yer anlamında olmak üzere, kapı olarak isimlendirilir. Ağrının başlatıldığı bir alandan gelen geniş çaplı afferent liflerin uyarılması ile o bölgeden gelen ağrı hafiflemektedir.

Hem C tipi hem de Aδ liflerinin dorsal boynuzda sinaps yaptıkları bölgelerde presinaptik inhibisyonuyla, analjezi sistemi ağrı sinyellerini omurilikte ilk giriş noktasından bloke edebilmektedir. Ayrıca analjezi/nosisepsiyon indüksiyonu ve homeostazinin tekrar sağlanması için Ca^{+2} kanal antagonistleri (167), proton kapılı kanal antagonistleri (111), VKSK antagonistleri (168), voltaj kapılı potasyum kanal antagonistleri (169), glutamat reseptör antagonistleri (170) ve GABA'erjik, (171), kolinerjik (172) ve opioid reseptör (173) agonistleri kullanılır.

Akut ve kronik ağrının tedavisinde analjeziklerin iki önemli sınıfı olan opioidler ve nonstereoidal anti inflamatuvar ilaçlar (NSAİİ) kullanılmaktadır (174-176).

NSAİİ' lar iki yolla etki göstermektedir:

1. Siklooksijenaz (COX)
2. Lipoksijenaz.

Lipoksijenaz yolu ile lökotrienlerin sentezi inhibe edilmektedir (177). Siklooksijenaz(COX) araşidonik asitten prostoglandinleri (PG) oluşturmaktadır. NSAİİ'lar siklooksijenazı inhibe ederek prostoglandinlerin (PG) oluşumunu azaltmakta böylelikle inflamasyonu önlemektedirler. Antipretik etkileri hipotalamusta prostaglandin E₂'nin (PGE₂) inhibisyonu ile bağlantılıdır.

Güncel olarak üç COX enzimi tanımlanmıştır (178). COX-1 yapısal olarak eksprese olmaya meyilli iken, COX-2 ise inflamasyonla oluşmaktadır. COX-1 enzimi makrofajik yapısıyla PG üretimine neden olmaktadır. COX-2 enzimi, COX-1 den farklı olarak lokal antiinflamatuvar mediyatörler ve sitokinler tarafından indüklenerek PG üretmektedir (179). Hay ve arkadaşları COX-2'nin

spinal modülasyonla akut ve kronik periferel inflamasyonda düzenleyici bir rol oynayabileceğini, ancak COX-1'in böyle bir etkisinin olmadığını ortaya çıkarmışlardır (180). NSAİİ'nin çoğu hem COX-1'i hem de COX-2'yi inhibe etmektedirler. COX-1 birçok hücrede bulunurken, özellikle kan damarlarında, midede ve böbreklerde daha fazla bulunmuştur. COX-2 insan dokularında dikkate alınacak seviyelerde bulunmamıştır. Son zamanlarda, köpek, kemirgenler ve insanlarda COX-3 belirlenmiştir. COX-3 ekspresyonu kalp, böbrek ve nöronal dokularda çok güçlüdür fakat aort da dahil olmak üzere farklı sıçan dokuları da COX-3 ekspresyonunu göstermiştir. COX-3'ün insanlardaki klinik önemi hakkında yeterli veri bulunmamaktadır (178). COX-1 inhibisyonunun NSAİİ'nin istenmeyen etkilerinin çoğundan sorumlu olduğu düşünülmektedir. İnsanda NSAİİ'nin gastrointestinal toksisite nedeninin COX-1 inhibisyonu olduğu gösterilmiştir. Bu nedenle NSAİİ'nin uzun süreli kullanımı yan etkileri nedeniyle sınırlandırılmıştır (181). Çalışmalar selektif COX-2 inhibitörleri geliştirmeyi hedeflemiştir.

Nöropatik ağrıyı opioidlerin ve NSAİİ'nin azalttığı gibi antiepileptik ilaçlar (AEİ) ve antidepresanlarda benzer şekilde ağrıyı azaltır. Özellikle kanserle ilişkilendirilmiş bazı nöropatik ağrı tiplerinde standart tedavi yöntemlerinin kullanılması oldukça güçtür. Opioidlerin veya NSAİİ'nin kullanılması çoğu zaman ağrıyı gidermek yerine hastanın dayanılmaz ağrılar çekmesine neden olabilmektedir. Bu tip ağrı tiplerinde antidepresanlar ve AEİ hem ağrıyı hem de kanserin oluşturduğu yan etkileri azaltabilmektedir.

3.5.3. Antidepresanların Analjezik Özellikleri

Sistemik olarak verilen antidepresanlar, çeşitli kronik ve nöropatik ağrı durumlarının tedavisinde insanlarda yaygın olarak kullanılmaktadır. Hayvan çalışmalarında, antidepresanların inflamatuvar ve nöropatik ağrı modellerinde nosisepsiyonun analjezik özelliklerini tetiklediği belirlenmiştir. Daha önceki çalışmalar santral etkiye (supraspinal, spinal) odaklanmış olsa da, yeni çalışmalar antidepresanların lokal periferik analjezik etkisi olduğunu gösterir. Bu periferik etkiler antidepresanların topikal formülasyonları ile analjezide alternatif tedavi seçeneği olma şansını arttırmaktadır. Antidepresanlar bir dizi farmakolojik etki gösterir; Noradrenalin ve 5 Hidroksitriptamin reuptake'ini bloke ederler, opiyat reseptörleri üzerinde direk ve indirek etkileri mevcuttur, histamin, kolinerjik, 5 hidroksitriptamin ve N Metil D aspartat reseptörlerini inhibe etmekte, iyon kanal aktivitesi ve adenosin uptake'i bloke ederler. Antidepresanların hem santral, hem de periferik analjeziye katkıları bilinir. Antidepresanların prelinik periferik analjezi etkileri ile ilgili veriler ve bunların hangi mekanizmalarla olduğu belirlenmiştir.

Antidepresanların psikotrop ajanlar olarak beyin içindeki etkilerine odaklanırsak; pek çok çalışmada serebral ventriküller içine uygulandığında direk santral analjezik etkiye neden olduğu görülmüştür. Ayrıca antidepresanlar spinal aralığa da analjezi oluşturmak için uygulanmıştır. Genel olarak, artan dozlarda motor etkilerin sınırlı olmasıyla birlikte supraspinal enjeksiyondan sonra izlenen etkinliği spinal enjeksiyona göre daha büyük olduğu gözlenmiştir. Ek olarak antidepresanların periferik etkileri dikkat çekicidir, ancak karegenin uygulanmasıyla oluşturulan inflamasyon modellerinde bir kanıt bulunmamıştır.

Hem inflamasyon, hem santral sensitizasyonu kapsayan bir persistan ağrı modelinin çalışıldığı daha yeni çalışmalarda antidepresanların periferik uygulamalarında formalin testte analjezi oluşturduğu gözlemlenmiştir. Böylece, bir dizi antidepresanın formalinle birlikte verilmesiyle, faz 2 “flinching” çekme davranışında ve yalanma davranışında belirgin bir supresyon olur. Faz 1 kaçınma davranışı da antidepresanlar tarafından baskılanmıştır. Bu tip etkilerin lokal mekanizmalar aracılığı olduğu açıktır, çünkü kontrlateral pençeye efektif dozda enjeksiyonunun etkili olmadığı gözlemlenmiştir.

Lokal antinosiseptif etkiler, bir sinir hasarıyla indüklenen ağrı modeli olan spinal sinir ligasyon modellerinde de gözlemlenmiştir. Elektrofizyolojik çalışmalar visseral ağrıda antidepresanların periferik aracılığı etkileri için ek kanıt sağlamaktadır. Antidepresanların lokal antinosiseptif veya analjezik etkilerinin olduğu açıktır, bu da bu grup ilacın topikal olarak verilebilmesini ve insanlarda periferik etkili analjezik olarak kullanılma olasılıklarını yükseltmektedir (148).

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 oluştururlar. DKG nöronları, Na⁺ kanalları (182-184) gibi ağrı ile alakalı hücresel yapıları selektif olarak eksprese etmektedirler. DKG nöronları uyarıldıklarında AP’yi ateşleyerek mesajı beyine iletmektedirler. Bu nöronlar, AP ile somatosensoryel bilgiyi merkezi sinir sistemine taşırlar. Bu nöronların iki temel tipi bulunur. Birincisi non-nosiseptif nöron grubudur. Bunlar ağrı

oluşturmayan uyarana cevap oluşturmaktadırlar. İkincisi nosiseptif nöronlardır ki bunlar da ağrı oluşturan uyarana karşı cevap oluşturmaktadırlar (162).

DKG, iletim hızlarına ve çap boyutuna göre iki şekilde sınıflandırılır. 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 alınır (186). İletim hızına göre C, A δ , A α , A β şeklinde sınıflandırılır (162). 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 arasındadır (184-185, 163). 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 sorumlulardır (184). 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 ayrılır (163). 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 almaktadırlar. A δ lifleri, orta ve küçük çaplı hücre gövdesine sahip nöronlardan köken almaktadırlar. A δ lifleri, nosisepsiyonun (mekanosensitif ya da mekanotermal) baştaki uyarısını iletirken, C lifleri ise çok az yoğunluktaki nosiseptif algıyı iletmektedir (186).

Küçük çaplı DKG nöronlarının aksonları genelde miyelinsiz C liflerinden oluşur. A α ve A β sinyalleri genelde proprioseptif sinyalleri taşımaktadırlar. Orta ve büyük çaptaki DKG hücreleri miyelinli aksonlara sahip olup düşük eşikli mekanoreseptörlerden bilgi taşımaktadırlar (186, 187). Küçük çaplı DKG nöronları genelde ağrı, kaşınma ve yanma duyularına ait bilgileri iletmektedirler. Orta ve büyük çaptaki DKG hücreleri proprioseptif sinyalleri iletirler.

	Aα GRUP I	Aβ II	Aδ III	C IV
ÇAP	13-20	6-12	1-5	0.2-1.5
HIZ	80-120	35-75	5-30	0.5-2
DUYUSAL RESEPTÖRLER	PROPRIOSEPTİFLER İSKELET KASI/	MEKANO RESEPTÖRLER	AĞRI ISI	AĞRI ISI DOKUNMA

Şekil 3.5: Sinir Lifi Tiplerinin Sınıflandırılması (1)

Algıyla ilgili uyarıları tespit eden nöronlar DKG içerisinde bulunur. Burada, nöronal hücreler vertebral kolonla birlikte spinal kolonun yan tarafına gömülüdür (184). DKG nöronları, kimyasal, mekanik ve termal uyarıları beynin ilgili bölgelerine iletmektedirler (186, 188-189). 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 ilişkiliyken (189, 160) diğer lifler ise sadece 43 °C üzerindeki sıcaklıklarda aktive olmaktadır.

DKG nöronlarında, iyon kanallarının dağılımlarının çeşitli şekilde olduğu bilinir. Na⁺ kanalları, büyük ve orta çapa sahip DKG nöronlarına göre küçük çaplı nöronlarda daha fazla sayıda eksprese olur (190). DKG nöronlarında, Ca⁺² kanallarının α_1 , $\alpha_2\delta$ (191, 192), β_3 ve β_4 (192) alt tiplerinin varlığı belirlenmiştir. Özellikle α_1 ve $\alpha_2\delta$ alt birimleri küçük ve orta çaplı DKG nöronlarında daha yoğun şekilde eksprese olur (193) ve yine β_3 ve β_4 kanallarının da küçük çaplı DKG nöronlarında yoğun şekilde varlığı belirlenmiştir (182, 192). Ayrıca DKG

nöronlarında, K_A kanallarının (194), K_{ATP} (195, 196) ve Ca^{+2} ile aktive edilen K^+ kanallarının (197) varlığı belirlenmiştir. Diğer kanallarda olduğu gibi K^+ kanalları da küçük çaplı DKG nöronlarında yoğun olarak bulunur (197). 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 kullanılırlar (184, 198). Bu nedenle DKG nöronları ağrı için “hücresel model” olarak kabul edilir.

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 protokoldür. Bu nedenle $[Ca^{+2}]_i$ düzeyinin nosiseptif/antinosiseptif etki takibi için faydalı bir model olması yönünde önem arz eder.

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

4. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu tez çalışmasında daha önceden oluşturulmuş deney protokolüne uygun olarak DKG primer hücre kültürü hazırlandı. Floresan kalsiyum görüntüleme sistemiyle bu DKG hücrelerindeki $[Ca^{+2}]_i$ miktarında meydana gelen değişimler gözlemlendi.

4.1. Sıçan Dorsal Kök Gangliyon Hücrelerinin Primer Kültürü

Bu çalışmada, ağrı çalışmaları için hücresel bir model olan DKG hücreleri enzimsel ve mekanik işlemler ile izole tek hücreler şeklinde 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 (199).

4.1.1. Kültür İçin Kullanılan Solüsyonlar ve Kimyasal Ajanlar

A) Steril Dulbeco'nun Tamponlanmış Fosfat Tuzu (PBS) (Amresco, Solon, Ohio, ABD; kalsiyum ve magnezyum içermeyen): 1 tablet PBS, 100 ml bidistile suyun içerisinde çözdürüldükten sonra 0.45 µm kalınlıktaki filtreden geçirilerek steril bir şişeye kondu. Hazırlanan PBS +4 °C'de 2 hafta boyunca saklandı ve ihtiyaç durumlarında kullanıldı.

B) 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.

C) 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.

D) 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.

E) 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.

F) 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.

G) 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.

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

I) 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.tutuldu.

4.1.2. Kültür Vasatı

5ml Penisilin/Streptomisin

Steril 10ml B27

Steril 5ml Glutamaks

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 0.45 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 tüp

Steril 15 ml polipropilen koni tüp

Steril 5 ml polipropilen koni tüp

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 uzunluğa sahip

1 tane küçük makas, 80 mm uzunluğa sahip

1 tane içi yaylı makas, ucu 12 mm uzunluğa sahip

1 tane 15 cm uzunluğa sahip forseps

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

1 tane ince uçlu eğri forseps; 0.07x0.03 mm uca ve 12 cm uzunluğa 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

Geniş bir petri kutusunda Fırat Üniversitesi Deneysel Araştırmalar Merkezi'nden temin edilen 1-2 günlük Sprague Dawley cinsi sıçanlar

dekapitasyonla öldürüldü. Küçük bir makasla vertebral kolon çıkarıldı, 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 süktroz 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, mikroinkübasyon kayıt çemberine (Warner Instruments, ABD) aktarıldı. Mikroinkübasyon-perfüzyon sistemi arasındaki bağlantı ince silikon hortum vasıtasıyla sağlandı. İlaç uygulaması esnasında perfüzyon sisteminden (Warner Instruments, ABD) (1 ml/dakika) kayıt çemberine ilaç içeren NaCl esaslı hücre dışı solüsyonunun akışı yerçekimi kuvvetiyle sağlandı. Deneylere başlamadan önce kayıt solüsyonlarının akacağı yükseklik tespit edildi. Bütün deneyler oda sıcaklığında (20-25 °C) gerçekleştirildi 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. Agomelatin Uygulaması

1 μ M, 10 μ M, 100 μ M konsantrasyonlarda agomelatin, kayıt çemberi içinde bulunan hücrelere uygulandı. İlk olarak kayıt çemberi içerisine hücreleri içeren lameller yerleştirildikten sonra perfüzyon sisteminin ince hortumu kayıt çemberi üzerine sabitlendi ve kayıt çemberi 600 μ l hücre dışı kayıt solüsyonuyla dolduruldu. Öncelikli olarak bazal seviyeyi belirlemek için en az 10'er dakika kayıtlar alındı.

4.4. Agomelatin ile Hücresel Yolak İnhibitörü Uygulaması

100 nM G protein inhibitörü pertusis toksin ve 100 µM agomelatin birlikte, 10 µM PLC inhibitörü U-73122 ve 100 µM agomelatin birlikte, 10 µM PKC inhibitörü şeletrin klorit ve 100 µM agomelatin birlikte uygulandı.

4.5. İstatistik

Veriler SPSS 16.0 istatistik programı kullanılarak istatistiksel olarak değerlendirildi. Grafikler de ise Sigma Plot 8.0 grafik programından yararlanıldı. Bütün veriler ortalama $\pm$ SS olarak sunuldu. Agomelatinin(1 µM, 10 µM ve 100 µM) konsantrasyonlarının $[Ca^{+2}]_i$ düzeyi üzerine olan doz bağımlı etkisini değerlendirmek amacıyla çift yönlü varyans analizi kullanıldı. Agomelatinin gruplar arasındaki farklılığı ortaya koyabilmek amacıyla post hoc test olarak Tukey HSD testi kullanıldı. G protein inhibitörü, PLC inhibitörü ve PKC inhibitörü uygulamalarının agomelatinin $[Ca^{+2}]_i$ düzeyi üzerine etkisini değerlendirmek amacıyla Student's t testi kullanıldı ve istatistiksel olarak $p < 0.01$ anlamlı kabul edildi.



Şekil 4.1: Kalsiyum Görüntüleme Sisteminin Genel Görünüşü.

5. BULGULAR

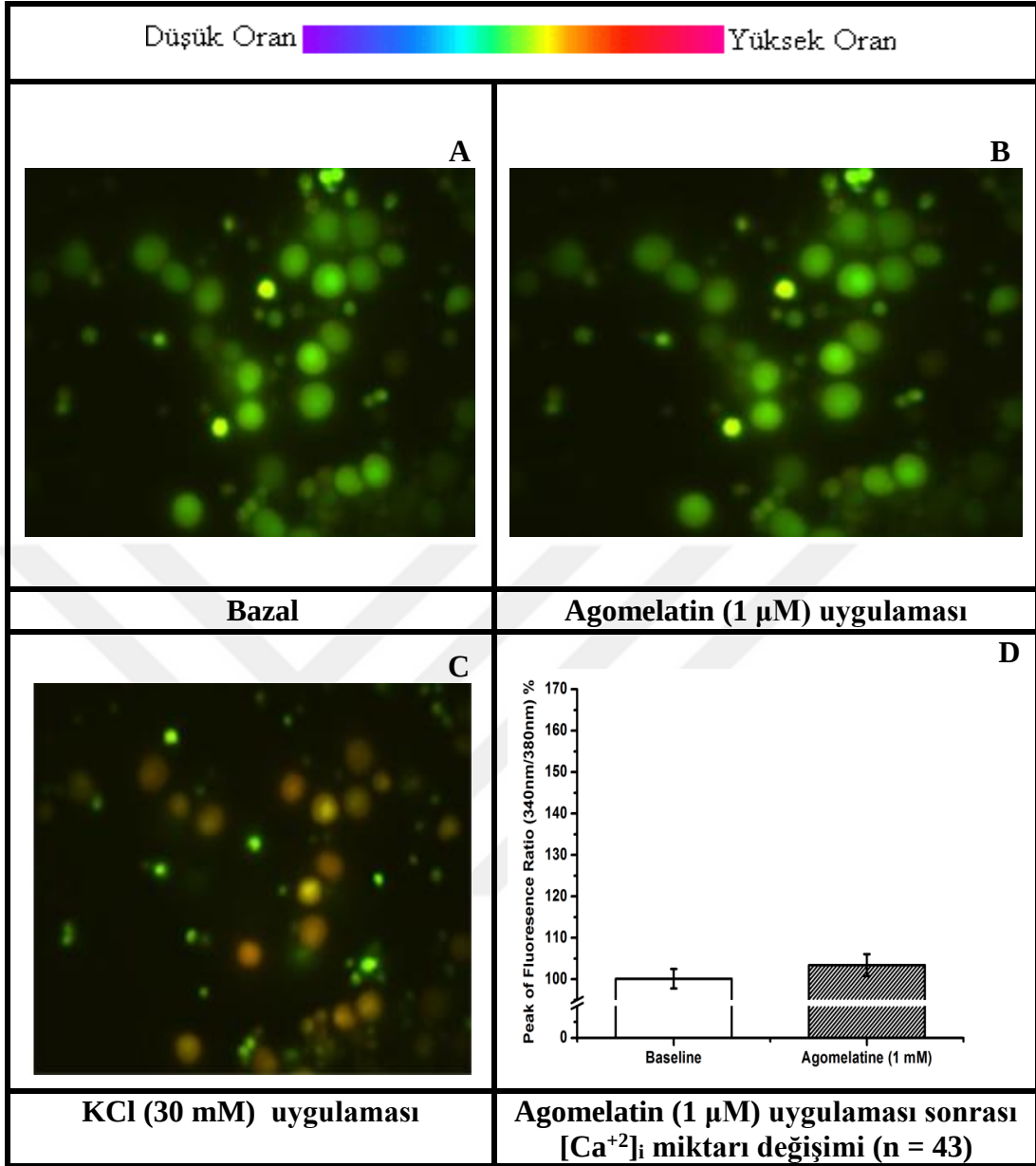
Bu tez çalışmasında yeni bir antidepresan olan agomelatinin DKG hücrelerinde $[Ca^{+2}]_i$ miktarında ne tür değişikliklere sebep olduğu ve $[Ca^{+2}]_i$ miktarındaki değişimin hangi hücresel yollarla olduğu saptandı. Kalsiyuma duyarlı floresan boya ile yüklenen DKG hücrelerinde, agomelatinin $[Ca^{+2}]_i$ miktarı üzerine etkinliğini test etmeden önce çözücü kimyasalların (hidroksi etil sellüloz (%1)) etkinliği ön kontrol deneyleri ile irdelendi. Böylece hem çözücünün olası etkinliği ortaya konuldu hem de bu “çözücü kontrol” hücre popülasyonundan benzer protokolle elde edilen veriler diğer ajanların etkisi ile istatistiksel olarak karşılaştırıldı. Bazal düzeyde Ca^{+2} sinyalleri kayıt edildikten sonra [en az 10 dakika süreyle (bu süre ön deneylerle optimum olarak belirlendi)] kullanılan miktarda çözücünün $[Ca^{+2}]_i$ düzeyi üzerine etkisinin olmadığı tespit edildi.

Ağrının hücresel modeli olan DKG nöronlarında agomelatinin hücre içi kalsiyum sinyalleşmesi üzerine etkisi incelendi. Agomelatin uygulanmadan önce (en az 10 dakika) 340 nm/380 nm floresan oranı yaklaşık olarak 0.6 ve 0.7 civarındaydı. DKG nöronlarına agomelatin uygulanmadan önce bazal seviye % 100 kabul edilerek tüm floresan oranları normalize hale getirildi. Agomelatinin (1 μ M, 10 μ M ve 100 μ M) uygulanmasıyla DKG nöronlarında $[Ca^{+2}]_i$ miktarında doz bağımlı olarak artış tespit edildi (Tablo 5.1).

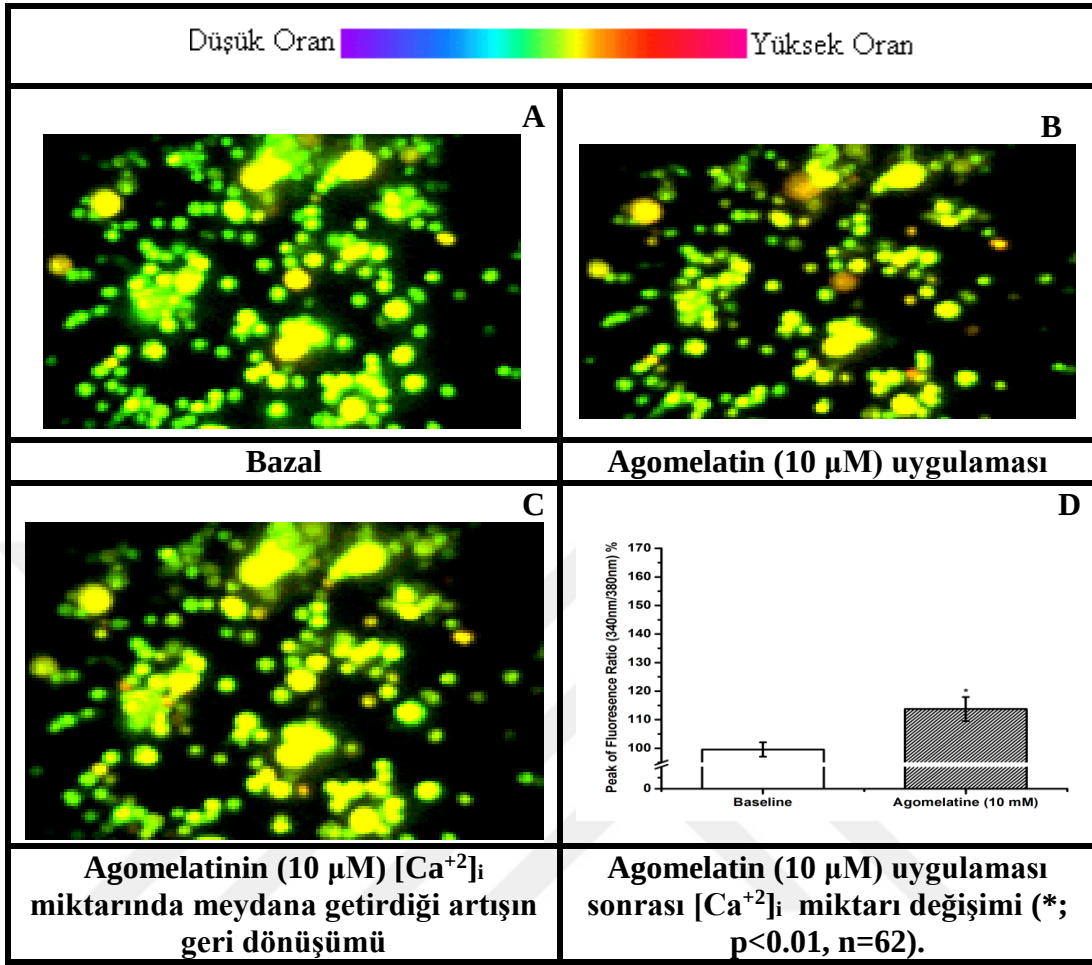
Tablo 5.1: DKG nöronlarında, agomelatinin (1, 10 ve 100 μ M) uygulamasına, $[Ca^{+2}]_i$ düzey (%) olarak 340 nm/380 nm floresan oranları) cevapları.

	Bazal(Kontrol)	Agomelatin	N	P
1 μM	100$\pm$0	103,4$\pm$2,7	43	
10 μM	100$\pm$0	113,8$\pm$4,2	62	<0.01
100 μM	100$\pm$0	161,2$\pm$6,1	48	<0.01

DKG hücrelerine agomelatinin 1 μ M uygulamasından önce hücrelerin canlılığını test etmek amacıyla hücrelere yüksek konsantrasyonlu KCl (30 mM) uygulandı. KCl uygulaması sitoplazmik serbest kalsiyum konsantrasyonunu önemli ölçüde arttırdı (Şekil 5.1). Agomelatinin 1 μ M uygulamasında sitoplazmik serbest kalsiyum konsantrasyonu 103,4 $\pm$ 2,7 düzeyine yükseldiği tespit edildi. Fakat bu değişim istatistiksel olarak anlamlı düzeyde değildi. (n=43) (Şekil 5.1).



Şekil 5.1: Dorsal kök gangliyonu nöronlarında $[Ca^{+2}]_i$ düzeyleri **A.** 1 μ M agomelatin uygulaması öncesi $[Ca^{+2}]_i$ düzeyini gösteren orijinal resim **B.** 1 μ M agomelatin uygulaması sonrası $[Ca^{+2}]_i$ düzeyini gösteren orijinal resim. **C.** KCl (30 Mm) uygulaması **D.** 1 μ M agomelatin uygulamasının DKG hücrelerindeki $[Ca^{+2}]_i$ düzeyine etkisi (n = 43)

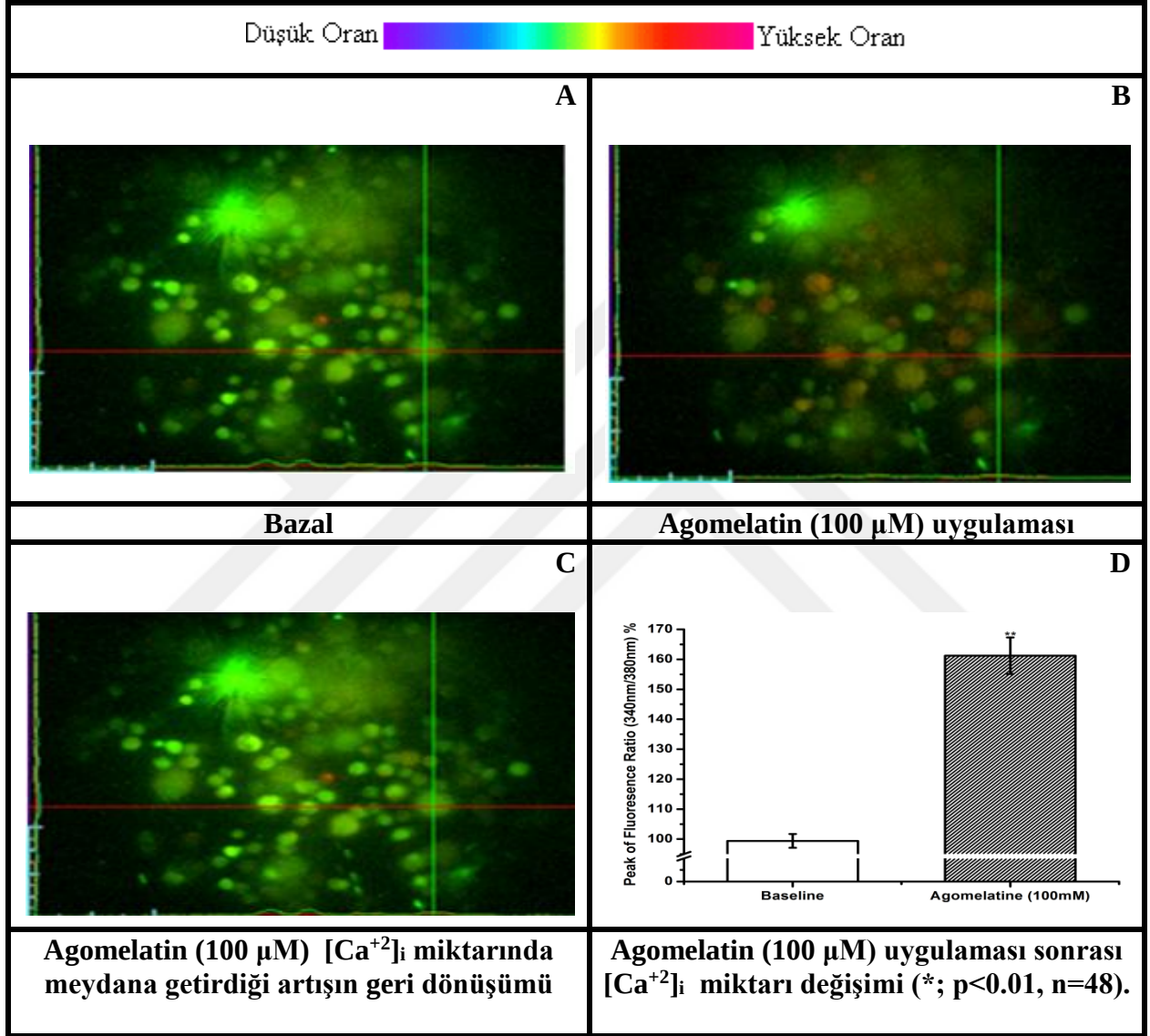


Şekil 5.2: Dorsal kök gangliyonu nöronlarında [Ca⁺²]_i düzeyleri **A.** 10 μM agomelatin uygulaması öncesi [Ca⁺²]_i düzeyini gösteren orijinal resim **B.** 10 μM agomelatin uygulaması sonrası [Ca⁺²]_i düzeyini gösteren orijinal resim. **C.** Agomelatinin (10 μM) [Ca⁺²]_i miktarında meydana getirdiği artışın geri dönüşümü **D.** Agomelatin (10 μM) uygulaması sonrası [Ca⁺²]_i miktarı değişimi (*; p<0.01, n=62).

Agomelatinin 10 μM uygulamasında sitoplazmik serbest kalsiyum konsantrasyonunun 113,8±4,2 düzeyine yükseldiği tespit edildi. Bu yükselmenin istatistiksel olarak anlamlı düzeyde olduğu belirlendi. Agomelatin meydana getirdiği bu etkinin geri dönüşümlü olduğu da tespit edildi (*; p<0.01, n=62) (Şekil 5.2).

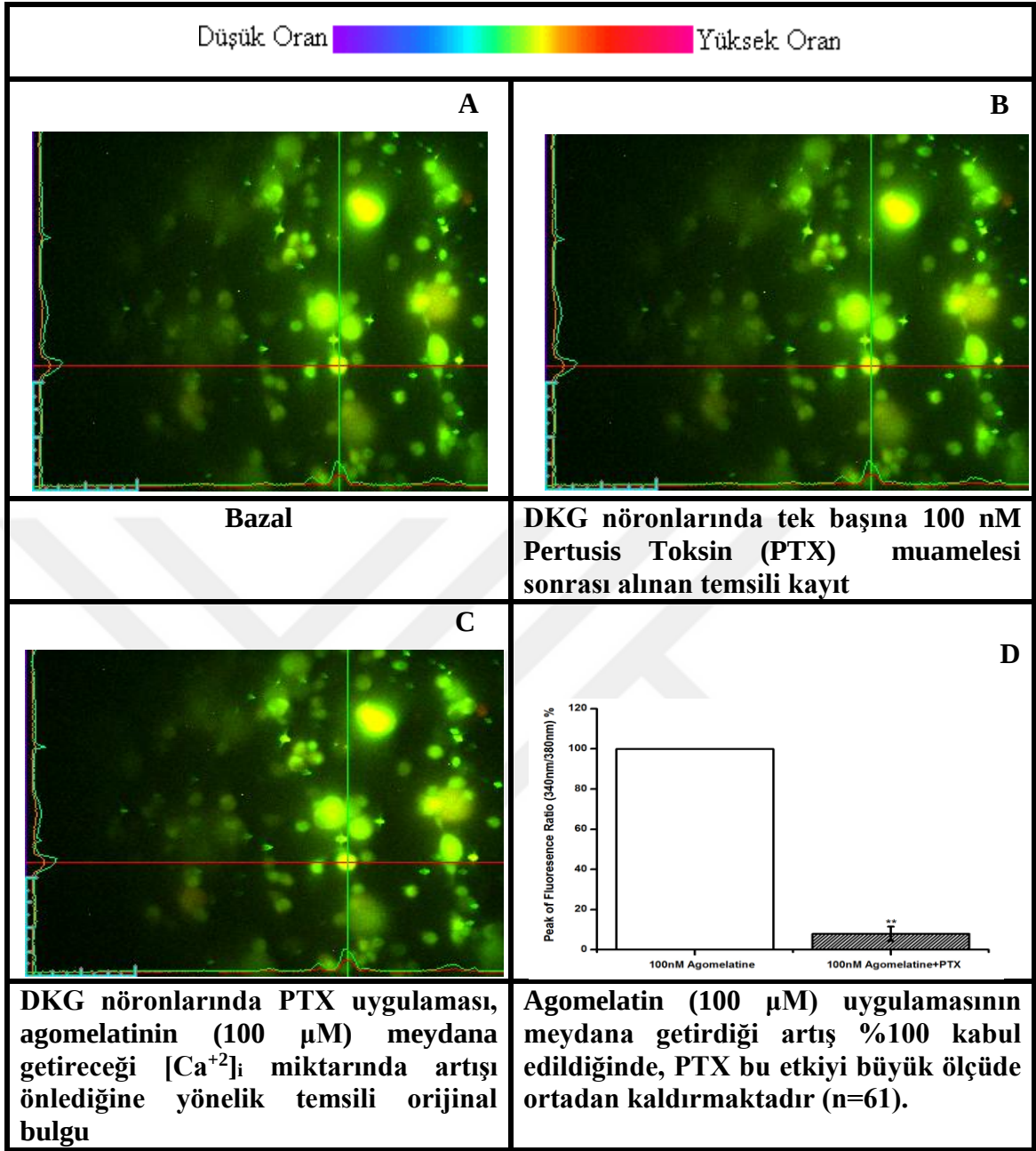
Agomelatinin 100 μM uygulamasında da sitoplazmik serbest kalsiyum konsantrasyonunun 161,2±6,1 düzeyine yükseldiği belirlendi. Bu yükselişinde

istatistiksel olarak anlamlı düzeyde olduğu tespit edildi. Aynı şekilde, agomelatinin meydana getirdiği bu etkide yine geri dönüşümlüdür (**; $p<0.001$, $n=48$) (Şekil 5.3.).



Şekil 5.3: Dorsal kök gangliyonu nöronlarında $[Ca^{+2}]_i$ düzeyleri **A.** 100 μM agomelatin uygulaması öncesi $[Ca^{+2}]_i$ düzeyini gösteren orijinal resim **B.** 100 μM agomelatin uygulaması sonrası $[Ca^{+2}]_i$ düzeyini gösteren orijinal resim. **C.** Agomelatinin (100 μM) $[Ca^{+2}]_i$ miktarında meydana getirdiği artışın geri dönüşümü **D.** Agomelatin (100 μM) uygulaması sonrası $[Ca^{+2}]_i$ miktarı değişimi (*; $p<0.01$, $n=48$).

Ağrının hücresel modeli olan DKG nöronlarında, agomelatinin (1 μ M, 10 μ M ve 100 μ M) $[Ca^{+2}]_i$ miktarını artırdığını tespit edilmesini takiben bu etkinin hangi hücresel yollar aracılığıyla olduğu belirlendi. İlk olarak agomelatinin meydana getirdiği bu etkinin G protein hücresel yolağı aracılığıyla olup olmadığını tespit etmek amacıyla G protein inhibitörü pertusis toksin (PTX) uygulandı ve agomelatinin $[Ca^{+2}]_i$ miktarında meydana getirdiği artışın G protein hücresel yolağı aracılığıyla olduğu tespit edildi (Şekil 5.5). Tek başına agomelatin (100 μ M) uygulamasının meydana getirdiği artış %100 kabul edildiğinde, dorsal kök gangliyonu nöronlarında pertusis toksin (100 nM) ile ön muamele, agomelatinin (100 μ M) meydana getirdiği $[Ca^{+2}]_i$ miktarı artışını bloklamaktadır. Meydana gelen bu inhibisyon $7,9 \pm 3,6$ düzeyindeydi (n=61, **, 0.001 < p).

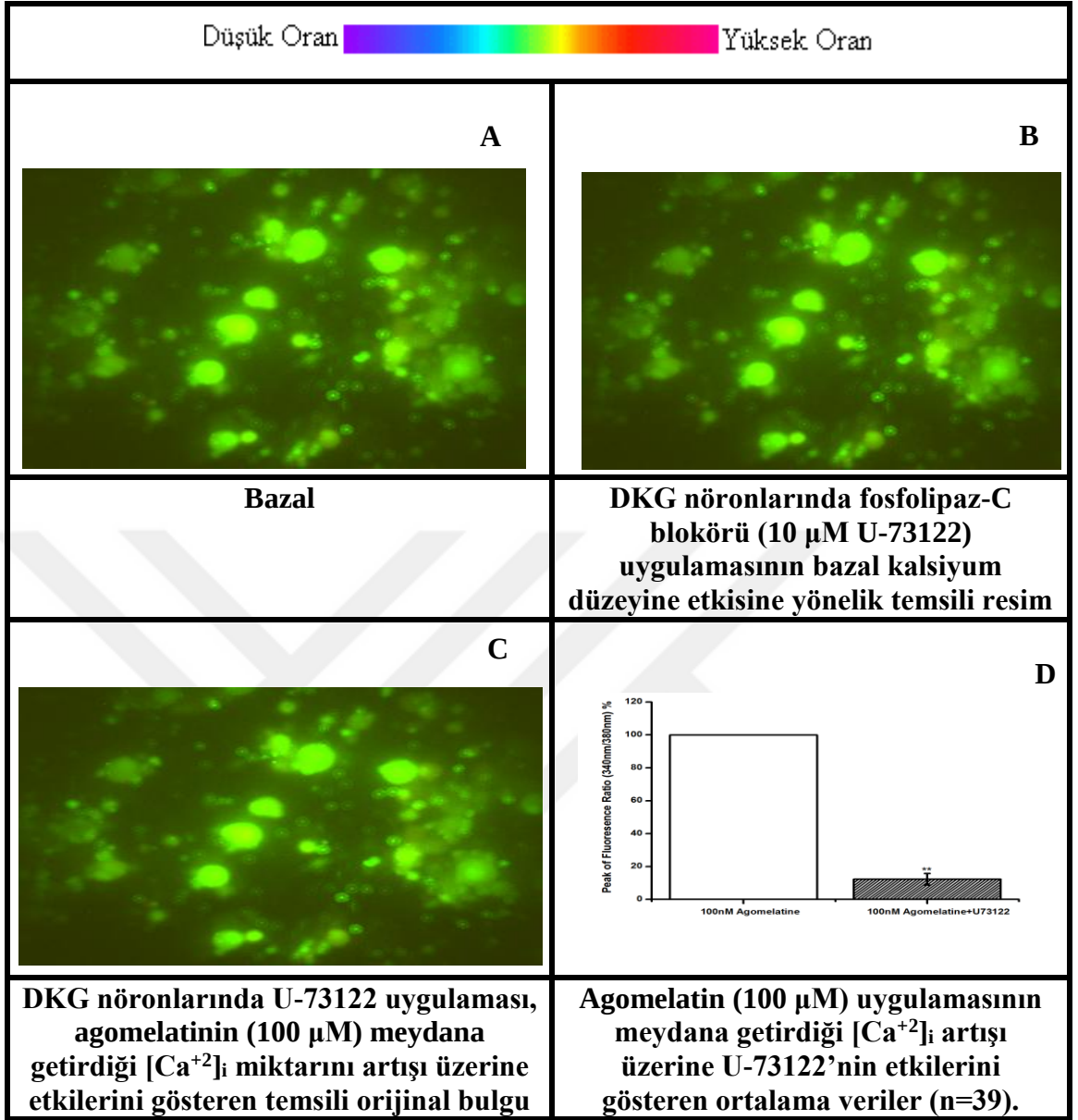


Şekil 5.4: Dorsal kök gangliyonu nöronlarında $[Ca^{+2}]_i$ düzeyleri **A.** Bazal **B.** PTX uygulaması sonrası $[Ca^{+2}]_i$ düzeyini gösteren orijinal resim. **C.** PTX muamelesi ardından 100 μM agomelatin uygulaması ile $[Ca^{+2}]_i$ düzeyini gösteren orijinal resim. **D.** Agomelatin (100 μM) uygulamasının meydana getirdiği artış %100 kabul edildiğinde, PTX'in bu etkiyi büyük ölçüde ortadan kaldırdığını gösteren grafik.

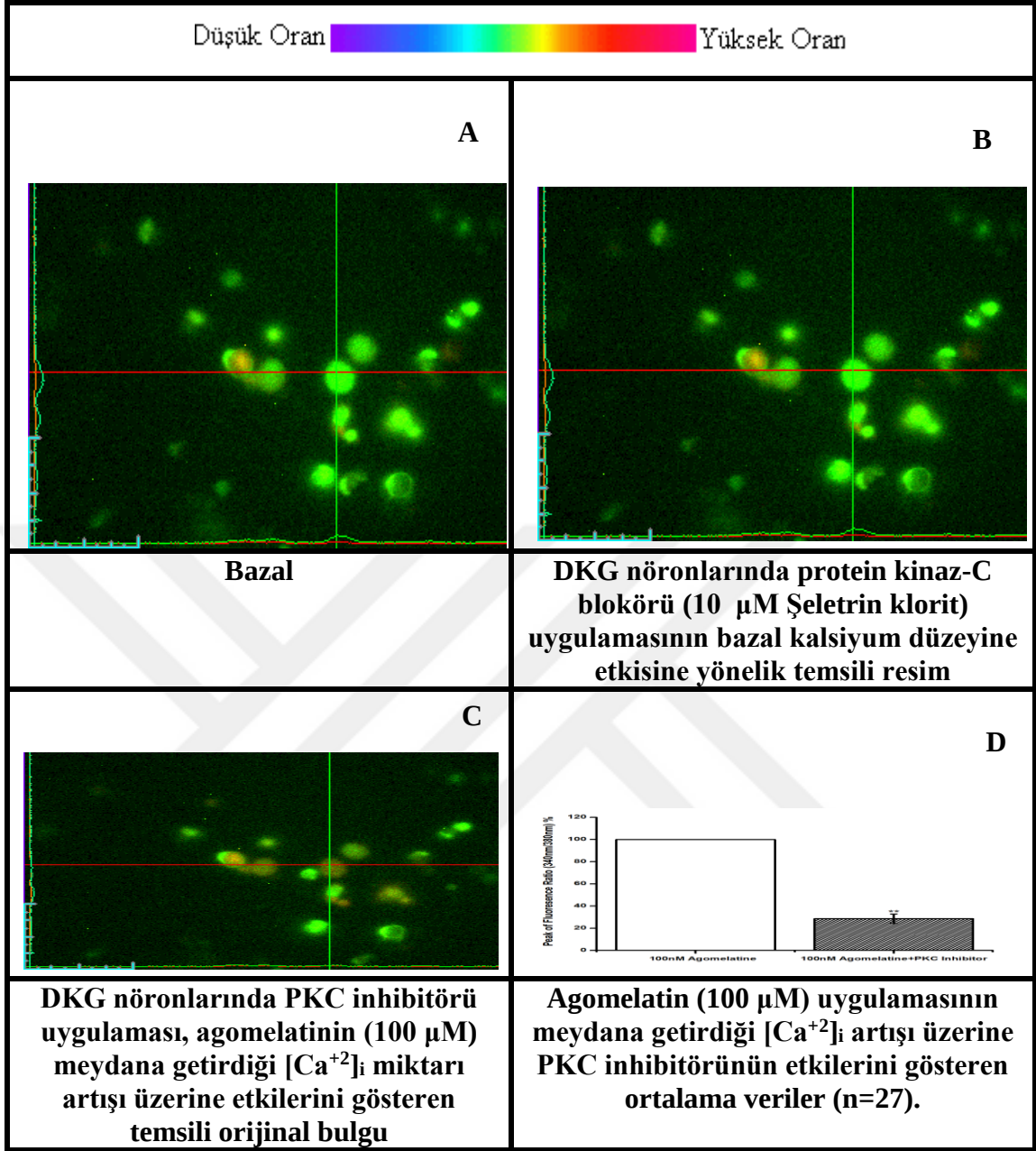
Sonrasında agomelatinin DKG nöronlarında meydana getirdiği $[Ca^{+2}]_i$ artışında fosfolipaz C (PLC) ve protein kinaz C (PKC) etkinliği sorgulandı ve agomelatinin meydana getirdiği $[Ca^{+2}]_i$ miktarındaki artışın ikinci haberci yollar üzerinden olduğu ortaya konuldu.

Bunun için agomelatin uygulanmadan önce PLC inhibitörü U-73122 uygulandı. Agomelatinin meydana getirdiği artış % 100 kabul edildiğinde 10 μ M PLC inhibitörü U-73122, 100 μ M agomelatinin $[Ca^{+2}]_i$ düzeyinde meydana getirdiği artışı önemli ölçüde azalttığı tespit edildi. Bu inhibisyon etki $12,3 \pm 3,5$ seviyesindeydi (**; $p < 0.001$, $n=39$) (Şekil 5.6).

Aynı şekilde agomelatin uygulanmadan önce PKC inhibitörü şeletrin klorit uygulandı. Agomelatinin meydana getirdiği artış % 100 kabul edildiğinde 10 μ M PKC inhibitörü şeletrin klorit, 100 μ M agomelatinin $[Ca^{+2}]_i$ düzeyinde meydana getirdiği artışı önemli ölçüde azalttığı tespit edildi. Buradaki inhibisyon etkisi de $28,6 \pm 4,2$ düzeyindeydi (**; $p < 0.001$, $n=27$) (Şekil 5.7).



Şekil 5.5: Dorsal kök gangliyonu nöronlarında $[Ca^{+2}]_i$ düzeyleri **A.** Bazal **B.** U-73122 uygulaması sonrası $[Ca^{+2}]_i$ düzeyini gösteren orijinal resim. **C.** U-73122 muamelesi ardından 100 μ M agomelatin uygulaması ile $[Ca^{+2}]_i$ düzeyini gösteren orijinal resim. **D.** Agomelatin (100 μ M) uygulamasının meydana getirdiği artış %100 kabul edildiğinde, U-73122'in bu etkiyi büyük ölçüde ortadan kaldırdığını gösteren grafik.



Şekil 5.6: Dorsal kök gangliyonu nöronlarında [Ca²⁺]_i düzeyleri **A.** Bazal **B.** Şeletrin klorit uygulaması sonrası [Ca²⁺]_i düzeyini gösteren orijinal resim. **C.** Şeletrin klorit muamelesi ardından 100 μM agomelatine uygulaması ile [Ca²⁺]_i düzeyini gösteren orijinal resim. **D.** Agomelatine (100 μM) uygulamasının meydana getirdiği artış %100 kabul edildiğinde, Şeletrin klorit'in bu etkiyi ortadan kaldırdığını gösteren grafik.

6. TARTIŞMA

Bu çalışma ile ilk defa sıçan DKG hücre kültüründe agomelatinin $[Ca^{+2}]_i$ seviyesini doz bağımlı olarak artırdığı tespit edildi. Ayrı ayrı olarak; G protein inhibitörü pertusis toksin, PLC inhibitörü U-73122 ve PKC inhibitörü şetletrin klorit muamelesi sonrasında agomelatinin $[Ca^{+2}]_i$ düzeyinde meydana getirdiği artışın baskılandığı belirlendi.

Son zamanlarda yapılan çalışmalarda, agomelatinin periferik sistemde etkili olabileceği ve seratonerjik antagonizması nedeniyle antinosiseptif etkiye sinerjik olarak katkıda bulunabileceğinin kanıtı olduğu ileri sürülebilmektedir (148). Agomelatinin farelerde nosiseptif sistem üzerinde analjezik etkinliğinin olabileceği ortaya koyulmaktadır (200). Bu da agomelatinin ağrı üzerinde etkinliğinin olabileceğini işaret etmektedir. Yine yapılan bir çalışmada, Tail flick (kuyruk çekme) ve Tail clip (kuyruk sıkıştırma) testleriyle streptozotosin enjeksiyonu ile diyabetik nöropati oluşturulan sıçanlarda 4. haftadan itibaren hiperaljezi geliştiği gözlemlendi. Agomelatin (40 mg/kg) uygulanmasıyla bu hiperaljezik yanıtın düzeldiği ortaya çıktı. Aynı çalışmada yapılan morfometrik ölçümlerde STZ ile diyabet oluşturulan grubun kontrol grubuna göre DKG nöronlarında yapısal değişiklikler olduğu ve soma çaplarının daha küçük olduğu belirlendi. Diyabetli hayvanlara uygulanan 40 mg/kg dozundaki agomeletin tedavisi sonrasında, ortalama soma çapı değerlerinde belirgin bir artış ortaya çıkmıştır (201). Agomelatinin nöropatik ağrıyı azalttığı ve antihipersensitif etki gösterdiği belirlendi (152). Tüm bu bulgular agomelatinin ağrı duyarlılaşmasını önlemede etkili bir faktör olabileceğini

göstermektedir. Ancak meydana gelen bu duyarlılaşmayı önleyici mekanizma tam olarak aydınlatılamamıştır.

Bu tez çalışmasıyla ortaya konulan bulgular, periferik ağrı iletiminde agomelatinin etkili olabileceğini ve bu etkinin hücreler mekanizmalara ait bulguları kapsadığını düşünülmektedir. Agomelatinin farklı hücre tiplerinde kalsiyum kanal aktivasyonu üzerine sadece bir çalışma bulunmaktadır. Bundan dolayı melatoninin hücre içi kalsiyum sinyalleşmesi üzerine etkisini incelediğimizde, Kumar Yadav ve ark'ları melatoninin, mevsimsel besleyici kuş olan *Perdicula asiatica*'da IP_3 'e bağlı intraselüler Ca^{+2} salınımına yol açtığını belirlemişlerdir (202). Melatonin, insan ve fare duodenum enterositlerinde de Ca^{+2} konsantrasyonunu arttırdığını tespit edildi (203). Agomelatinin PC-12 hücrelerinde apoptotik hücre ölümü ve oksidatif strese karşı faydalı olması voltaj kapılı Ca^{+2} kanallarının aktivasyonu yoluyla hücre içi Ca^{+2} düzeylerinin yükselmesine bağlı olduğunu düşündürmektedir (204). Bu bulgular bu tez çalışması ile ortaya konulan DKG nöronlarında agomelatinin $[Ca^{+2}]_i$ düzeyinde artış meydana getirme bulgusuyla uyumludur.

Melatonin, kültürlenmiş sıçan dorsal kök gangliyon nöronlarında yüksek voltaj ile aktive olan kalsiyum kanal akımlarını azaltmaktadır (205). MT1 ve MT2 hem spinal kord seviyesinde hemde supra spinal seviyede antinösedatif etki yapmaktadır. DKG nöronlarında MT2'nin artmış aktivasyonu mekanik alldini ve termal hiperaleziyi azaltmaktadır. Bu aktivasyon, DKG nöronlarında mitojenle aktifleşmiş protein kinaz (MAPK1) aracılığıyla kalsiyum sinyalleşmesini baskılamaktadır (206). Serotonin, kapsaisine duyarlı akut olarak izole edilmiş yetişkin sıçan DKG

nöronlarında yüksek eşikli Ca^{+2} kanal akımlarını inhibe etmektedir (207). İlave bir uyarıcı varlığında agomelatinin 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 aşamalarında ise agomelatinin DKG nöronlarında $[Ca^{+2}]_i$ düzeyindeki artışının hangi yollar üzerinden olduğu incelendi. G protein hücresel yolağı aracılığıyla $[Ca^{+2}]_i$ düzeyinde artış tespit edildi. Melatonin, kültürlenmiş piliç astrositlerinde $[Ca^{+2}]_i$ düzeyini arttırdığı bu artışında G protein hücresel yolağı aracılığıyla olduğu belirlendi (208). Bu bulgu agomelatinin, G protein hücresel yolağı aracılığıyla DKG nöronlarında $[Ca^{+2}]_i$ düzeyini arttırma bulgusuyla paralellik göstermektedir. G proteine bağlı reseptörler, ağrının iletimi, modülasyonu ve algılanmasında yer alan hücrelerin aktivitesinin düzenlenmesinde önemli bir rol oynamaktadır (209). Agomelatininde G protein hücresel yolağı aracılığıyla DKG nöronlarında $[Ca^{+2}]_i$ düzeyini arttırma bulgusu, agomelatinin G protein hücresel yolağı aracılığıyla ağrının iletimi, modülasyonu ve algılanmasında rol oynayabileceğini düşündürmektedir.

Agomelatinin, PKC ve PLC hücresel yolları aracılığıyla da DKG nöronlarında $[Ca^{+2}]_i$ düzeyinde artış meydana getirdiği tespit edildi. Melatonin ölümsüzleştirilmiş GT1-7 GnRH nöronlarında PKC hücresel yolağı vasıtasıyla $[Ca^{+2}]_i$ düzeyini arttırdığı bulgusu (210) bu tez çalışmasıyla ortaya konulan DKG nöronlarında $[Ca^{+2}]_i$ düzeyinde artışın PKC yolağı aracılığıyla gerçekleşmesi bulgusuyla benzerlik oluşturmaktadır. PKC izoenziminin anatomik lokalizasyonunun, ağrı sürecinde esas düzenleyici olarak rol

oynamaktadır (211). PKC aktivasyonu NMDAR'lerin harekete geçmesine sebep olmakta, dolayısıyla termal ve mekanik hiperaljeziye neden olmaktadır (212). PKC inhibitörleri, diyabetik nöropati içeren ağrılı durumların tedavisi için teröpatik yaklaşımlar olarak dikkate alınmalıdır. Melatonin, Plasmodium falciparum'un hücrelerinde PLC hücresel yolağı vasıtasıyla $[Ca^{+2}]_i$ düzeyini arttırdığı belirlenmiştir (213). Bu bulgu agomelatinin, DKG nöronlarında PLC hücresel yolağı vasıtasıyla $[Ca^{+2}]_i$ düzeyini arttırma bulgusuyla paralellik göstermektedir.

Sonuç olarak bu literatür bilgilerin ışığı altında bu tez çalışmasında, valdoksan ticari ismiyle 2009 yılında Avrupa Birliği İlaç Ajansı tarafından onaylanan yeni bir antidepresan olan agomelatinin , ağrı için hücresel model olan DKG nöronlarında doz bağımlı olarak $[Ca^{+2}]_i$ düzeyinde artış meydana getirmesi ve bu artışın periferel nosisepsiyonda rol oynayan G protein, PKC ve PLC aktivasyonları aracılığıyla olması nosiseptif iletimde agomelatinin rol oynayabileceğine işaret etmektedir.

Çalışmanın devamı hakkında düşünceler:

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

- a) Agomelatinin DKG hücrelerinde membran akımları üzerine etkileri incelenerek $[Ca^{+2}]_i$ depoları ve kalsiyum tetiklemeli kalsiyum salıverilmesi ile etkileşimini saptamak,

- b) Agomelatinin DKG hücrelerinde patch clamp tekniği çalışmaları ile membran potansiyeli ve AP parametreleri üzerine olan etkileri belirlenerek agomelatinin bu hücrelerde olası fizyolojik önemi hakkında bilgi edinmek,
- c) Agomelatinin diyabetik nöropati sonrasında oluşan sinir hasarını takiben uygulanmasının ağrı davranışı üzerine etkisini hot plate testi ile saptamak,
- d) Agomelatinin spesifik kalsiyum kanal blokörleri kullanarak hangi tip kalsiyum kanalları üzerine etkisinin olduğunu saptamak.
- e) Agomelatinin non-spesifik melatonin reseptör antagonisti luzindol kullanılarak melatonerjik yol üzerine olan etkisini 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. (2000). Textbook of medical physiology tenth edition
5. İyon Kanalları http://eubam.ege.edu.tr/kandel/Kandel_06.htm Erişim Haziran, (2017)
6. Taylor WR, Jones DT, Green NM. A method for alpha-helical integral membrane protein fold prediction. *Proteins* 1994; 18: 281-94
7. Vyklický L Sr. Ervin Neher and Bert Sakmann, 1991 Nobel Prize laureates for physiology and medicine. Ion channels and the patch clamp technic. *Cas Lek Cesk.* 1992; 7;131(2):33-41.
8. Catterall W.A. Forty Years of Sodium Channels: Structure, Function, Pharmacology, and Epilepsy. *Neurochem Res.* 2017; 7: 2314-9.
9. Luiz AP, Wood JN. Sodium Channels in Pain and Cancer: New Therapeutic Opportunities. *Adv Pharmacol.* 2016; 75: 153-78.
10. Catterall WA. From ionic currents to molecular mechanisms: the structure and function of voltage-gated sodium channels. *Neuron* 2000; 26: 13-25.
11. 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.
12. 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.
13. 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.
14. Goldin AL, Barchi RL, Caldwell JH, Hofmann F, et al. Nomenclature of voltage-gated sodium channels. *Neuron* 2000; 28: 365-368.
15. 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.
16. Hille B. *Ion Channels of Excitable Membranes*, 3rd edition. Sunderland, MA 2001: Sinauer Associates, Inc.
17. 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.
18. Olaf Pongs. Ins and outs of cardiac voltage-gated potassium channels. *Current Opinion in Pharmacology* 2009; 9: 311–315.
19. Long, S. B, Campbell E. B, and Mackinnon R. *Science* 2005; 309(5736), 897-903.

20. Choe S. Potassium channel structures. *Nature reviews. Neuroscience* 2002; 3 (2), 115–121.
21. Yellen G. The voltage-gated potassium channels and their relatives. *Nature* 2002; 419 (6902), 35–42.
22. 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.
23. 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.
24. Yuk-Man Leung. Voltage-gated K⁺ channel modulators as neuroprotective agents. Graduate Institute of Neural and Cognitive Sciences. *Life Sciences* 2010; 86: 775–780.
25. 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.
26. 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.
27. Chen Gu, Joshua Barry. Function and mechanism of axonal targeting of voltage-sensitive potassium channels. *Neurobiology* 2011; 94115-132.
28. Beck H, Clusmann H, Kral T, et al. Potassium currents in acutely isolated human hippocampal dentate granule cells. *J Physiol* 1997; 498: 73-85.
29. 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.
30. 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.
31. Jinhyun Kim and Dax A. Hoffman. Potassium Channels: Newly Found Players in Synaptic Plasticity. *Neuroscientist* 2008; 14: 276–286.
32. Coetzee WA, Amarillo Y, Chiu J, et al. Molecular diversity of K⁺ channels. *Ann N Y Acad Sci* 1999; 868: 233–85.
33. Thompson SH. Three pharmacologically distinct potassium channels in molluscan neurones. *J Physiol* 1977; 265: 465–88.
34. Clark R, Proks P. ATP-sensitive potassium channels in health and disease. *Adv Exp Med Biol* 2010; 654:165-92.
35. 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.
36. 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; 152:169-77.
37. Daniel H. Cox. Ca⁺²-regulated ion channels. *BMB reports* 2011; 44: 635-646.

38. Diana Conte Camerino, Domenico Tricarico, and Jean-François Desaphy. Ion Channel Pharmacology. *Neurotherapeutics* 2007; 184–198.
39. Dogulu F, Barun S, Emmez H, 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; 4: 380-386.
40. Johnston GA. GABAC receptors: relatively simple transmitter-gated ion channels? *Trends Pharmacol Sci.* 1996; 17: 319-323.
41. Edry-Schiller J, Ginsburg S, Rahamimoff R. A chloride channel in isolated fused synaptosomes from Torpedo electric organ. *J Physiol.* 1991; 438: 627-647.
42. Scott RH, McGuirk SM, Dolphin AC. Modulation of divalent cation-activated chloride ion currents. *Br J Pharmac.* 1988; 94: 653-662.
43. Lisa Doan, MD. Voltage-gated calcium channels and pain. *Techniques in Regional Anesthesia and Pain Management* 2010; 14, 42-47.
44. 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.
45. Catterall WA. Structure and regulation of voltage-gated Ca channels. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2000; 16: 521-544.
46. L. Lacinová. Voltage-dependent calcium channels. *Gen. Physiol. Biophys* 2005; 24; 1–78.
47. Zuccotti A, Clementi S, Reinbothe T, et al. Structural and functional differences between L-type calcium channels: crucial issues for future selective targeting. *Trends Pharmacol. Sci* 2011; 32; 366–375.
48. Catterall WA, Few AP. Calcium Channel Regulation and Presynaptic Plasticity. *Neuron* 2008; 59: 882-901.
49. 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.
50. Valentin K. Gribkoff. The role of voltage-gated calcium channels in pain and nociception. *Semin Cell Dev Biol* 2006; 17: 555-64.
51. 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.
52. Dolphin, A.C. Beta subunits of voltage-gated calcium channels. *J. Bioenerg. Biomembr* 2003; 35: 599–620.
53. Hofmann, F, Lacinova' L, and Klugbauer N. Voltage-dependent calcium channels: from structure to function. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol* 1999; 139, 33–87.
54. 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.
55. Wang MC, Dolphin A, Kitmitto A. L-type voltage-gated calcium channels: understanding function through structure. *FEBS Letters* 2004; 564; 245-25.

56. Triggle DJ. L-type calcium channels: Curr Pharm Des 2006; 12; 443-57.
57. 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.
58. Lipscombe D, Helton TD, Xu W. L-type calcium channels. The low down. J Neurophysiol 2004; 92; 2633-41.
59. 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.
60. Bell TJ, Thaler C, Castiglioni AJ, Helton TD, Lipcombe D. Cell-specific alternative splicing increases calcium channel current density in the pain pathway. Neuron 2004; 41; 127-38.
61. Miller RJ. Multiple calcium channels and neuronal function. Science 1987; 235: 46-52.
62. 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.
63. Berridge MJ, Lipp P, Bootman MD. The versatility and universality of calcium signalling. Nat Rev Mol Cell Biol 2000; 1: 11-21.
64. 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.
65. 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.
66. 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.
67. 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.
68. 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.
69. 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.
70. 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.
71. Zieglgansberger 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.
72. 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.

73. 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.
74. 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* 1989; 86: 1689-93.
75. 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.
76. 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.
77. Randall AD, Tsien RW. Contrasting biophysical and pharmacological properties of T-type and R-type calcium channels. *Neuropharmacology* 1997; 36: 879-93.
78. 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.
79. 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.
80. 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.
81. 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.
82. 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.
83. Saegusa H, Kurihara T, Zong S, et al. Altered pain responses in mice lacking α_1 E subunit of the voltage-dependent Ca₂⁺ channel. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97:6132-6137.
84. 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.
85. 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.
86. Yunkger AR, McEnery MW. Low-voltage-activated ("T-Type") calcium channels in review. *J Bioenerg Biomembr* 2003; 35: 533-575.
87. 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.

88. Huguenard JR. Low-threshold calcium currents in central nervous system neurons. *Annu Rev Physiol* 1996; 58:329-348.
89. 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.
90. Dogrul A, Gardeli LR, Ossipov MH, et al. Reversal of experimental neuropathic pain by T-type calcium channel blockers. *Pain* 2003; 105:159- 168.
91. 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.
92. Gören MZ, Filiz O. Ethosuximide: From bench to bedside. *CNS Drug Res* 2007; 13: 224-239.
93. Clapham, D.E. TRP channels as cellular sensors. *Nature* 2003; 426: 517-524.
94. Bloomquist B.T, Shortridge R.D, Schneuwly S, et al. Isolation of a putative phospholipase C gene of *Drosophila*, *norpA*, and its role in phototransduction. *Cell* 1988; 54: 723-33.
95. Hardie RC and Minke B. Phosphoinositide-mediated phototransduction in *Drosophila* photoreceptors: the role of Ca^{2+} and *trp*. *Cell Calcium* 1995; 18: 256-74.
96. Prole DL, Taylor CW. Identification of intracellular and plasma membrane calcium channel homologues in pathogenic parasites. *Plos One* 2011; 6: e26218.
97. 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.
98. 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.
99. 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.
100. Zhu, X., Jiang, M., Peyton, M., et al. TRP, a novel mammalian gene family essential for agonist-activated capacitative Ca^{2+} entry. *Cell* 1996; 85: 661-71.
101. 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.
102. Scott Earley and Joseph E. Brayden Transient receptor potential channels and vascular function. *Clinical Science* 2010; 119: 19–36.
103. 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.
104. Pedersen S.F, Owsianik G, Nilius B. *Cell Calcium* 2005; 38: 233–252.
105. Nilius B, Owsianik G, Voets T, Peters JA. Transient Receptor Potential cation channels in disease. *Physiol. Rev.* 2007; 87: 165–217.
106. Saygın M, Nazıroğlu M. Recent developments on molecular mechanisms role on activation of TRPM2 cation channels. *Journal of Experimental and Clinical Medicine* 2010; 27: 42-45.

107. Bandell M, Macpherson LJ and Patapoutian A. From chills to chilis: mechanisms for thermosensation and chemesthesis via thermoTRPs. *Neurobiology* 2007; 17: 490–497.
108. Yazğan B, Yazğan Y, Nazıroğlu M. Ağrı Moleküler Yolaklarında TRPV1 Katyon Kanalinın Önemi. *Fırat Tıp Derg/Fırat Med J* 2016; 21: 1-10
109. Alvarez DLR, Canessa CM, Fyfe GK, and Zhang P. Structure and regulation of amiloridesensitive sodium channels. *Annu Rev Physiol* 2000; 62: 573-594.
110. Chu XP, Christopher J, Papasian JQ, Wang, Zhi-Gang Xiong. Modulation of acid sensing ion channels: molecular mechanisms and therapeutic potential. *Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol* 2011; 3: 288-309.
111. Waldmann R, Bassilana F, de Weille J, Champigny G, Heurteaux C, Lazdunski M. Molecular cloning of a non-inactivating proton-gated Na⁺ channel specific for sensory neurons. *J Biol Chem*. 1997; 272: 20975-8.
112. Waldmann R, Champigny G, Bassilana F, Heurteaux C, Lazdunski M. A protogated cation channel involved in acid-sensing *Nature* 1997; 386: 173-177.
113. 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: 418-424.
114. Krishtal O. The ASICs: signaling molecules Modulators *Trends Neurosci* 2003; 26: 477-483.
115. Grifoni SC, Jernigan NL, Hamilton G, and Drummond HA. ASIC proteins regulate smooth muscle cell migration. *Microvasc Res* 2008; 75: 202-210.
116. 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: 349-354.
117. Xiong ZG, Zhu XM, Chu XP, et al. Neuroprotection in ischemia: blocking calcium-permeable Acidsensing ion channels. *Cell* 2004; 118: 687- 698.
118. 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: 6752-6757.
119. 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: 73-94.
120. Bassler EL, Ngo-Anh TJ, Geisler HS, Ruppersberg JP, and Grunder S. Molecular and functional characterization of acid-sensing ion channel (ASIC) 1b. *J Biol Chem* 2001; 276: 33782-33787.
121. 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.
122. Krishtal OA and Pidoplichko VI. A receptor for protons in the membrane of sensory neurons may participate in nociception. *Neuroscience* 1981; 6: 2599-2601.
123. 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: 1185-1190

124. 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: 229-239.
125. 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: 8992- 8997.
126. 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: 43716-43724.
127. 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: 921-928.
128. Price MP, Lewin GR, McIlwrath SL, et al. The mammalian sodium channel BNC1 is required for normal touch sensation. *Nature* 2000; 407: 1007- 1011.
129. 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: 1071-1083.
130. Page AJ, Brierley SM, Martin CM, et al. Different contributions of ASIC channels 1a, 2, and 3 in gastrointestinal mechanosensory function. *Gut* 2005; 54: 1408-1415.
131. 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: 3616-3622.
132. Ugawa S. Identification of sour-taste receptor genes. *Anat Sci Int* 2003; 78: 205-210.
133. Lin W, Ogura T, and Kinnamon SC. Acidactivated cation currents in rat vallate taste receptor cells. *J Neurophysiol* 2002; 88: 133-141.
134. 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: 5800-5809.
135. 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: 69-72.
136. 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: 1005-1012.
137. 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: 885-897.
138. 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: 734-740.
139. 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: 635-646.
140. 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- 8.

141. Friesse 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: 1483-1489.
142. 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: 734-740.
143. Sansone RA, Sansone LA. Agomelatin: yeni bir antidepresan. *Innov Clin Neurosci*. 2011; 11: 10-14.
144. Ettaoussi M, Sabaouni A, Rami M, et al. Design, synthesis and pharmacological evaluation of new series of naphthalenic analogues as melatonergic (MT1/MT2) and serotonergic 5-HT2C dual ligands. *Eur J Med Chem*. 2012; 49: 310-323.
145. Audinot V, Mailliet F, Lahaye-Brasseur C, et al. New selective ligands of human cloned melatonin MT1 and MT2 receptors. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 2003; 6: 553-561.
146. De Berardis D, Marini S, Fornaro M, et al. The melatonergic system in mood and anxiety disorders and the role of agomelatine: implications for clinical practice. *Int J Mol Sci*. 2013; 6: 12458-12483.
147. Srinivasan V, Zakaria R, Othman Z, et al. Agomelatine in depressive disorders: its novel mechanisms of action. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci*. 2012; 3: 290-308.
148. Özlem GİRAY “Agomelatinin Antinosiseptif Etki Yerinin Araştırılması” (Uzmanlık Tezi, Akdeniz Üniversitesi 2014)
149. Srinivasan V, De Berardis D, Shillcutt SD and Brzezinski A. Role of melatonin in mood disorders and the antidepressant effects of agomelatine. *Expert Opin Investig Drugs*. 2012; 21: 1503-22.
150. Bruno A, Micò U, Lorusso S et al. Agomelatine in the treatment of fibromyalgia: a 12-week, open-label, uncontrolled preliminary study. *J Clin Psychopharmacol*. 2013; 4: 507-511.
151. Comte H, Auffret M, Lelièvre B, et al. Tachycardia and precordial pain with agomelatine: a case report. *Thérapie*. 2013; 5: 324-325.
152. Chenaf C, Chapuy E, Libert F, et al. Agomelatine: a new opportunity to reduce neuropathic pain-preclinical evidence. *Pain*. 2017; 158: 149-160.
153. Kasap M and Can ÖD. Opioid system mediated anti-nociceptive effect of agomelatine in mice. *Life Sci*. 2016; 163: 55-63
154. Aydın TH, Can ÖD, Demir Özkay Ü, et al. Effect of subacute agomelatine treatment on painful diabetic neuropathy: involvement of catecholaminergic mechanisms. *Fundam Clin Pharmacol*. 2016; 30: 549-567.
155. International Association for the Study of Pain, IASP International Association for the Study of Pain: <http://www.iasp-pain.org/> Erişim Ocak, (2017)
156. Zimmermann M. Pathobiology of neuropathic pain. *Eur J Pharmacol*. 2001; 429: 23-37.

157. Sen S, Martin DP, Bacon DR. Exploring origins: was John Bonica's model of modern-day pain management influenced by John Lundy's earlier work. *Reg Anesth Pain Med*, 2007; 32: 258-262.
158. Tominaga M, Caterina MJ. Thermosensation and pain, *J.Neurobiol*, 2004; 61, 3-12.
159. Classification of chronic pain. Descriptions of chronic pain syndromes and definitions of pain terms. Prepared by the International Association for the Study of Pain, Subcommittee on Taxonomy. *Pain Suppl* 1986; 3: 1-226.
160. Julius D, Basbaum AI.. Molecular mechanisms of nociception. *Nature* 2001; 413: 203-210.
161. Chronic pain and its treatment. *Stahl's Essential Psychopharmacology* 4 th edition, chapter 10.
162. 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.
163. Harper AA, Lawson SN. Electrical properties of rat dorsal root ganglion neurones with different peripheral nerve conduction velocities *J Physiol*. 1985; 359: 47-63.
164. Orstavik K, Weidner C, Schmidt R et al. Pathological C-fibres in patients with a chronic painful condition. *Brain* 2003; 126: 567-78.
165. Anonim (2017). Basic Science of Chronic Pain. Erişim: (www.pmrehab.com/pain2.htm). Erişim tarihi 19.1.2017.
166. Anonim (2017). International Association for the study of pain. Erişim: (<http://www.iasppain.org/terms>). Erişim tarihi: 20.1.2017.
167. Prado WA. Involvement of calcium in pain and antinociception. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 2001;34: 449–461.
168. Suzuki R, Dickenson A. Neuropathic pain: nerves bursting with excitement. *Neuroreport* 2000; 11: R17–R21.
169. Park SY, Choi JY, Kim RU et al. Downregulation of voltage-gated potassium channel alpha gene expression by axotomy and neurotrophins in rat dorsal root ganglia. *Mol Cells*. 2003; 16: 256-9.
170. Suzuki R, Stanfa L, Kowaluk E et al. The effect of ABT-702, a novel adenosine kinase inhibitor, on the responses of spinal neurons following carrageenin inflammation and peripheral nerve injury. *Br. J. Pharmacol.* 2001; 132: 1615–1623.
171. Malcangio M, Bowery NG. GABA and its receptors in the spinal cord. *TIPS* 1996; 17: 457–462.
172. Decker MW, Meyer MD. Therapeutic potential of neuronal nicotinic acetylcholine receptor agonists as novel analgesics. *Biochem. Pharmacol.* 1999; 58: 917–923.
173. Pleuvry BJ, Lauretti GR. Biochemical aspects of chronic pain and its relationship to treatment. *Pharmacol. Ther.* 1996; 71: 313–324.
174. DiPalma JR, DiGregorio GJ. Management of low back and neck pain by analgesics and adjuvant drugs: an update. *Mt Sinai J Med.* 1994; 61: 193-6.

175. Max MB, Schafer SC, Culnane M, Dubner R, Gracely RH. Association of pain relief with drug side-effects in postherpetic neuralgia: a single-dose study of clonidine, codeine, ibuprofen and placebo. *Clin Pharmacol Ther.* 1988; 43: 363-71.
176. McCormack K. Non-steroidal anti-inflammatory drugs and spinal nociceptive processing. *Pain* 1994; 59: 9-43.
177. Hasçelik Z. Nonsteroid antiinflatuar ilaçlar. STED 2001
178. Ozatik FY, Kaygisiz B, Erol K. The Role of Cyclooxygenase Enzymes in the Effects of Losartan and Lisinopril on the Contractions of Rat Thoracic Aorta. *Eurasian J Med.* 2017; 49: 16-21.
179. Arias-Negrete SS, Kelley K, Chadee K. Proinflammatory cytokines regulate cyclooxygenase-2 mRNA expression in human macrophages. *Biochem Biophys Res Commun.* 1995; 208: 582–589.
180. Hay CH, Trevethick MA, Wheeldon A, Bowers JS, de Belleruche JS. The potential role of spinal cord cyclooxygenase-2 in the development of Freund's complete adjuvant-induced changes in hyperalgesia and allodynia. *Neuroscience* 1997; 78: 843– 850.
181. Warner TD, Giuliano F, Vojnovic I et al. Nonsteroid drug selectivities for cyclo-oxygenase-1 rather than cyclo-oxygenase-2 are associated with human gastrointestinal toxicity: a full in vitro analysis *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999; 96: 7563-7568.
182. 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.
183. 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.
184. 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
185. Harper AA & Lawson SN. Conduction velocity is related to morphological cell type in rat dorsal root ganglion neurones. *J Physiol* 1985; 359: 31–46.
186. Miller RJ, Jung H, Bhangoo SK, and. White FA. Cytokine and Chemokine Regulation of Sensory Neuron Function. *Handb Exp Pharmacol* 2009; 194: 417–449
187. Woolf CJ, Shortland P, Coggeshall RE. Peripheral nerve injury triggers central sprouting of myelinated afferents. *Nature* 1992; 355: 75-8.
188. Scott, S.A. *Sensory Neurons; Diversity, Development, and Plasticity* New York: Oxford University Press. 1992.
189. Peier A.M, Moqrich A, Hergarden AC et al. A TRP Channel that Senses Cold Stimuli and Menthol. *Cell.* 2002; 108: 705-715.
190. 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.

191. Luo ZD, Chaplan, SR, Higuera, ES 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.
192. Li L, Cao XH, Chen S 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.
193. 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.
194. Duan KZ, Xu Q, Zhang XM et al. Targeting A-type K(+) channels in primary sensory neurons for bone cancer pain in a rat model. *Pain* 2011.
195. 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: 271-4.
196. 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: 431-43.
197. 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
198. Vyklícký L, Knotkova-Urbancova H. Can sensory neurones in culture serve as a model of nociception. *Physiol Res* 1996; 45: 1-9.
199. 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. *Devl Brain Res* 1985; 22: 55–65.
200. Kivrak Y, Karademir B, Aygun H et al. The Effect of Agomelatine on the Nociceptive System. *Bulletin of Clinical Psychopharmacology.* 2016; 24:3, 220-225.
201. Meral GEDİMAN “Diyabetik Sıçanlarda Agomelatin Uygulamasının Nöropatik Ağrı ve Nosiseptif Nöronlar Üzerindeki Etkilerinin Karşılaştırılması” (Yüksek Lisans Tezi, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi 2016).
202. Kumar Yadav S, Halder C, Kumar Singh S et al. Melatonin regulates splenocytes proliferation via IP3-dependent intracellular Ca²⁺ release in seasonally breeding bird, *Perdicula asiatica*. *J Recept Signal Transduct Res.* 2014; 34: 233-40.
203. Sjöblom M, Säfsten B, Flemström G. Melatonin-induced calcium signaling in clusters of human and rat duodenal enterocytes. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2003; 284:1034-44.
204. Akpınar A, Uğuz AC, Nazıroğlu M. Agomelatine and Duloxetine Synergistically Modulates Apoptotic Pathway by Inhibiting Oxidative Stress Triggered Intracellular Calcium Entry in Neuronal PC12 Cells: Role of TRPM2 and Voltage-Gated Calcium Channels. *The Journal of Membrane Biology.* 2014; 247: 5, 451–459.

205. Ayar A, Martin DJ, Özcan M et al. Melatonin inhibits high voltage activated calcium currents in cultured rat dorsal root ganglion neurones. *Neurosci Lett*. 2001; 313(1-2): 73-7.
206. Lin JJ, Lin Y, Zhao TZ et al. Melatonin Suppresses Neuropathic Pain via MT2-Dependent and -Independent Pathways in Dorsal Root Ganglia Neurons of Mice. *Theranostics*. 2017; 7: 2015-2032.
207. DelMarLP, CardenasCG, ScroggsRS. Serotonin inhibits high threshold Ca^{2+} channel currents in capsaicin-sensitive acutely isolated adult rat DRG neurons. *J Neurophysiol*. 1994; 72: 2551-4.
208. Peters JL, Cassone VM, Zoran MJ. Melatonin modulates intercellular communication among cultured chick astrocytes. *Brain Res*. 2005; 1031:10-9.
209. Oladosu FA, Maixner W, Nackley AG. Alternative Splicing of G Protein Coupled Receptors: Relevance to Pain Management. *Mayo Clin Proc*. 2015; 8: 1135-51.
210. Kelestimur H, Ozcan M, Kacar E et al. Melatonin elicits protein kinase C-mediated calcium response in immortalized GT1-7 GnRH neurons. *Brain Res*. 2012; 1435: 24-8.
211. Velázquez KT, Mohammad H, Sweitzer SM. Protein kinase C in pain: involvement of multiple isoforms. *Pharmacol Res* 2007; 55: 578-589.
212. Bu F, Tian H, Gong S et al. Phosphorylation of NR2B NMDA subunits by protein kinase C in arcuate nucleus contributes to inflammatory pain in rats. *Sci Rep*. 2015; 5: 15945.
213. Beraldo FH, Almeida FM, da Silva AM et al. Cyclic AMP and calcium interplay as second messengers in melatonin-dependent regulation of *Plasmodium falciparum* cell cycle. *J Cell Biol*. 2005; 170: 551-7.

8. ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Batuhan BİLGİN

Doğum Yeri ve Tarihi: Eminönü/ İSTANBUL 1990

Eğitimi:

Elazığ Dumlupınar İlköğretim Okulundan 2001 yılında mezun oldu.

Elazığ Mezre İlköğretim Okulundan 2004 yılında mezun oldu.

Ahmet Kabaklı Anadolu Öğretmen Lisesinden 2008 yılında mezun oldu.

Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi Sağlık Yüksekokulundan 2013 yılında “Fizyoterapist” olarak mezun oldu.

Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyofizik Anabilim Dalında 2015 yılında yüksek lisans eğitimine başladı.

Çalıştığı Kurumlar:

Özel Telepati Özel Eğitim ve Rehabilitasyon Merkezi (2013-2017)

Fırat Üniversitesi Hastanesi (2017-devam ediyor)