

**T. C.  
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
TIBBİ FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI**

**MERKEZİ YOLLA UYGULANAN CDP-KOLİN'İN ANALJEZİK ETKİSİNDE  
NUKLEUS RAFFE MAGNUSUN ROLÜ**

**Kübra Merve ÜLKAN**

**(YÜKSEK LİSANS TEZİ)**

**Bursa-2015**



T. C.  
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
TIBBİ FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI

MERKEZİ YOLLA UYGULANAN CDP-KOLİN'İN ANALJEZİK ETKİSİNDE  
NUKLEUS RAFAE MAGNUSUN ROLÜ

Kübra Merve ÜLKAN

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

Danışman: Prof. Dr. Mine Sibel GÜRÜN

Bursa-2015

## SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ'NE

.....  
Anabilim Dalı Yüksek Lisans/Doktora öğrencisi ..... tarafından hazırlanan  
.....konulu Yüksek Lisans/Doktora  
tezi ...../...../.....günü, .....-..... saatleri arasında yapılan tez savunma  
sınavında jüri tarafından oybirliği/oyçokluğu ile kabul edilmiştir.

**Adı-Soyadı**

**İmza**

**Tez Danışmanı**

Üye

Üye

Üye

Üye

Bu tez Enstitü Yönetim Kurulu'nun ..... tarih ve  
..... sayılı toplantısında alınan ..... numaralı kararı ile  
kabul edilmiştir.

## İÇİNDEKİLER

TÜRKÇE ÖZET.....	III
İNGİLİZCE ÖZET.....	IV
GİRİŞ.....	1
GENEL BİLGİLER.....	2
Nukleus Rafe Magnus.....	2
Anatomi.....	2
Fonksiyonları.....	2
Bağlantıları.....	3
Afferent Bağlantılar.....	3
Efferent Bağlantılar.....	4
Nukleus Rafe Magnus ve Ağrı.....	4
Ağrı ve Analjezi.....	10
Ağrı Mekanizmaları ve İletimi.....	10
Akut Ağrı.....	13
Akut Ağrı Modeli.....	14
Kolinergic Sistem ve Ağrı.....	15
CDP-kolin'in Genel Özellikleri.....	16
CDP-kolin'in Yapısı ve Sentezi.....	16
CDP-kolin'in Metabolizması ve Metabolitleri.....	18
Kolin.....	19
Sitidin ve Üridin.....	20
CDP-kolin'in Etkileri ve Tedavide Kullanımı.....	21
CDP-kolin ve Ağrı.....	23
GEREÇ ve YÖNTEM.....	24
Cerrahi ve Deneysel İşlemler.....	24
Kanül İmplantasyonu.....	24
İntra-NRM Kanül ve Mikrodiyaliz Probu Yerleşiminin Histolojik Olarak	
Doğrulanması.....	25
Akut Ağrı Modeli.....	26
Deney Planı.....	26
CDP-kolin'in Akut Ağrı Üzerine Etkisinin Değerlendirilmesi.....	27
Mekanik Pençe Çekme Testi.....	27

İlaçlar ve Mikroenjeksiyon.....	28
İntraserebroventriküler Yolla Uygulanan CDP-kolin'in NRM'taki ACh ve Kolin Seviyeleri Üzerine Etkisinin Değerlendirilmesi.....	28
In vivo Mikrodiyaliz.....	29
İstatistiksel Değerlendirmeler.....	30
<b>BULGULAR.....</b>	<b>31</b>
İntraserebroventriküler Yolla Uygulanan CDP-kolin'in Akut Ağrıdaki Analjezik Etkisinde NRM'a Uygulanan Kolinerjik Reseptör Antagonist Ön Tedavilerinin Etkisi.....	31
İntraserebroventriküler Yolla Uygulanan CDP-kolin'in Akut Ağrıdaki Analjezik Etkisinde NRM'a Uygulanan Nalokson Ön Tedavisinin Etkisi.....	34
İntraserebroventriküler Yolla Uygulanan CDP-kolin'in Akut Ağrıdaki Analjezik Etkisinde NRM'a CGP-35348 Ön Tedavisinin Etkisi.....	35
İntraserebroventriküler Yolla Uygulanan CDP-kolin'in Akut Ağrıdaki Analjezik Etkisinde NRM'a Uygulanan Metiserjid Ön Tedavisinin Etkisi.....	36
İntraserebroventriküler Yolla Uygulanan CDP-kolin'in NRM'taki Asetilkolin ve Kolin Konsantrasyonu Üzerine Etkisi.....	37
<b>TARTIŞMA ve SONUÇ.....</b>	<b>39</b>
<b>KAYNAKLAR.....</b>	<b>44</b>
<b>TEŞEKKÜR.....</b>	<b>61</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ.....</b>	<b>62</b>

## ÖZET

Ağrının kontrol edilmesi sürecinde santral kolinerjik sistem ve nikotinik asetilkolin reseptör (nAChR) alttıplerinin önemli rolleri bulunmaktadır. Laboratuvarımızda sitidin 5-difosfokolin (CDP-kolin) kullanılarak yapılan ağrı çalışmalarında da bu bulgu desteklenmiş ve CDP-kolin'in analjezik ve antihiperalezik etkisine santral  $\alpha 7$  nAChR'lerin aracılık ettiği ortaya konmuştur. Buna ek olarak beyin sapında yer alan Nukleus Rafe Magnus (NRM), kolinerjik innervasyon açısından zengin bir bölge olup, stratejik yerleşimi ve bağlantıları sebebiyle başta ağrı modülasyonu olmak üzere önemli fonksiyonlara sahiptir. Bu nedenle mevcut çalışma CDP-kolin'in intraserebroventriküler (i.s.v.) yolla uygulandığında meydana getirdiği analjezide NRM'un olası rolünü ve analjezik etkinin mekanizmasını aydınlatmak üzere planlanmıştır. Bu amaçla sıçanlarda akut ağrı modelinin kullanıldığı çalışmamızda NRM içine uygulanan kolinerjik, opioidlerjik, gabaerjik ve serotonerjik antagonistlerin i.s.v. yolla uygulanan CDP-kolin'in analjezik etkisini değiştirip değiştirmediğine bakılmıştır. Ayrıca i.s.v. yolla uygulanan CDP-kolin'in NRM bölgesinde asetilkolin (ACh) ve kolin miktarı üzerine olan etkisi de mikrodializ çalışması yapılarak araştırılmıştır. Çalışmadan elde ettiğimiz bulgulara göre i.s.v yolla uygulanan CDP-kolin'in akut ağrı modelindeki analjezik etkisi NRM'da uygulanan nonspesifik nikotinik reseptör antagonisti mekamilamin, spesifik  $\alpha 7$  nikotinik reseptör antagonisti metillikakonitin (MLA), nonspesifik opioid reseptör antagonisti nalokson, spesifik GABA<sub>B</sub> reseptör antagonisti CGP-35348 ve nonspesifik serotonerjik reseptör antagonisti metiserjid ön tedavileri ile önlenirken, nonspesifik muskarinik reseptör antagonisti atropin ön tedavisi bu etkiyi değiştirmemiştir. Buna ek olarak NRM'taki ekstraselüler kolin seviyesi i.s.v CDP-kolin uygulamasını takiben artmıştır. Sonuç olarak i.s.v. yolla uygulanan CDP-kolin'in akut ağrıdaki analjezik etkisinde NRM'un ve burada yer alan  $\alpha 7$  nAChR'leri ile birlikte opioidlerjik, gabaerjik ve serotonerjik reseptörlerin rolü ilk defa bu çalışma ile gösterilmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** CDP-kolin, Nukleus Rafe Magnus, akut ağrı, analjezi.

## SUMMARY

Central cholinergic system and nicotinic acetylcholine receptor (nAChR) subtypes play significant roles in the process of pain control. These findings have been supported by pain studies in our laboratory in which we demonstrated the mediation of central nAChRs in analgesic and antihyperalgesic effects of CDP-choline. In addition, Nucleus Raphe Magnus (NRM), a region with dense cholinergic innervation which is localized to brainstem, has important functions including pain modulation, due to its strategic location and presence of connections. Therefore, the present study was designed to identify the possible role of NRM in analgesia elicited by intracerebroventricularly (icv) -administered CDP-choline and the underlying mechanism of its analgesic effect. For this purpose, we investigated whether or not cholinergic, opioidergic, GABAergic and serotonergic antagonists microinjected into NRM alter the analgesic effects of CDP-choline (icv) in the acute pain model in rats. The effect of CDP-choline (icv) on acetylcholine (ACh) and choline concentrations in NRM was analyzed by in vivo microdialysis study, as well. We found that the analgesic effect of icv-administered CDP-choline in acute pain model was prevented by pretreatments with the nonspecific nicotinic receptor antagonist mecamilamine, the specific  $\alpha 7$  nicotinic receptor antagonist methyllycaconitin (MLA), the nonspecific opioidergic receptor antagonist naloxone, the specific GABA<sub>B</sub> receptor antagonist CGP-35348 and the nonspecific serotonergic receptor antagonist methysergide microinjected into the NRM, while pretreatment with the nonspecific muscarinic receptor antagonist atropin microinjected into the NRM did not alter CDP-choline's effect. In addition, extracellular choline concentrations in NRM were increased after icv CDP-choline administration. In conclusion, our study shows for the first time the role of NRM and  $\alpha 7$  nAChRs with opioidergic, GABAergic and serotonergic receptors located in the NRM in analgesic effect of intracerebroventricularly-administered CDP-choline in acute pain model.

**Key words:** CDP-choline, Nucleus Raphe Magnus, acute pain, analgesia

## GİRİŞ

Kolinerjik sistemin ve nAChR alttiplerinin ağrı regülasyonundaki rolü uzun zamandan beri bilinmektedir (1-4). Asetilkolin prekürsörü olan kolinin  $\alpha 7$  nAChR'lerinin aracılığı ile analjezide rol aldığı gösterilmesinin ardından nAChR'leri ilaç araştırmalarında potansiyel bir hedef haline gelmiştir (5-6). Bizim laboratuvarımızda da yapılan çalışmalarda deney hayvanlarına santral ve periferik yoldan uygulanan CDP-kolin'in farklı ağrı modellerinde güçlü analjezik ve antihiperalezik etki meydana getirdiği ve CDP-kolin'in söz konusu etkisine  $\alpha 7$  nAChR'lerinin aracılık ettiği ortaya konmuştur (7-10).

Beyin sapındaki çekirdeklerden spinal kordun dorsal boynuzuna inen yolakların nosiseptif (ağrı) iletinin inhibisyonunda rol oynadığı bilinmektedir (11). Analjezik inen yolaklar, fizyolojik (12) veya farmakolojik yolla aktive edilebilir (13). Nukleus rafe magnus da, beyin sapındaki rostral ventromedial medulla (RVM)'da yer alır ve buradan spinal korda projekte olan aksonlar spinal kordun dorsal boynuzunda sonlanır (14-15). Kolinerjik innervasyon açısından zengin bir bölge olan NRM (16-20), hem stratejik yerleşimi hem de inen, çıkan ve horizontal yolaklar sayesinde afferent ve efferent bağlantılara sahip oluşu (21-31) nedeniyle önemli ve çeşitli fizyolojik rollere sahiptir (32). Homeostatik regülasyonda önemli bir yere sahip olan NRM'un en önemli fonksiyonu ağrının inhibisyonudur (33).

Akut ağrı, mevcut bir doku hasarını takiben oluşan bir tablodur ve günümüzde akut ağrı tedavisi için yeni, güvenli ve etkin analjezik ilaçların geliştirilebilmesi için moleküler hedef arayışı artarak devam etmektedir (1,34-37). Biz de analjezik etkisini ve etki mekanizmasını farklı ağrı modellerinde ortaya koyduğumuz CDP-kolin'in merkezi yolla uygulanmasını takiben, analjezide önemli bir merkez olan NRM'un rolünü akut ağrı modeli kullanarak araştırmayı hedefledik.

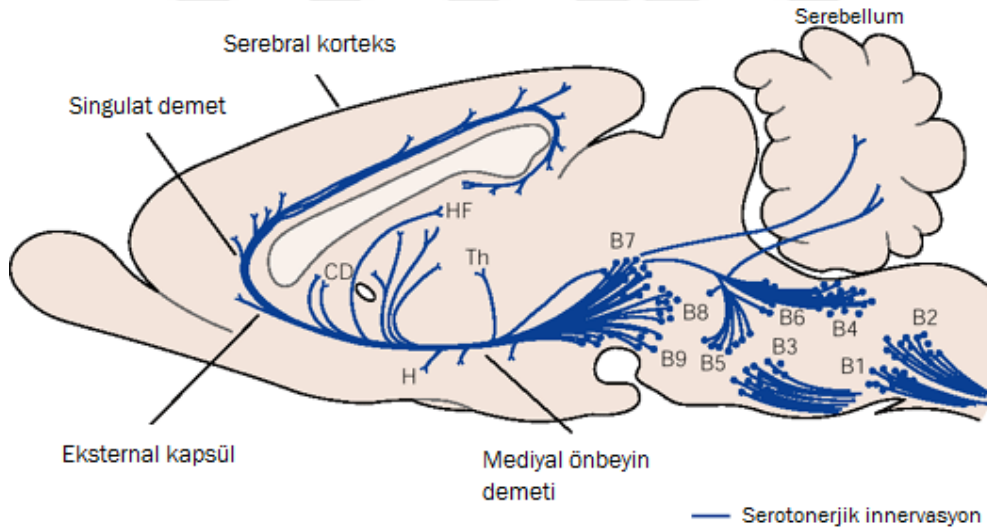


## GENEL BİLGİLER

### 1. Nukleus Rafe Magnus

#### 1.1. Anatomi

Dahlsström ve Fuxe sıçan beyin sapındaki hücreleri B1'den B9'a kadar olmak üzere alt gruplara ayırmıştır (38). Buradaki serotonerjik nöronlar rostral ve kaudal olmak üzere iki grup olup santral sinir sisteminde farklı hedef bölgelere projeksiyon yaparlar (39-41). Telensefalon ve diensefalonda sonlanan çıkan sinir liflerine sahip olan B4-B9 hücre grupları rostral grubu oluştururken; B1-B3 hücre grupları kaudal grubu oluşturur ve bu hücre grupları beyin sapının ve spinal kordun aşağı seviyelerine inen projeksiyonlar yapar (41-42). Çoğunlukla B3 hücrelerinden oluşan NRM, RVM'da yer alan üç çekirdekten biri olup magno- ve parvoselüler nöronlar içerir (Şekil-1) (43-44). Rostral NRM (rNRM), motor trigeminal nükleusun rostral kutbundan fasyal sinirin kaudal ucuna doğru rostrakaudal olarak uzanır. Kaudal NRM (cNRM) ise NRM'un rostrakaudal seviyeden başlayarak fasyal nükleusun kaudal kısmına uzanan parçasıdır (45). Kaudal NRM'un, rNRM'a göre daha az serotonerjik nöron içerdiği bilinmektedir (46).



Şekil-1: B3 hücre grubunun (Nukleus rafe magnusun) yerleşimi

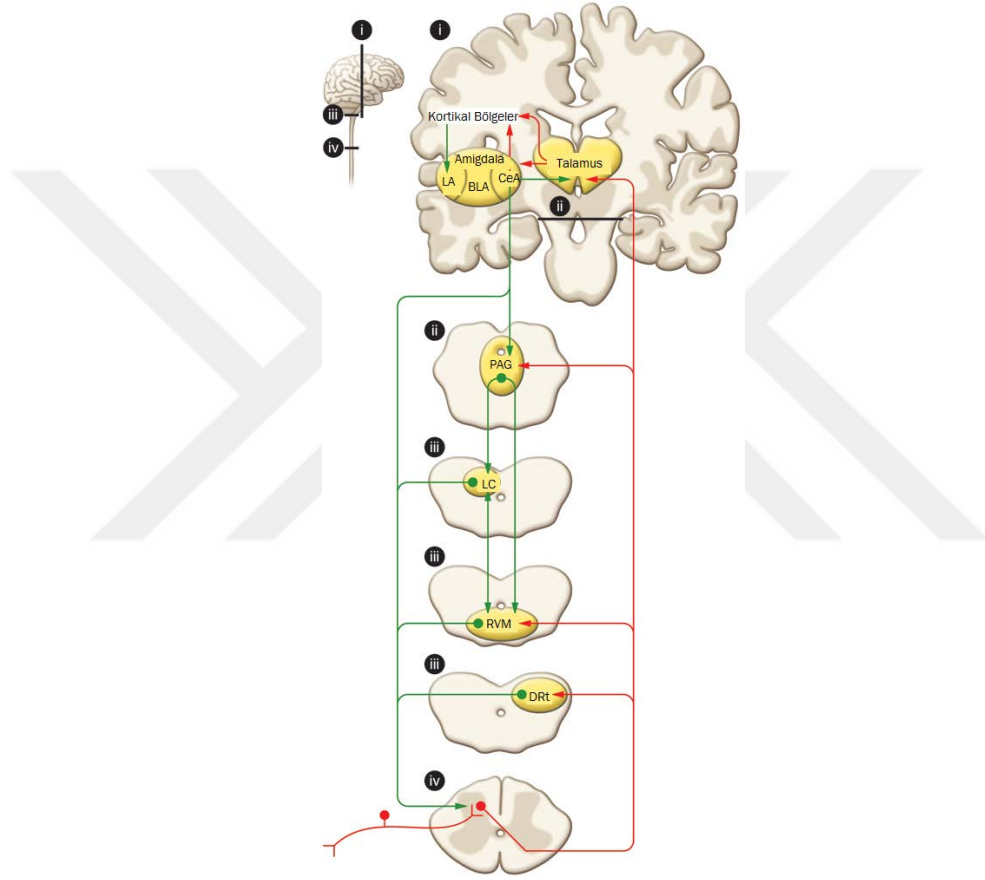
#### 1.2. Fonksiyonları

Nukleus rafe magnus, birçok fizyolojik fonksiyona sahip olan afferent ve efferent projeksiyonları içermektedir. Nukleus rafe magnustaki serotonerjik ve nonserotonerjik nöronlar ağrının modülasyonu, uyku-uyanıklık döngüsü, ağrıya verilen somatomotor, otonomik ve davranışsal yanıtların düzenlenmesi gibi işlevlerden sorumludur (21,23-26,29,31). Beynin bu bölgesindeki nöronların uyarılması sempatik sistemin aktive olması ile

arteryel kan basıncında, kardiyak aktivitede ve vücut sıcaklığında değişimlere yol açar (27-28). Aynı zamanda solunumun düzenlenmesi ile ilgili işleve sahip olduğuna dair deneysel kanıtlar da mevcuttur (22,27,30).

### 1.3. Bağlantıları

Nukleus raphe magnus beyin sapındaki pek çok bölgeden ileti alır (Şekil-2). Stratejik yerleşimi sebebiyle inen, çıkan ve horizontal yolaklar ile afferent ve efferent bağlantılara sahiptir (21-31). Nukleus rafe magnusun afferent ve efferent bağlantıları ile ilgili bilgilere NRM'a enjeksiyon yapılan araştırmalar ile ulaşılmıştır.



Şekil-2: Nukleus Rafe Magnus'un bağlantıları

#### 1.3.1. Afferent Bağlantılar

Daha önce çeşitli deney hayvanlarında yapılmış çalışmalarda, RVM'ya beyinsapı, hipotalamus ve periaquaduktal gri madde (PAG)'den gelen projeksiyonların olduğu gösterilmiştir. Rostral ventromedial medullada yer alan NRM'un kaudal ve rostral bölgeleri lateral preoptik bölge, stria terminalisin nukleus tabakası, paraventriküler hipotalamik nukleus (PVN), amigdalanın santral nukleusu, lateral hipotalamik bölge, dorsal hipotalamik bölge, parafaskikular bölge, PAG'den dorsolateral ve ventrolateral bölgeleri, parabrakiyal

nukleuslar, subkoeruleus bölge, caudoventrolateral medulla ve parvoselüler retiküler nükleustan afferent projeksiyonlar almaktadır (47-49).

### **1.3.2. Efferent Bağlantılar**

Elektriksel stimülasyon veya intra-NRM yolla yapılan mikroenjeksiyonların sonucunda NRM'tan spinal kordun dorsal boynuzuna inen yolakların analjezide rol oynadığı bilinmektedir. NRM'un rostral kısımlarından bazal önbeyin ve hipotalamusa çıkan nonserotonerjik yolaklar gözlenirken; kaudal kısımlarından yine bu bölgelere geniş serotonerjik ve nonserotonerjik inen yolaklar olduğu gözlenmiştir (47-49). Sim ve Joseph'in (50) NRM'un nosisepsiyona supraspinal seviyedeki katkılarını araştırdığı çalışmada NRM'tan çıkan sinir liflerinin gigantoseleler retiküler nükleus pars alfa, lateral paragigantoseleler nükleus, lateral ve ventral lateral PAG, lateral parakiyal nükleus, beyin sapındaki locus coeruleus, A7, A5, C1 gibi katekolaminerjik hücre grupları ve retiküler nükleuslara doğru uzandığı görülmüştür.

### **1.2. Nükleus Rafe Magnus ve Ağrı**

Nükleus rafe magnus stratejik yerleşimi, inen, çıkan ve horizontal yolaklar ile afferent ve efferent bağlantılara sahip oluşu (21-31) nedeniyle ağrının modülasyonunda önemli bir role sahiptir. Nükleus rafe magnusu içine alan RVM'nin ağrıyı inen analjezik yollarda module ettiği bilinmektedir (51-56). Rostral ventromedial medullanın elektriksel ve kimyasal yolla stimülasyonu ile spinal nosiseptif yanıtların inhibe edildiği pek çok araştırma mevcuttur (57-61). Yine bu bölgenin hasarlanması veya bu bölgeye inhibitör aminoasit (gama-aminobutirik asit; GABA) reseptör agonistlerinin enjeksiyonunun spinal kordun dorsal boynuzundaki nosiseptif yanıtların inen yolaktaki inhibisyonunu bloke ederek hiperaljeziye sebep olduğu bilinmektedir (62-64). Spinal nosiseptif transmisyonun RVM'nin stimülasyonu sonucu inhibe edilmesinde, RVM'dan orijin alan inhibitör ve fasilitatör yolların indiği bölge olan NRM'un aktive olmasının payı vardır (65-69).

Beyin sapındaki çekirdeklerden spinal kordun dorsal boynuzuna inen yolaklar, nosiseptif iletinin inhibisyonunda rol oynamaktadır (11). Rafe çekirdekleri mezensefalondan medulla oblongataya uzanan medyan/paramedyan aksisin içinde yer almaktadır. Özellikle ağrı kontrolünde önemli olan rafe-spinal yolaklar NRM'tan orjin alır ve ağrılı uyarıyı inhibe etmek için spinal kordun jelatinus substans bölgesini hedef almaktadır. Periaquaduktal gri maddeden ileti alan NRM'tan çıkan serotonerjik yolaklar spinal-talamik nosiseptif yolağın sekonder nöronlarını hiperpolarize eden enkefalinerjik inhibitör internöronları aktive etmektedir (70-71). Ayrıca NRM ve gigantoseleler/paragigantoseleler çekirdekleri ve nükleus rafe pallidus gibi NRM'a yakınlık gösteren bölgeler, spinal-talamik yolda ağrılı

uyaranın nörotransmisyonunda görev alan spinal kord nöronları üzerinde etki meydana getirmektedir (72-73).

Yerleşimi ve bağlantıları sebebiyle analjezik etkileri bilinen NRM'un ağrının kontrolündeki rolüne katkısı olan sistemler ve reseptörler çeşitli farmakolojik ajanların kullanıldığı çalışmalar ile araştırılmıştır. Bunlardan en önemlisi kolinerjik sistem olup pek çok araştırmaya konu olmuştur. Behbehani'nin iyontoforez yöntemini kullanarak ACh uyguladığı çalışmada NRM'taki hücrelerin %71'inde eksitasyon meydana geldiği görülmüştür (74). Proffit ve Brodie lokal karbakol enjeksiyonu ile NRM'un analjezi meydana getirdiğini göstermiştir (75). Iwamoto'nun pedunkulopontin tegmental nukleus (PPTg) ve NRM'a nikotin uygulandığında, motor bozukluğa yol açmaksızın analjezi meydana geldiğini gösterdiği bir diğer çalışma, (18) NRM'un kolinerjik sistem ile ilişkisine dair önemli bulguları açığa çıkarmıştır. Bu çalışmada yüksek afiniteye sahip kolinerjik agonist cis-dioksolanın NRM'a uygulanması da analjezi oluşturmuştur. Nikotinin oluşturduğu analjezi mekamilamin ve pirenzepinin birlikte uygulandığı ön tedavi ve hemikolinium-3 ön tedavisi ile azalmıştır. Parenteral nikotin uygulaması sonrası oluşan analjezi NRM'a uygulanan hemikolinium-3 ön tedavisi ile engellenmiştir. Bu veriler sıçanda nikotinin indüklediği analjezide NRM'taki ACh biyosentezi ile nikotinic ve M<sub>1</sub> reseptör etkileşiminin rolünü kanıtlamaktadır. Bu sonuçları takiben yapılan antagonist çalışmalarında PPTg'a yapılan nikotin mikroenjeksiyonun indüklediği analjezi NRM'a yapılan prokainamid ön tedavisi ile bloke edilirken, NRM'a yapılan nikotin mikroenjeksiyonunun indüklediği analjezi PPTg'a yapılan prokainamid uygulaması ile bloke edilmemiştir. Bu sonuç analjezi oluşturduğu varsayılan kolinerjik yolağın PPTg'tan NRM'a doğru olduğunu düşündürmektedir. Aynı zamanda nikotin veya cis-dioksolanın PPTg'a uygulandığında oluşan analjeziden sorumlu diğer bir yolağın NRM'tan spinal kordun dorsal boynuzuna inen serotonerjik yolak (53,70,76) veya NRM'taki noradrenerjik sistem (77) olması muhtemeldir.

Akut ve kronik ağrı modellerinde intra-NRM yolla uygulanan kolinerjik kanal modülatörü ABT-594'ün analjezik etkilerinin kanıtlanmasının (78-79) ardından Bitner ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada, sistemik ABT-594 uygulamasının NRM'ta indüklediği Fos proteini ekspresyonu sistemik mekamilamin uygulaması ile bloke edilmiştir. Bu bulgu ABT-594'ün NRM'taki nAChR'lerini aktive ederek bölgenin analjezik etkilerine aracılık ettiğini göstermektedir (19). Yapılan immunohistokimyasal değerlendirmeler NRM'ta nAChR alttipi olan  $\alpha 4$  reseptörlerinin varlığını kanıtlamıştır ve serotonerjik nörotoksin olan 5,7-DHT'nin intra-NRM yolla uygulandığında buradaki  $\alpha 4$  reseptör

ekspresyonunun azalması  $\alpha 4$  reseptörü ihtiva eden NRM nöronlarının serotonerjik olduğunu düşündürmektedir (19).

Abe ve arkadaşları selektif kolinerjik nörotoksin olan AF64A mikroenjeksiyonunun tail flick ve hot plate testinde ağrıdaki etkisini test etmiştir. Nukleus rafe magnusuna AF64A enjekte edilen sıçanların hot plate testinde nosiseptif uyarana verdikleri yanıtın süresi kısalmıştır. Bu durum NRM'a uygulanan nörotoksin AF64A'nın buradaki kolinerjik ağrı kontrol sistemini inaktive ederek ağrı eşiğini düşürdüğünü göstermektedir. Aynı zamanda AF64A mikroenjeksiyonu 14 günlük uygulamanın ardından morfinin indüklediği analjezide azalma meydana getirmiş olup bu bulgu morfin analjezisinde NRM'taki kolinerjik nöronların etkisi olduğunu kanıttır. İn vivo mikrodiyaliz çalışmalarında AF64A mikroenjeksiyonu ile NRM'taki ekstraselüler ACh salınımının azalmış olması da bu bulguyu desteklemektedir (20).

Opioiderjik sistem NRM'un etkilerine aracılık eden bir diğer sistemdir. NRM'tan inen inhibitör yollardaki endojen opioidler spinal analjezik aktiviteye aracılık etmektedir. Bu aktivite: NRM'tan uyarı alan ventromedial medulla ve dorsolateral pontine tegmentum bölgelerindeki enkefalin içeren nöronların spinal kordun dorsal boynuzuna gönderdiği projeksiyonlar (60, 80), spinal kordun superfisial laminasında bulunan, opioid reseptörü eksprese eden ve enkefalin içeren projeksiyon nöronları ile sinaps yapan internöronlar (81) ve opioid reseptörü eksprese eden primer afferent lifler ile sinaps yapan dorsal boynuzda ait internöronlar aracılığı ile olmaktadır (82).

Dickenson ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada morfinin NRM'a mikroenjeksiyonu analjezi oluşturmuştur (83). Aynı çalışmada sistemik ve intra-NRM yolla nonspesifik opioid reseptör antagonisti nalokson uygulaması söz konusu analjeziyi azaltmıştır. Pan ve arkadaşları (84) NRM'ta opioidlere verdikleri yanıt bakımından iki tip hücre grubu olduğunu belirtmiştir; primer ve sekonder hücreler. Primer hücrelerde yoğun olarak GABA-aracılı sinaptik potansiyel bulunurken sekonder hücrelerde bu potansiyel yoktur veya çok azdır. Primer hücrelerin membran potansiyeli opioidlerden etkilenmezken, sekonder hücrelerin çoğu opioidler tarafından inhibe veya hiperpolarize edilebilmektedir.

Çalışmada primer hücrelerin yaklaşık %50'sinde selektif  $\mu$ -opioid reseptör agonisti DAMGO GABA-aracılı sinaptik potansiyeli inhibe ederken  $\delta$ -opioid reseptör agonisti DPDPE inhibe etmemiştir. Bu sonuç NRM'taki primer hücrelerde GABA-aracılı sinaptik potansiyelin  $\mu$ -opioid reseptör aracılı opioiderjik aktivasyon ile inhibe edildiğini göstermektedir. Daha önce yapılan otoradyografik çalışmalar sıçanda NRM'ta  $\mu$ -opioid reseptör bağlanma bölgelerini tanımlamıştır (85-86). Primer hücrelerde dinlenim

durumundaki membran potansiyelinin veya eksojen olarak verilen GABA'ya hücrel yanıtın Met<sup>5</sup>-enkefalin (ME) veya DAMGO gibi opioid agonistler tarafından değiştirilmediği bilinmektedir. Buna rağmen primer hücrelerde  $\mu$ -reseptör agonistinin GABA-aracılı sinaptik potansiyeli bloke etmesi bu hücrelerdeki GABA salınımının presinaptik olarak inhibe edildiğini düşündürmektedir. Bu durumda opioidlerin disinhibisyon ile NRM'taki primer nöronların aktivasyonunu artırdığı söylenebilir. Bu primer nöronlardan bazıları spinal kordun dorsal boynuzuna uzanan projeksiyonlara sahiptir. Dolayısıyla NRM'tan inen inhibe edici yolak opioidlerce aktive olmaktadır. Bu aktivasyon opioid aracılı analjezinin etki mekanizmalarından biridir (84).

Nukleus rafe magnustaki hücreler ayrıca ağırlı uyarana verdikleri yanıtta göre 'off' ve 'on' hücreler olarak iki sınıfa ayrılmıştır (87-88). Opioidler, 'off' hücrelerin aktivasyonundaki inhibisyonu önlerken 'on' hücrelerde ağırlı uyarana verilen yanıtın aktivasyonunu bloke etmiştir. Opioidlerin primer hücreler üzerindeki etkisi 'off' hücrelerdeki etkisi ile uyumlu görünmektedir. Opioidlerin primer hücrelerde olduğu gibi NRM'taki 'off' hücrelerde de disinhibisyona bağlı olarak eksitasyon yarattığı hipotez edilmektedir (84).

Pan ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada sekonder hücrelerin çoğu ME ve DAMGO tarafından hiperpolarize edilmiştir. DPDPE sıçanda herhangi bir etki göstermezken guinea pigde zayıf bir etkinlik göstermiştir. Sonuç olarak her iki türde de  $\mu$ -opioid reseptörlerin, guinea pigde ayrıca  $\delta$ -opioid reseptörlerin aktivasyonu NRM'taki sekonder hücrelerde hiperpolarizasyona yol açmaktadır. Bu grup hücreler fonksiyonel olarak Fields'in tanımlamış olduğu (88) 'on' hücreler ile benzerdir.

Yang ve arkadaşları ağırlı stimülasyonu ile NRM perfüzyon sıvısında opioidlerjik peptidler ve argininvasopressin (AVP) konsantrasyonunun arttığını, AVP'in NRM'tan opioidlerjik peptid salınımını artırdığını ve NRM'a opioid reseptör antagonisti uygulamasının intra-NRM AVP uygulamasının başlattığı analjeziyi azalttığını gözlemlemiştir. Bu bulgular NRM'taki endojen opioidlerjik sistemin AVP'nin analjezideki rolünde etkili olduğunu göstermektedir (89).

Nukleus rafe magnusun raphe çekirdeklerinin kaudal grubundaki en geniş serotonerjik çekirdek oluşu nedeniyle buradaki serotonerjik sistemin ağrının kontrolündeki rolü önem taşımaktadır. Nukleus rafe magnus yaklaşık üç yüz bin nöron içermekte olup (90), bu nöronların dörtte biri serotonerjiktir (91). Nukleus rafe magnustaki hücreler fizyolojik ve anatomik olarak heterojen yapıdadır. Nukleus rafe magnusun inaktivasyonu hem opioid analjezisini hem de naloksonun azalttığı opioid analjezisine bağlı olarak meydana gelen

hiperaljeziyi azaltmaktadır (92-93). Bu fizyolojik farklılıklar daha önce belirtildiği gibi NRM'ta iki grup hücrenin varlığını desteklemektedir; 'off' ve 'on' hücreleri. 'Off' hücre grubunun ağırlı uyarının yarattığı nosisepsiyonda inhibitör; 'on' hücre grubunun ise eksitator fonksiyona sahip olduğu varsayılmaktadır (60,94). 'Nötral' hücreler olarak tanımlanan üçüncü hücre grubu ise ağırlı uyarın veya opioidlere yanıt vermeyen ve nosisepsiyonun modülasyonundaki rolü henüz aydınlatılmamış hücre grubudur (95). 'On', 'off' ve 'nötral' hücrelerin ağrının kontrolündeki rolünü anlayabilmek için bu hücrelerin hangi nörotransmitter maddeleri ihtiva ettiğini bilmek gerekir. Nukleus rafe magnus ve ona yakın bir bölge olan nukleus retikularis magnosellularis (NRMC)'in spinal ve medüller dorsal boynuzda uzanan major serotonin kaynakları olduğu bilinmektedir (96-98). İyontoforez ve lokal spinal yol ile serotonin reseptör antagonistlerinin uygulanması NRM'un analjezik etkilerini azaltmıştır (99-102). Ayrıca nonspesifik serotonerjik reseptör antagonisti metiserjidin intratekal yolla uygulanması NRMC'in başlattığı nosisepsiyonu azaltmıştır (103). Bu bulguların ışığında ağrının çoğaltılması ve baskılanmasında 'on' ve 'off' nöronların görev aldığı tahmin edildiği üzere, NRM ve NRMC'teki bu hücrelerin serotonin içerdiği, yani serotonerjik olabileceği düşünülmüştür. Fakat Gao ve Mason'un yapmış olduğu çalışmada serotonerjik değil nonserotonerjik nöronların akut ağırlı uyarana verilen fazık yanıtları modüle ettiği görülmüştür. Bu durumda daha önceki araştırmalarda opioidlere yanıt veren hücrelerin de nonserotonerjik olduğu ve NRM'taki serotonerjik nöronların ağrının fazık modülasyonunda rol almadığı tahmin edilmektedir (95).

Serotonerjik reseptörlerin analjezide rol aldığı bilinen bir gerçektir (104). NRM'un spinal korda inen 5-hidroksitriptofan (5-HT) liflerinin major kaynağı olduğu, pek çok 5-HT nöronu ve 5-HT reseptörü, özellikle de 5-HT<sub>1A</sub> reseptörü içerdiği bilinmektedir (105-106). İntraselüler kayıtlarda 5-HT'in NRM'taki 5-HT nöronlarını hiperpolarize ettiği, bu hiperpolarizasyonun 5-HT<sub>1</sub> reseptör agonisti 5-CT ve 5-HT<sub>1A</sub> reseptör agonisti 8-OH-DPAT tarafından taklit edildiği; 5-HT<sub>1A</sub> reseptör antagonisti NAN-190 ile de antagonize edildiği gösterilmiştir (107). 5-HT<sub>2</sub> reseptör antagonisti ritanserinin NRM'a mikroenjeksiyonu PAG'in başlattığı morfin analjezisini azaltmış, buna bağlı olarak NRM'taki 5-HT<sub>2</sub> reseptörlerinin PAG'den inen ağrı-inhibitör sistemini modüle ettiği fikri ortaya atılmıştır (108). Oliveira ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada NRM'taki 5-HT<sub>2</sub> reseptör blokajının, nöbet sonrasında nosiseptif eşikte meydana gelen artışı antagonize etmesiyle bu bölgedeki 5-HT<sub>2</sub> reseptörlerinin postictal analjezideki rolü de kanıtlanmıştır (109). Zhang ve arkadaşları 5-HT<sub>1A</sub> reseptör mRNA ekspresyonunun ipsilateral spinal dorsal boynuzda periferik inflamasyonu takiben belirgin bir şekilde arttığını gözlemledikten sonra aynı artışın

carregeenan enjeksiyonuna bağlı inflamasyonda NRM'ta da olduğunu göstermiştir (110). Takiben 5-HT<sub>2A</sub> reseptör mRNA ekspresyonunun da carrageenanla oluşturulan inflamasyonda NRM'ta arttığı gözlemlenmiştir (108). 5-HT<sub>2A</sub> reseptör antagonisti M100907'nin otuz sekiz farklı beyin bölgesine uygulanması sonrası serotonin sentezindeki değişimler analiz edilmiş ve bu değişimin oranı NRM'ta %26 olmuştur. 5-HT<sub>2A</sub> reseptör yoğunluğu fazla olan bölgelerde 5-HT<sub>2A</sub> reseptör blokajına bağlı olarak azalan serotonin sentezi gözlenmesi 5-HT<sub>2A</sub> reseptörünün serotonin sentezinde major bir role sahip olduğunu göstermiştir (111).

Nukleus rafe magnustaki serotonerjik aktivite başta GABA olmak üzere bir dizi nörotransmitter ve nöromodulator tarafından regüle edilmektedir. Sıçanda yapılan immunohistokimyasal çalışmalarda NRM'ta GABA-transaminaz içeren pek çok hücre (84) ve GABA<sub>A</sub> ile GABA<sub>B</sub> reseptörleri olduğu bilinmektedir (32). Ayrıca NRM'un GABA içeren çok sayıda nöron gövdesi ve uçları (112-113) ile yüksek GABA konsantrasyonuna sahip olduğu gösterilmiştir (114). GABA'nın NRM nöronları üzerindeki inhibitör etkisi nosiseptif eşiğin regülasyonuna aracılık etmektedir (63). Pan ve arkadaşları NRM'taki primer hücrelerde yoğun olarak GABA-aracılı sinaptik potansiyelin bulunduğunu göstermiştir (84).

Inyushkin ve arkadaşları NRM'taki primer nöronları serotonerjik hücreler olarak belirtirken, sekonder nöronların çoğunlukla gabaerjik internöronlar olduğunu rapor etmiştir (32). İmmunohistokimyasal ve otoradyografik çalışmalara göre, rafe çekirdeklerindeki serotonerjik nöronların aktivitesi üzerinde gabaerjik sistem etkilidir. Bu çekirdeklerin ihtiva ettiği GABA<sub>A</sub> ve GABA<sub>B</sub> reseptörleri rafe çekirdeklerinde GABA'nın serotonin salgılanması ve serotonerjik nöronların aktivitesi üzerine olan inhibitör etkisine aracılık etmektedir. Sıçanlarda yapılan mikrodializ çalışmalarına göre NRM diğer yapılarla oranla yüksek GABA konsantrasyonuna sahiptir. Nukleus rafe magna uygulanan sodyum kanal aktivatörü veratridin, diyalizatta GABA konsantrasyonunda %60'tan fazla bir yükselmeye sebep olmuştur. Bu data NRM'taki çoğu hücrenin 5-HT<sub>1A</sub>, 5-HT<sub>1B</sub> ve 5-HT<sub>1D</sub> gibi serotonerjik otoresptörler dışında gabaerjik inhibitör sistemin de kontrolü altında olduğunu göstermektedir (32).

Analjezik etkilerini kolinerjik, opioidlerjik, gabaerjik ve serotonerjik sistemler aracılığıyla gerçekleştiren NRM, adrenerjik sistemle ilişkisinin araştırıldığı çalışmalara da konu olmuştur. Klonidin'in RVM'ya enjeksiyonunun tail-flick testinde analjezi sağlamasının ardından (115) in vitro ortamda NRM nöronlarının  $\alpha$ 2-adrenerjik ilaçlar (yohimbin, klonidin) tarafından aktive edildiği gösterilmiştir (116). Bie ve arkadaşlarının yaptığı araştırmaya göre eksitator  $\alpha$ 1 adrenerjik reseptörler primer ve sekonder hücrelerde; inhibitör  $\alpha$ 2 adrenerjik reseptörler



çoğunlukla primer hücrelerde  $\alpha 1$  reseptörleri ile birlikte bulunmaktadır. Primer hücrelerdeki  $\alpha 1$  reseptörler aktive edildiğinde analjezi gelişirken; sekonder hücrelerdeki  $\alpha 1$  ve  $\mu$ -opioid reseptörlerinin aktivasyonu hiperanaljezi gelişmesine katkıda bulunmaktadır (117).

## **2. Ağrı ve Analjezi**

Ağrının kontrol edilmesi insanlığın başından beri toplumu ve sağlık profesyonellerini en çok ilgilendiren sağlık problemlerinden biridir. Akut ve kronik ağrı dünya üzerindeki milyonlarca insanın yaşam kalitesini etkilemektedir. Amerika ve diğer gelişmiş ülkelerden alınan istatistiksel verilere göre popülasyonun %15-20'si akut ağrı; %25-30'u kronik ağrı çekmektedir (118). Uluslararası Ağrı Çalışma Derneği (International Association for the Study of Pain, IASP) tarafından yapılan tanıma göre ağrı; vücudun herhangi bir bölgesinden kaynaklanan, bir doku hasarına bağlı olan ya da olmayan veya bu hasar ile tanımlanabilen, hoş gitmeyen duyuşsal ve emosyonel bir deneyimdir. Ağrı bireyler arasında algıda değişkenlik gösteren, nörofizyolojik, biyokimyasal, psikolojik ve bilişsel boyutları bulunan bir oluşumdur.

### **2.1. Ağrı Mekanizmaları ve İletimi**

Ağrının başlaması, algılanması, iletimi ve ağrıya karşı verilen cevap bir dizi mekanizma sonucu meydana gelir. Ağrılı uyaranlar, 'nosiseptör' denen tüm vücutta yaygın olarak bulunan, dokuya göre özelleşmiş yapılar tarafından algılanır. Bunlar mekanik, termal ve kimyasal uyaranlara yanıt veren sinir sonlanmalarıdır. Ağrının yayılımı ile ilgili bu reseptörler, yanıt verdikleri uyaranlara göre yüksek eşik değerine sahip olan mekanik, mekanotermal ve polimodal nosiseptörler olarak üç sınıfa ayrılır. Mekanik ve mekanotermal nosiseptörler aldıkları uyaranları miyelinli A $\delta$  sinir liflerine iletirken; polimodal nosiseptörler uyaranları miyelinsiz C liflerine iletirler. Mekanoreseptörler sadece yoğun veya ağrılı mekanik uyaranlara yanıt veren; ısı veya aljezik bileşenlere yanıt vermeyen nosiseptörlerdir. Bu nosiseptörler deri, kedi ve maymundaki yüz ve insanda ön kol olmak üzere çeşitli bölgelerde dağılım gösterir. Mekanotermalreseptörler 45°C'tan yüksek termal uyaranlara ve yoğun mekanik uyaranlara yanıt verirler. Bu reseptörler insanlarda, kedilerde ve maymunlarda ağrılı ısı uyaranlarının stimule ettiği ilk ağrıdan sorumlu sinir liflerinin uçlarında bulunur. Polimodal nosiseptörler periferik ağrı reseptörlerinin içinde en önemli gruptur. Mekanik, termal ve kimyasal uyaranları algılamakla karakterizedir. İnsanda derideki sinir liflerinin %95'inden fazlası, sıçanda ve maymunlarda %80-90'ı bu reseptörlerden uyarı alır (118).

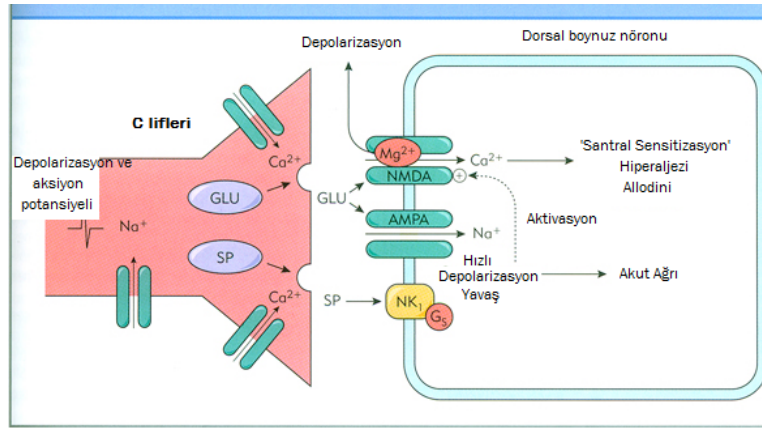
Normal koşullarda ısı, basınç, kimyasal gibi uyarılar miyelinli A $\delta$  ve miyelinsiz C sinir lifleri tarafından algılanır (119). Ardından bu uyarılar dört aşamada üst merkezlere iletilir (120-121);

- 1) Transdüksiyon: Sinir uçlarında bulunan nosiseptörler tarafından algılanan ağrılı uyarıların elektriksel uyarıya dönüştürülmesidir.
- 2) Transmisyon: Ağrı impulsunun sinir sisteminde üst merkezlere iletilmesidir. Bu aşama 3 ana nöron grubu tarafından kontrol edilir;
  - a) Primer afferent duyuşal nöronlar (I. sıra nöronlar): akut, keskin, batıcı karakterde ve iyi lokalize edilen ağrıyı ileten miyelinli A $\delta$  lifleri ile kronik, yaygın ve daha az lokalize edilebilen ağrıyı ileten miyelinsiz C lifleridir.
  - b) Projeksiyon nöronları (II. sıra nöronlar): primer afferent nöronların sonlandığı spinal kordun dorsal boynuzundan beyin sapı ve talamusa uzanan spinal nöronlardır. Bu grup nöronlar içerisinde en önemli yolak spinotalamik yolaktır ve retiküler formasyon, PAG ve hipotalamus ile yakın ilişki içerisinde.
  - c) Talamo-kortikal projeksiyon nöronları (III. sıra nöronları): medial talamustan projekte olup limbik sisteme uğrayarak anterior singulat kortekste sonlanan ve lateral talamustan projekte olup somatosensoryal kortekste sonlanan nöronlardır.
- 3) Modülasyon: Ağrı iletisinin inen yolaklar ile azaltılmasıdır. Kapı kontrol teorisine göre spinal kordun dorsal boynuzuna gelen ağrı iletisi burada bir dizi inhibitör mekanizmaları tetikler. Ağrının modülasyonu buradaki lokal inhibitör internöronlar ile başlar ve ardından beyinden inen inhibitör yolaklar ile devam eder. İnen ağrı yolakları ile bağlantı yapan çeşitli beyin bölgelerine ait sinir lifleri sinaptik aralığa endojen opioidler, serotonin, norepinefrin, GABA gibi bileşenler salgılayarak ağrı modülasyonuna katılır (122).
- 4) Persepsiyon: Supraspinal düzeye erişen ağrı iletisinin talamus ve kortekste değerlendirilerek algılandığı aşamadır. Ağrı algılandıktan sonra birey tarafından dile getirildiği ve yanıt davranışın sergilendiği ‘ekspresyon’ aşaması son yıllarda önem kazanmıştır.

Ağrı, ağrılı uyarının başlattığı nosiseptif transmisyonu takip eden prosesler zinciridir. Primer afferent sinir liflerinin (A $\delta$  ve C) ucundaki nosiseptörler tarafından algılanan ısı, basınç, kimyasal mediyatörler (prostaglandinler, sitokinler, sinir büyüme faktörleri, interlökinler), adenzin trifosfat (ATP) gibi faktörler aksiyon potansiyeli eşiğini geçtikten sonra periferel depolarizasyona sebep olurlar. Spinal kordun dorsal boynuzuna gelen A $\delta$  lifleri yüzeyel lamina I ve derin lamina IV ve V’te sonlanır. Yüzeyel bölgede sonlanan A $\delta$

sinir lifleri spinal korddaki internöronlara ve ardından spino-parakial yolaktaki projeksiyon nöronlarına bağlanır. C sinir lifleri ise yüzeysel lamina II'de sonlanarak bir dizi nörotransmitter (aminoasit, peptid ve gaz yapıda olan (NO, CO vs.) salınımını stimüle eder. Örneğin salgılanan substans P, postsinaptik metabotropik NK1 reseptörlerine bağlanarak depolarizasyon yaparken; glutamat, AMPA (amino-3-hidroksi-5-metil-4-izoksazol) ve N-metil-D-aspartat (NMDA) reseptörlerini içine alan bir dizi glutamat reseptör ailesine bağlanır. NK1 ve AMPA reseptörleri glutamat ve glisin tarafından eş zamanlı uyarıldığında NMDA reseptörü aktive olur. Aktivasyon sonrası artan hücre içi kalsiyum konsantrasyonu bazı reseptörlerin aktivasyonuna veya deaktivasyonuna sebep olan sekonder messenger yolağını başlatır. G protein bağlı reseptörlerin aktivasyonu ve eksitator nörotransmitterlerin üretimi bu yolağın bir sonucudur.

İnhibisyon da eksitasyon kadar kompleks bir süreçtir. Glisin, GABA, endokannabinoidler ve enkefalinler dorsal boynuzun tonik inhibisyonuna katılır. Gabaerjik nöronların üzerindeki AMPA/NMDA reseptörleri aktive olduğunda GABA ve glisin salgılayarak buradaki eksitator aktivasyonu azaltır. Dorsal boynuzdaki bir diğer inhibitör mekanizma opioidergik sistemdir. Dorsal boynuzdaki  $\mu$ -opioid reseptörleri aktive olunca enkefalinler salgılanır. Özetle, spinal kord primer afferent iletiyi takip eden ve pek çok reseptör ve nörotransmitterin aracılık ettiği mekanizmalar ile ağrının modülasyonunda görev alır (Şekil-3).

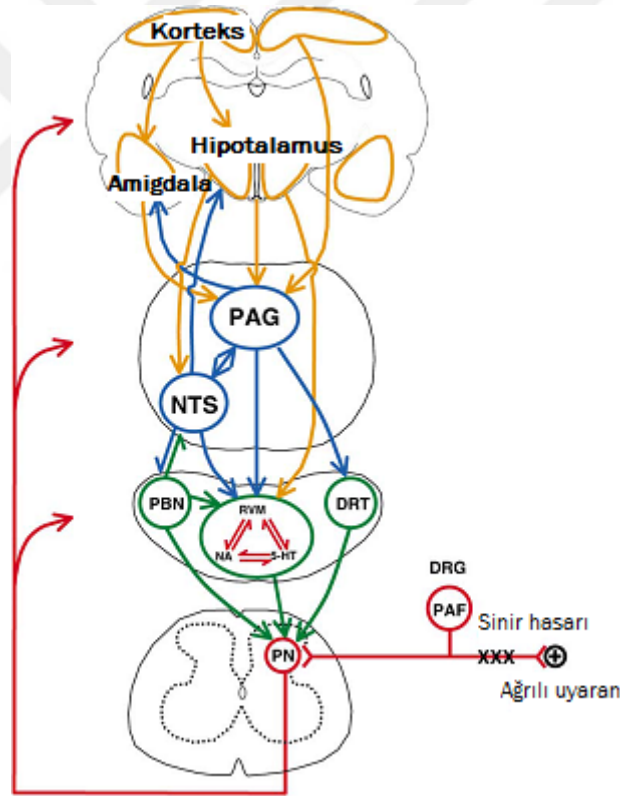


**Şekil-3:** Spinal kordun dorsal boynuzunda ağrının transdüksiyonu

Dorsal boynuzun lamina I'inden projekte olan nöronlar ağrı bilgisini beynin hipokampal, limbik ve amigdala bölgelerine taşır. Bu bölgeler nosisepsiyonun duygusal ve hafıza boyutundan sorumludur. Spinotalamik yolaktaki nöronlar önce talamus ardından da korteksle sinaps yapar. Bu sinaps ağrıyı lokalize ederek motor yanıtları düzenler. Ağrının değişik

bileşenleri insular ve singulat kortekslerde tanımlanır. Anterior singulat ağrıya verilen yanıtı kontrol ederken insular korteks ağrıyı karakterize (batıcı, yanıcı vb.) eder (122).

Ağrının supraspinal düzeydeki modülasyonu dorsal boynuzdaki modülasyonundan daha karmaşık bir prosestir. Ağrılı uyarının inhibisyonu ile ilişkili sistem temel olarak “inen inhibe edici yollar” dan oluşmaktadır. Bu sistemde PAG stratejik bir konuma sahiptir. Periakuaduktal gri madde, korteks, amigdala, talamus ve hipotalamustan inen ve özellikle  $\beta$ -endorfin içeren lifler ile sinaps yapar. Periakuaduktal gri madde, opioidergik (enkefalin, dinorfin) ve opioidergik olmayan (serotonin ve noradrenalin) nöronlar içermektedir ve bu nöronlar beyin sapında serotonergik nöron gövdeleri içeren NRM’a projeksiyonlar gönderir. Buradan kaynaklanan serotonergik lifler spinal kord boyunca dorsolateral fasikül içinde inerek spinal kord arka boynuzunda pre ve post sinaptik inhibisyona neden olurlar. Ponsa lokus seruleus kökenli nöronlar ise noradrenergik lifler içerir ve bu nöronlar da spinal kord boyunca inerek arka boynuzda benzer şekilde inhibisyona neden olur (120-121) (Şekil-4).



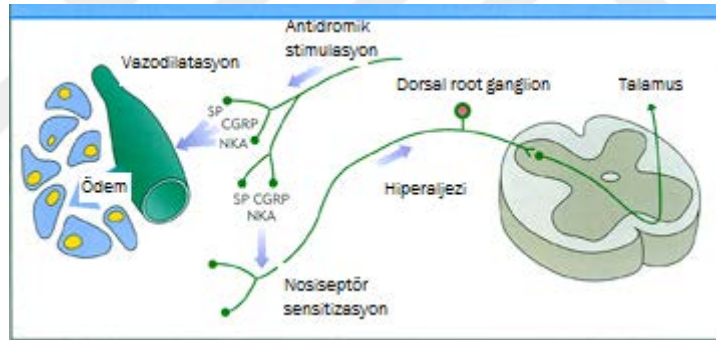
Şekil-4: İnen inhibe edici yollar

## 2.2. Akut Ağrı

Ağrıya yaklaşımda ağrıyı sınıflandırmak önemli adımlardan biri olup ağrıyı değişik biçimlerde sınıflandırmak mümkündür. Ağrı, süresine göre akut ve kronik olmak üzere iki sınıfa ayrılmaktadır. Kronik ağrı, çoğunlukla hasarlanan dokunun iyileşme süresinden daha

uzun süren ağrıdır (123). Akut ağrı; ani bir doku hasarı ve hasarlanan bölgedeki nosiseptif iletilerin aktivasyonu ile tetiklenen, uyarının neden olduğu doku hasarı ile arasında yer, zaman ve şiddet açısından yakın bir ilişki bulunan ağrıdır. Hasarlanan dokuda nosiseptörlerin karakteristiği ve santral bağlantıları ile otonomik sinir sistemi değişir (34).

Termoreseptör, mekanoreseptör ve kemoreseptör olmak üzere bir dizi reseptörden oluşan somatosensoriyel sistem tarafından saptanan ağrılı uyarana karşı başlatılan nöronal proses nosisepsiyon olarak tanımlanmaktadır. Enfeksiyon, inflamasyon veya iskemi ile meydana gelen doku hasarını hücrelerin parçalanması, mast hücrelerinin degranülasyonu, inflamatuvar hücrelerin sekresyonu ve siklooksijenaz-2 gibi enzimlerin indüksiyonu takip eder. Ardından bir dizi kimyasal mediyatör direkt olarak ligand bağlı iyon kanallarını veya metabotropik reseptörleri aktive eder. Aktivasyonun ardından hücre içi kinaz kaskatının aktive olması da fosforilasyona sebep olarak reseptörlerin kinetiklerini, uyarılma eşiklerini ve duyarlılıklarını değiştirir. Periferik dokulardaki sinir uçlarından salınan nöropeptidler (substans-P ve CGRP gibi) hasarlı bölgede inflamatuvar hücrelerin toplanmasına (nörojenik ödem) sebep olur (123) (Şekil-5).



**Şekil-5: Nörojenik ödem**

Akut ağrıda, mevcut doku hasarı medikal müdahale olmadan da lokal onarıcı mekanizmalarla alt edilebilir. Bu tip ağrı travma ve operasyonel müdahale sonrası ve bazı hastalıklarda görülür. İyileşme süreci genellikle birkaç gün veya birkaç hafta sürmektedir (34).

### **2.2.1. Akut Ağrı Modeli**

Akut ağrı modelinde akut nosiseptif uyarın ile aljezi meydana getirilmektedir. Randall-Selitto elektronik analjezimetre, artan mekanik uyarana karşı pençe çekme eşiğinin ölçüldüğü cihaz olup akut ağrıda kullanılan yöntemlerden biridir (124). Randal ve Selitto tarafından tanımlanmış (125) ve takiben pek çok araştırmacı tarafından periferik ve santral etkili analjeziklerin etkilerini ölçmek üzere kullanılmıştır. Bu testte artan ağrılı mekanik uyarın

deney hayvanının arka ve/veya ön pençesinin plantar yüzeyine uygulanmaktadır. Testten önce her hayvana, analjezimetreye alışması için handling prosesi uygulanmakta ve ölçüm sırasında doku hasarını önlemek için mekanik uyarının maksimum şiddeti ayarlanmaktadır. Bireyler arasında farklılık gösteren bir özelliğin çoklu ölçümlerindeki varyansın oranı testin tekrarlanabilirliğinin göstergesidir. Belirli bir bireye ait tekrarlanan ölçümler diğer bireylerin değerlerine çok yakınsa tekrarlanabilirlik yüksektir. Eğer bireylerin ölçümleri yüksek oranda değişkenlik gösteriyorsa tekrarlanabilirlik düşüktür ve testin hassasiyeti multiple ölçümlerin alınması ile artar (124).

### **2.3. Kolinerjik Sistem ve Ağrı**

Kolinerjik sistemin direk veya indirek aktivasyonunun analjezi oluşturduğu uzun zamandır bilinmektedir. Arekolin (126), tremorin (127), fizostigmin ve oksotremorin (128) ve piruvik asidin halojen türevleri gibi çeşitli kolinomimetik ilaçların değişik deneysel modellerde analjezik etkileri olduğu kanıtlanmıştır. Narkotik ilaçların analjezik etkisinde kolinerjik sistemin rolü olduğuna dair pek çok çalışma mevcuttur (129-132). Fizostigmin ve neostigmin, sıçanlarda (133), kedilerde (134) ve insanlarda (135) yapılan çalışmalarda morfinin analjezik etkisini artırmıştır. Bu çalışmalar ışığında ilk defa Pedigo ve arkadaşları (136) tarafından yapılan çalışmada i.s.v yolla enjekte edilen ACh deney hayvanlarında analjezik etki meydana getirmiştir. Takiben Iwamoto (137), nikotinin tail flick ve hot plate testinde analjezi meydana getirdiğini göstermiştir. Daha sonra Damaj ve arkadaşları (6) kolinin i.s.v ve intratekal uygulamayı takiben tail flick testinde; Wang ve arkadaşları (1) i.s.v uygulamayı takiben hot plate testinde ve i.v uygulamayı takiben formalin testinde analjezik etki gösterdiğini kanıtlamıştır.

Kolinomimetik ajanlar aktive ettikleri reseptör tiplerine göre sınıflandırılmaktadır. Santral sinir sistemindeki ACh reseptörleri muskarinik veya nikotinik olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır. Günümüze dek yapılan çalışmalar nikotin ve nAChR agonistlerinin potansiyel etkili analjezikler olduğunu ortaya koymaktadır (5). Nöronal nAChR'leri pek çok preklinik ağrı modelinde (2-4) ve insanda (138-139) yapılan çalışmalarda analjezik etki göstermiştir. Nikotinik asetilkolin reseptörleri dağılım gösterdikleri dokulara göre farklı fonksiyonlara sahiptir (140-141). Analjezide rol alan nAChR'lerini belirlemek zor olmakla birlikte santral sinir sistemindeki  $\alpha 4\beta 2$  nAChR'lerinin anahtar role sahip olduğunu ileri süren çalışmalar mevcuttur (142-144). Diğer bir nAChR alttipi olan  $\alpha 7$  nAChR'leri santral sinir sisteminde ve periferde yaygın olarak bulunmaktadır ve analjezi ve daha pek çok fonksiyonla ilişkilidir (145-147). Son dekarda ağrı iletimi çalışmaları büyük çoğunlukla  $\alpha 4\beta 2$  ve  $\alpha 7$  alttiplerini kapsamaktadır.

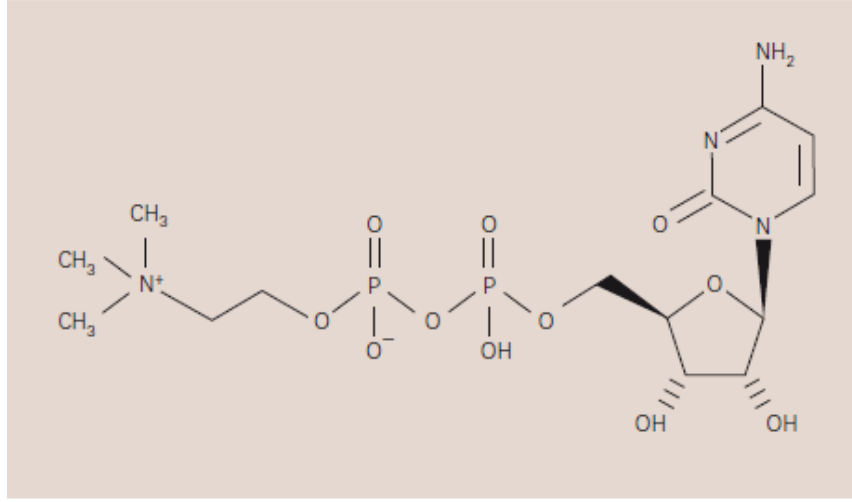
Nikotinic asetilkolin reseptör alttiplerinden biri olan  $\alpha 7$  nAChR'leri, nörotransmitter-kapılı iyon kanalları ailesinin üyesidir. Yüksek kalsiyum permeabilitesi, homopentamerik yapısı ve agonist aktivasyonundan sonra hızlı desensitizasyon ile karakterizedir (148-149). Santral sinir sisteminde korteks, hipokampus, lateral genikulat nükleus, superior kollikulus, striatum ve spinal kordun dorsal boynuzunda eksprese edilir. Hücresel seviyede  $\alpha 7$  nAChR'leri gabaerjik, glutamaerjik ve kolinerjik nöronlarda pre- ve post-sinaptik olarak bulunur (150). Alfa7 nAChR'leri sinaptik nörotransmisyon, nöronal büyüme ve farklılaşmasında rol oynar ve apoptoz ile nörodenejerasyon prosesleri ile ilişkilidir (145). Çeşitli dokulardan sentezlenen inflamatuvar hücre tiplerinde bulunmaktadır (151).

Nikotinic  $\alpha 7$  AChR alttipi ağrı modülasyonunda potansiyel bir hedef olarak kabul edilmektedir. Nikotinic asetilkolin reseptörleri, supraspinal ve spinal ağrı-transmisyon yolağında mevcuttur (152-156). İnflamatuvar ve nöropatik ağrı modellerinde, dorsal kök ganglionlarında  $\alpha 7$  subunit upregülasyonu olduğu görülmüştür (157). Alfa7 nAChR agonisti kolin akut, inflamatuvar ve postoperatif ağrı gibi çeşitli inflamasyon ve ağrı modellerinde analjezik etkiler göstermiştir (6,158-159). Bizim laboratuvarımızda yapılan çalışmalarda da santral ve periferik yoldan uygulanan CDP-kolin'in farklı ağrı modellerinde güçlü analjezik ve antihiperaljezik etki meydana getirdiği gösterilmiş ve CDP-kolin'in bu etkisine özellikle  $\alpha 7$  nAChR'lerinin aracılık ettiği açığa çıkarılmıştır (7-9). Kolinerjik reseptörleri aktive eden ajanların kullanımının hipotermi, motor bozukluklar ve terapotik indeks darlığı gibi yan etki ve zorlukları göz önüne alındığında (160-161) güvenli ve etkili analjezikler geliştirmek için nosiseptif transmisyonun modülasyonuna katılan nAChR alttipleri için selektif ligandlar geliştirmek gereklidir. Alfa7 nAChR'lerinin, antiinflamatuvar ve analjezik ilaç araştırmalarında potansiyel hedef olduğu görüşü giderek kabul görmektedir (1,5,162-163).

### **3. CDP-kolin'in Genel Özellikleri**

#### **3.1. CDP-kolin'in Yapısı ve Sentezi**

CDP-kolin riboz, sitozin, pirofosfat ve kolin içeren bir mononükleotiddir. Molekül ağırlığı 488.33 gramdır (Şekil-6). Endojen bir bileşik olup, hücre membranının yapısına katılan fosfolipidlerin sentezi için gereklidir. Aynı zamanda ACh mekanizması ile de ilişkilidir. CDP-kolin uygulaması ACh sentezi için eksojen kolin kaynağıdır.



**Şekil-6:** CDP-kolin'in molekül yapısı

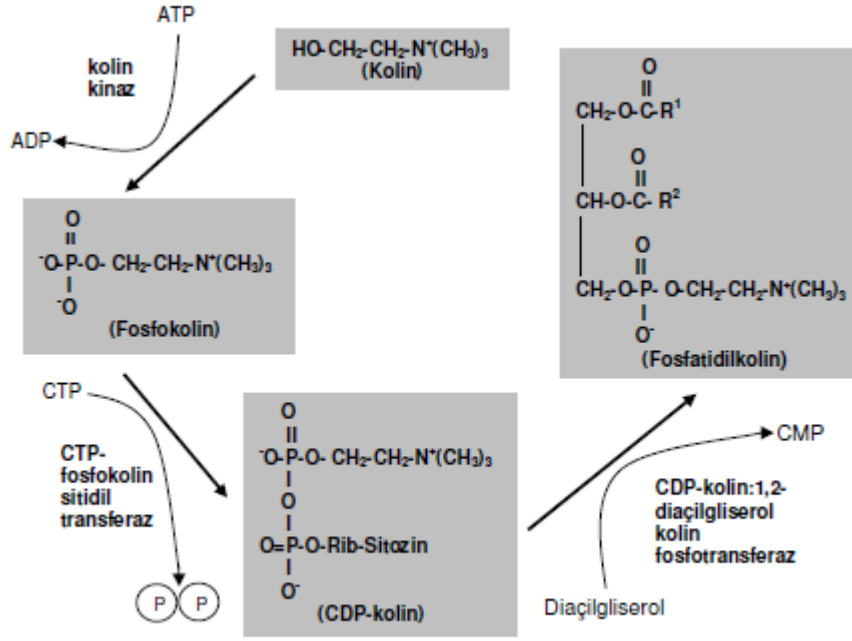
CDP-kolin, membran fosfolipidlerinden fosfatidilkolinin sentezinden sorumlu olan “Kennedy yolağı” nda bir ara ürün olarak sentezlenir (164-165) (Şekil-7). Kolinden fosfatidilkolin yapımına uzanan bu sentez yolu üç temel basamaktan meydana gelir.

Kolin kinaz (CK), CDP-kolin yolağında fosfatidilkolin sentezinin ilk basamağını katalizler. Kolin bir molekül ATP varlığında fosforile olarak fosfokoline dönüşür. 1953 yılında Wittenberg ve Kornberg, CK'ın karaciğer, beyin, böbrek ve intestinal mukozada enzimatik aktiviteye sahip olduğunu göstermiştir. Kolinin tamamı fosfokoline dönüşmez; kolin asetiltransferaz bağlı yüksek afiniteli kolin transporterları ile bir kısmı hızlı bir şekilde ACh'e dönüşür (166).

Kennedy yolağının ikinci basamağında fosfokolin ve sitidin-5-trifosfat (CTP), CTP:fosfokolin sitidil transferaz (CCT) enziminin katalizlediği bir reaksiyonla CDP-kolin'e dönüşür. CCT, CDP-kolin yolağının major regülatör enzimidir. Hücre içinde yüksek konsantrasyonda fosfokolin bulunmasına rağmen düşük miktarda CDP-kolin üretilmesi, bu basamağın hız kısıtlayıcı olduğunu gösterir.

1,2 diaçilgliserol kolin fosfotransferaz (CPT) enzimi CDP-kolin'den diaçilgliserole fosfokolin transfer ederek fosfatidilkolin sentezinin son basamağını katalizler. 1958 yılında Weiss, Smith ve Kennedy'nin CPT enzimi ile ilgili yayınladıkları ayrıntılı raporda CDP-kolinin CPT'nin aktif bir substratı olduğundan bahsedilmiştir.





**Şekil-7:** Kennedy yoluyla aracılığı ile CDP-kolin sentezi; CMP: Sitidinmonofosfat, ATP: Adenozin trifosfat, ADP: Adenozin difosfat, Rib: Riboz, P: Fosfat grubu

Yapılan çalışmalar CDP-kolin yoluyla memeli hücre dizilerinde hücre ölümünü durdururken, CK ve CTT inhibisyonunun apoptotik mekanizmaların tetiklenmesi sonucu hücre ölümüne neden olduğunu göstermiştir (167-174). Bu çalışmalar hücre proliferasyonu için gerekli olan fosfatidilkolin sentezinde CDP-kolin yoluyla önemine vurgu yapmaktadır.

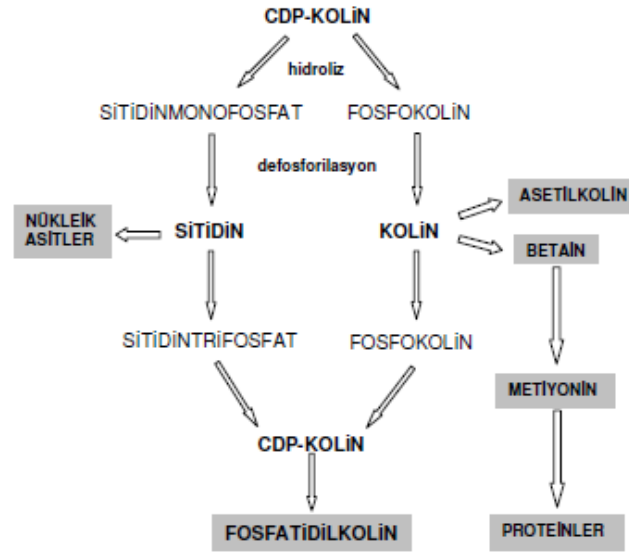
### 3.2. CDP-kolin'in Metabolizması ve Metabolitleri

CDP-kolin suda çözünebilir bir bileşik olup biyoyararlanımı %90'dan fazladır. Sağlıklı yetişkinlerde yapılan farmakokinetik çalışmalarına göre oral uygulama sonrası hızla absorbe olmaktadır (175). Sıçanlara intravenöz (iv) yolla uygulanan  $^{14}\text{C}$  ve  $5\text{-}^3\text{H}$  bağlı CDP-kolin'in 2 dakika içinde plazmada %10'undan daha azına rastlanmıştır. Uygulamadan sonraki 48 saat içinde böbreklerden elimine olan kısmı  $^{14}\text{C}$  bağlı CDP-kolin için %2.5 iken,  $5\text{-}^3\text{H}$  bağlı CDP-kolin için %6.5'tir. Bu sonuçlar CDP-kolin'in hızlı bir şekilde difuze olduğunu ve dokular tarafından aktif olarak kullanıldığını göstermektedir. Aynı çalışmada uygulamadan sonraki 0.5., 1., 4. ve 48. saatte beyindeki radyoaktivite seviyelerine bakıldığında başlangıçta  $^3\text{H}$  bağlı sitidin nükleotidleri ile  $^{14}\text{C}$  bağlı betain, kolin, fosforilkolin artıklarına, daha sonra nükleik asit, metionin ve fosfolipidlere rastlanmıştır. 48 saatin sonunda radyoaktivitenin fosfolipidlerde ve proteinlerde yoğunlaştığı gözlenmiştir (176).

Oral yolla uygulanan CDP-kolin, emilim öncesi ya da emilim sırasında parçalanmak suretiyle hızla aktif metabolitleri olan kolin ve sitidine dönüşür. CDP-kolin, büyük ve polar

bir bileşik olduğu için beyine geçişi oldukça zordur ve normal şartlarda verilen total dozun yaklaşık olarak %0.25'inin beyin dokusuna geçebildiği gösterilmiştir (177-178). İntraserebroventriküler yolla uygulanan CDP-kolin'in hipotalamus ve lateral serebral ventrikülde kolin düzeyini artırdığı bilinmektedir (179).

CDP-kolin barsak ve karaciğerde metabolize edilmektedir. Vücuda alındığında hücre membranlarında bulunan fosfodiesterazlar tarafından önce sitidinmonofosfat ve fosfokoline daha sonra kolin ve sitidine dönüşür. Absorbsiyonu takiben sitidin ve kolin sistemik dolaşıma geçer, kan-beyin bariyerini geçerek beyne ulaşır ve burada CDP-kolin sentezine katılırlar.



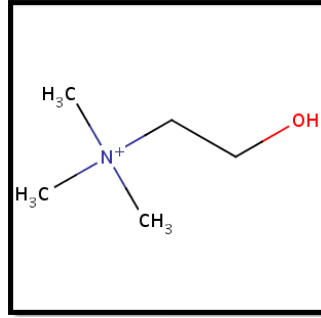
Şekil-8: CDP-kolin'in metabolizması

<sup>14</sup>C ile işaretli CDP-kolin'in kullanıldığı farmakokinetik çalışmalar CDP-kolin'in iki fazlı bir eliminasyona sahip olduğunu göstermiştir. Başlangıçta gözlenen hızlı plazma konsantrasyonu artışı 4-10 saat içinde düşüş gösterirken 24 saat sonra plazma konsantrasyonunda ikinci bir artış söz konusu olmaktadır. Eliminasyon yarılanma ömrü CO<sub>2</sub> ile atılımda 56 saat, üriner sekresyon için 71 saattir (175).

### 3.2.1. Kolin

Yapılan çalışmalar CDP-kolin'in etkilerini büyük oranda metabolitleri aracılığı ile meydana getirdiğini göstermiştir. Kolin esansiyel bir gıda bileşeni olup beyin gelişimi ve fonksiyonu açısından kritik role sahiptir (180-182). Gıdalarla alındığında barsaklardan kolaylıkla emilir ve kan-beyin bariyerini geçebilir. Kolinin hücre içi ve dışına transportu CDP-kolin yolağı ve kolin metabolizması tarafından regüle edilen önemli bir prosestir. Kolin transporterları tarafından ekstraselüler alandan hücre içine alınan kolin mitokondriler tarafından parçalanarak betaine dönüştürülür. Kolini betaine dönüştüren enzim özellikle

böbrek ve karaciğerde eksprese edilmektedir. Böbreklerde oluşan betain fizyolojik osmotik basıncın kontrolünde kullanılmaktadır.

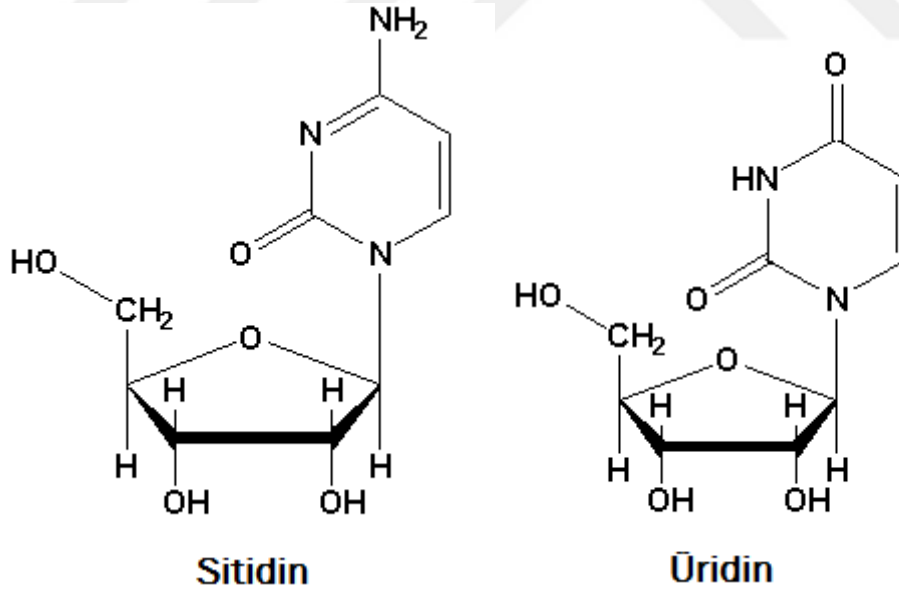


Şekil-9: Kolinin molekül yapısı

ACh prekürsörü olan kolin, tardif diskinezi, Alzheimer hastalığı, Huntington hastalığı, psikiyatrik bozukluklar, ataksi, Tourette sendromu gibi pek çok hastalığın tedavisinde kullanılmaktadır (183-186). Sistemik kolin konsantrasyonunun artırılması ile artan kolinerjik iletinin çeşitli ağrı modellerinde analjezik etki gösterdiği de bilinmektedir (1, 159).

### 3.2.2. Sitidin ve Üridin

Dışardan verilen CDP-kolin, sıçanlarda (187) sitidin ve koline dönüşürken; insanlarda (188) üridin ve koline dönüşür. (Şekil-10)



Şekil-10: Sitidin ve üridinin molekül yapısı

Sitidin ve üridin birer pirimidin nükleozidi olup başlıca görevleri pirimidin nükleotidlerine dönüşerek genetik bilgi transferi, nükleik asid oluşumu, enerji metabolizması, lipid biyosentezi, metabolik reaksiyonlar ve sinyalizasyonda rol almaktır (189). Sitidin i.s.v

yolla uygulandığında kan-beyin bariyerini geçebilirken (190), üridinin sistemik dolaşımından beyne geçtiği 1970'li yılların başında gösterilmiştir (191).

CDP-kolin, serebral iskemi, embolik iskemik şok, serebral hipoksi, intraserebral hemoraji gibi pek çok deneysel modelde olumlu etkiler göstermiştir. Fakat sitidin ve üridin yalnız başına verildiğinde benzer etkiler görülmemiştir. Bu durum CDP-kolin'in etkisinin koline bağımlı olduğunu düşündürürken aynı zamanda, metabolitleri olan sitidin ve kolinden yeniden sentez edilmesi ile oluştuğu görüşüne yoğunlaşmaktadır. Diğer yandan başlangıçta Kennedy yolağı ile fosfatidilkolin sentezinde prekürsör olarak kabul edilmeyen üridinin, son yıllarda yapılan çalışmalarda membran fosfolipidlerinin sentezinde sitidin gibi substrat olarak görev aldığı gösterilmiştir (192-194). Üridin ve kolinin birlikte verildiği gerbillerle yapılan çalışmada 4 haftanın sonunda beyindeki fosfolipid seviyesinde yükselme meydana gelmiştir. Ulus ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada sitidin ve üridinin striatumda bazal ACh sentezini etkilemeden kolinin CDP-kolin'e ve fosfatidilkoline dönüşümünü arttırdığı gözlenmiştir (195). Bu durum sitidin ve üridinin kolinerjik aktivasyonu artırdığı yönde sonuçlar ortaya koymaktadır. Bu bilgilerin ışığında labratuvarımızca yapılan çalışmada sitidinin analjezik etkisi değerlendirilmiştir. Fakat akut ağrıda analjezik etki göstermediği görülmüştür (196). Bununla beraber bir diğer çalışmamızda CDP-kolin'e eşmolar dozda uygulanan kolin ve sitidin oxaliplatinin indüklediği hiperalejiyi azaltmıştır (10).

### **3.3. CDP-kolin'in Etkileri ve Tedavide Kullanımı**

Fosfolipidler, hücrelerin özellikle de hücre membranının canlılığını devam ettirebilmesi için gereklidir. Yüksek turn over oranına sahip bir proses olan fosfolipid sentezinin aksadığı durumlarda çeşitli patofizyolojik hasarlanmalar ortaya çıkar. Bu hasarlanmalar serebral ödem, travmatik beyin hasarı, serebral hipoksi, serebral iskemi, bilişsel bozukluk, vasküler yetmezlik, Alzheimer tipi demans gibi durumların patofizyolojisinde rol oynar (176). Bu hasarları ortadan kaldırmak için membran yapısına katılan fosfolipidlerin yeniden yapılanmasını sağlayan koruyucu ve onarıcı etkili ilaçların geliştirilmesi hedeflenmektedir. Fosfatidilkolin sentezi ile ilişkili olan CDP-kolin bu yönde umut vadetmektedir. Aynı zamanda kolinerjik sistem, kardiyovasküler sistem ve endokrin sistem ile de ilişkili olduğu bilinen CDP-kolin'in farmakolojik etkilerinden dolayı kullanıldığı alanlar aşağıda verilmiştir.

**Kafa yaralanmaları:** CDP-kolin, beyin ödemi sırasında elektroensefalografik iletiyi aktive ederek bilinç düzeyini ve sağkalımı artırmaktadır. 1967'de Moriyama ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada CDP-kolin'in kafa travması geçiren 25 hastada travmanın nörolojik semptomlarını düzelttiği görülmüştür (176).

**Serebrovasküler hastalık:** CDP-kolin nöron membranlarını stabilize edici ve nörotransmisyonu onarıcı etkisinden dolayı serebral iskemide ve hipoksinin giderilmesinde rol sahiptir. 1960'larda yapılan çalışmalar CDP-kolin'in serebral iskemili hastalarda nörolojik bulguları azaltmada etkili olduğunu göstermiştir (197-198). Yine çeşitli serebral iskemide modellerinde, dışarıdan CDP-kolin verildiğinde, fosfatidilkolin sentezini arttırdığı, başta araşidonik asit olmak üzere serbest yağ asitlerinin salınımını önlediği gösterilmiştir (199-200).

**Bilişsel bozukluklar:** Bunama durumunda beyinde enerji metabolizması ile ilişkili enzimlerde genel bir düşüş ile lipid ve nükleik asit metabolizmasını değiştiren bazı biyokimyasal değişiklikler gözlenmektedir. Bazı nörotransmitter (ACh ve dopamin) ve hormon (growth hormon ve prolaktin) dengelerindeki spesifik değişiklikler yaşlanma, bunama öncesi ve bunaklık prosesleri ile ilişkilidir. CDP-kolin'in bunamanın karakteristik semptomlarını azalttığı pek çok çalışma mevcuttur (201-206).

**Nörodejeneratif hastalıklar:** Membran fosfolipidlerinden fosfatidilkolin sentezinde bir ara ürün olan CDP-kolin'in nöron koruyucu etkisi nedeniyle Alzheimer ve multiinfarkt demans gibi nörodejeneratif hastalıklarda kullanımının yararlı olabileceğine dair çalışmalar mevcuttur (207-212).

**Diğer durumlar:** Parkinson hastalığında en çok kullanılan terapötik ajan levodopa olmakla beraber, yan etkileri nedeniyle levodopanin dozunu azaltmak için başka ajanlara ihtiyaç duyulmaktadır. Striatumda dopamin seviyesini artırdığı ve dopamin agonisti gibi davrandığı bilinen CDP-kolin'in pek çok deneysel Parkinson modelinde etkili olduğu gözlenmiştir (213).

Chinchilla ve arkadaşlarının 20 alkol bağımlısı hasta üzerinde yaptığı çalışmada iki aylık tedavinin sonunda CDP-kolin alan hastalarda dikkat-konsantrasyon, yer ve zaman oryantasyonlarında gelişmeler kaydedilmiştir (214). Renshaw ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ise kokain bağımlısı bir grup hastanın kokain isteme davranışlarında 14 günlük CDP-kolin tedavisinin ardından azalma meydana gelmiştir (215-217). Bu bulgular doğrultusunda CDP-kolin'in alkolizm ve ilaç bağımlılığının tedavisinde yeni bir ajan olması muhtemeldir.

Son olarak CDP-kolin'in ambliyopi (218-220), glokom (221-223) ve non-artritik iskemik optik nöropati (224) hastalarında görme fonksiyonunu düzelttiğine dair klinik bulgular da mevcuttur.

### 3.3.1. CDP-kolin ve Ağrı

CDP-kolin'in 1970'lerde ilaç haline getirilişinden sonra aldığı jenerik isim 'Citicoline'dir. Manaka ve arkadaşları Citicoline'i Parkinson hastalığının tedavisinde kullanmışlardır (225). Bundan birkaç yıl sonra Horrocks ve arkadaşlarının yaptığı çalışmanın neticesinde Citicoline'in nöroprotektan bir ilaç olabileceği fikri ortaya atılmıştır (226). Nörodejeneratif hastalıkların tedavisi için, ilk kez 1981 yılında CDP-etanolamin veya CDP-kolin ve CDP-etanolamin kombinasyonu alan hastanın ardından (227), Citicoline'in prelinik ve klinik farmakolojik yönlerini araştıran yüzlerce çalışma yayınlanmıştır.

Citicoline'in ağrının tedavisinde kullanıldığı klinik çalışmalar henüz mevcut değildir fakat CDP-kolin çeşitli deneysel ağrı modellerinde etkili bulunmuştur. İlk kez Hamurtekin ve Gurun'un yapmış olduğu çalışmada santral yolla uygulanan CDP-kolin motor bozukluğa yol açmaksızın akut ağrı modellerinde (termal pençe çekme testi, mekanik pençe testi, asetik asit kıvrınma testi) analjezik etkinlik göstermiştir (7). Kamei ve arkadaşlarının diyabetik periferik nöropatide CDP-kolin'in terapötik etkinliğini araştırdığı çalışmada, streptozosin tedavisini takiben 4 hafta boyunca tail-flick testinde termal uyarana verilen yanıtın süresinin kısaldığı ve bu sürenin oral yolla uygulanan CDP-kolin tedavisi ile arttığı gözlenmiştir (228).

Hamurtekin ve Gurun'un yaptığı çalışmayı takiben Bagdas ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ise CDP-kolin'in nöropatik ve akut inflamatuvar ağrı modellerindeki etkinliği kanıtlanmıştır (8). Yine Kanat ve arkadaşlarının yaptığı bir diğer çalışmada sıçanlarda oxaliplatinin indüklediği nöropatik ağrı modelinde santral yoldan verilen CDP-kolin'in hiperaljeziyi azalttığı bulunmuştur (10). Bu bilgiler ışığında akut, subakut ve kronik ağrılı durumlarda CDP-kolin'in tedavide kullanım potansiyeli bulunduğu düşünülebilir. Bu nedenle CDP-kolin'in analjezik etki mekanizmasında rol oynayan santral yapılar ve bunların etkiye katkılarını araştırmak önem taşımaktadır.

## GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmada Sprague-Dawley türü, 3 aylık, yaklaşık 300-350 gram canlı ağırlıkta, erkek sıçanlar (Deney Hayvanları Yetiştirme ve Araştırma Merkezi, Uludağ Üniversitesi, Bursa) kullanıldı. Sıçanlar çalışmadan bir hafta önce deney hayvanları merkezinden alındı ve dört tanesi bir kafese konularak bakıldı. Sıçanlar 12 saat aydınlık-12 saat karanlık döngüsü olan ısı kontrollü (22-24°C) odalarda tutulup, yem ve su alımları serbest bırakıldı.

Uludağ Üniversitesi Hayvan Bakımı ve Kullanımı Etik Komitesi, çalışmadaki tüm cerrahi ve deneysel işlemlere onay verdi. (Onay no: 08.10.2012-12/03 nolu karar)

### 1. Cerrahi ve Deneysel İşlemler

#### 1.1. Kanül İmplantasyonu

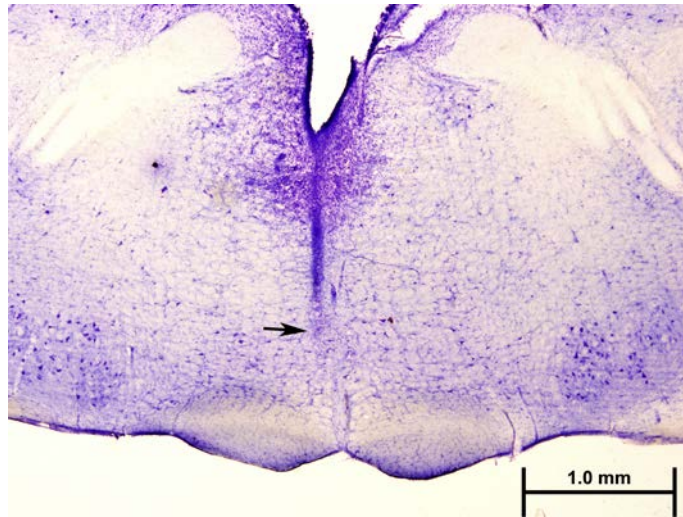
Deney prosedürüne göre hem i.s.v hem de intra-NRM yolla ilaç uygulaması yapabilmek için sıçanlara sevofluran (%2-4,% 100 O<sub>2</sub>) anestezisi altında kanül implantasyonu yapıldı. İntraserebroventriküler yolla ilaç uygulamak için sıçanların sağ serebral yan ventrikülüne (A - 1.0 mm; L 1.5 mm; V -4.2 mm), intra-NRM yolla ilaç uygulamak için NRM'a (A -10.5 mm, L 0 mm, V -9.5 mm) aynı anda kılavuz kanül yerleştirildi. Bu amaçla anestezisi altındaki sıçanlar önce stereotaksik alete yerleştirildi. Hamurtekin ve Gurun tarafından tarif edildiği şekilde (7) cerrahi işlem yapılacak bölgede ensizyon yapıldı. Kanama kontrol altına alınıp, fasyalar uzaklaştırılarak bregma görünür hale getirildi. Sağ serebral yan ventrikül ve NRM için bregma referans alınarak yukarıda belirtilen koordinatlar doğrultusunda iki delik açıldı. Açılan deliklere 21-gauge'luk (21G) hipodermik paslanmaz çelik iğneden hazırlanan el yapımı kılavuz kanül, alt ucu kafatası yüzeyinden itibaren serebroventriküler boşluk için 4.2 mm; NRM için 4.5 mm derinliğe inecek şekilde dik olarak yerleştirildi. Kafatası yüzeyinde kalan üst kısım dişçi akriliği (Zinc polycarboxylate cement, Adhesor Carbofine, SpofaDental A.Ş., Praha) ile kafatasına sabitlendi. Deney gününe kadar tıkanmaması için kanülün ucu hazırlanan bir tıpa ile kapatıldı (Şekil-11). Cerrahi işlemin sonunda sıçanlar, her kafeste bir sıçan olacak şekilde deney gününe kadar bakım odasında tutuldu. Anestezinin etkilerinden kaçınmak için kanülasyonu takiben 1-2 gün sonra deney yapıldı.



Şekil-11: Kanül implantasyonu

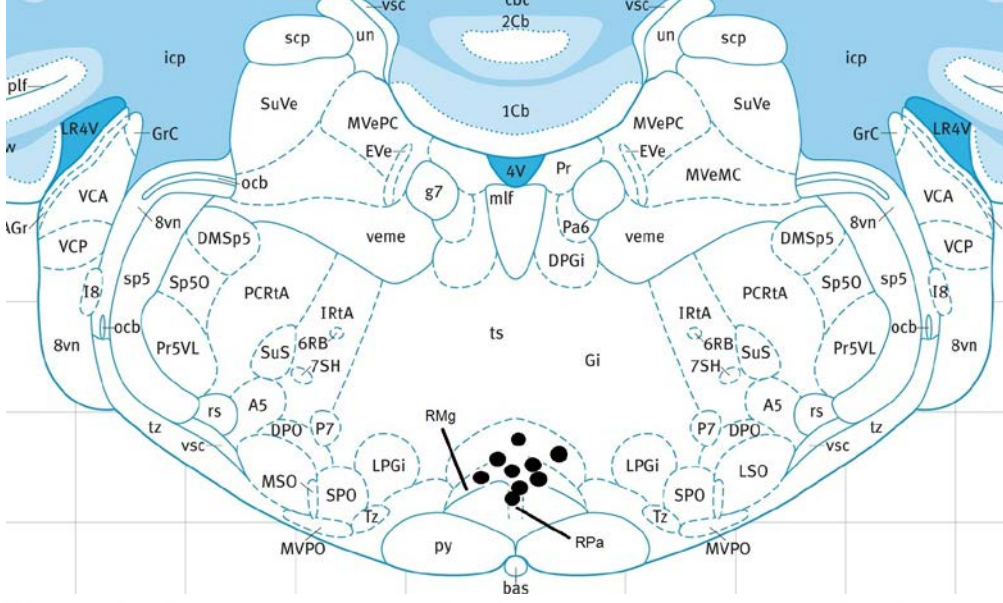
## 1.2. İntra-NRM Kanül ve Mikrodializ Probu Yerleşiminin Histolojik Olarak Doğrulanması

Çalışmamızda önce NRM'a (A -10.5 mm, L 0 mm, V -9.5 mm) yerleştirilen kanüllerin yerleşimlerinin uygunluğu histolojik olarak değerlendirildi. Kanül yerleşimlerinin uygunluğu belirlendikten sonra (Şekil-12) aynı koordinatlar referans alınarak mikrodializ probları yerleştirildi ve her hayvanda prob lokalizasyonu değerlendirildi. Bu amaçla mikrodializi takiben deney hayvanları derin anestezi altında dekapitasyon ile sakrifiye edildi. Kafatası kemikleri açılarak çıkartılan beyinler fosfat tamponlu %4'lük paraformaldehid (Sigma-Aldrich, Steinheim, Almanya) içerisinde +4°C'de 3 gün süre ile fiksasyona tabi tutuldu. Fiksasyonu takiben beyinlerden vibratom ile 50 mikrometrelik koronal seri kesitler alındı. Seri kesitlerin alındığı beyin alanları, Bregma -9.6 mm ile Bregma -11.88 mm koordinatları arasında, rostra-kaudal düzlemde NRM'un tümünü kapsayacak şekilde belirlendi. Alınan kesitlerin tümü lamlara yerleştirilerek kurutuldu. Kesitler %1'lik krezil viyole asetat (Acros Organics, New Jersey, NY, CAS No: 10510-54-0) solüsyonunda 5 dakika süreyle boyandı. Yüzde 50, %70 ve %96'lık etanol serilerinde dehidrate edilen kesitlere absolu etanolde diferansiyasyon uygulandı ve DPX kapama medyumunu (BDH Laboratory Supplies, Poole, İngiltere) ile kapatıldı. Elde edilen preparatlar Olympus BX-50 araştırma mikroskopunda X1,25, X4 ve X10 objektifler kullanılarak incelendi. İncelemelerde prob trasesi bulunarak trasenin en ventral sonlanma noktasının NRM'a erişimi değerlendirilerek prob yerleşimleri belirlendi (Şekil-13).



Şekil-12: Nucleus rafe magnusa uygun kanül yerleşimi





**Şekil-13:** Nukleus rafe magna uygun prob yerleşimi; RMg: Nukleus rafe magnus

### 1.3. Akut Ağrı Modeli

Sıçanlarda analjezi bir akut ağrı modeli olan mekanik pençe çekme testi ile değerlendirildi. Mekanik pençe çekme testi için Randall-Selitto test cihazı (Ugo- Basile, Comerio, VA, İtalya) kullanıldı.

Akut ağrı modelinde her iki arka pençeden de ölçümler alınarak iki pençenin ortalama değeri olarak verildi. On dakika ara ile ardışık olarak alınan ilk üç ölçümün ortalaması kontrol değerleri olarak kaydedildi. Daha sonra ilaç enjeksiyonları yapıldı ve takiben 5, 10, 15, 30, 45, 60. dakikalarda ölçümler alındı.

### 2. Deney Planı

Birinci seri çalışmada; çeşitli antagonistler kullanılarak NRM'ta yer alan ve i.s.v yolla uygulanan CDP-kolin'in akut ağrı modelindeki analjezik etkisine aracılık eden mekanizmalar araştırıldı. Bunun için sıçanlara selektif olmayan muskarinik kolinerjik reseptör antagonisti atropin sülfat (1 µg/0.5 µl), nonspesifik nikotinic kolinerjik reseptör antagonisti mekamilamin (3 µg/10 µl), spesifik α7 nAChR antagonisti MLA (10 µg/0.5 µl), nonspesifik opioid reseptör antagonisti nalokson (1 µg/0.5 µl), spesifik GABA<sub>B</sub> reseptör antagonisti CGP-35348 (3 µg/0.5 µl), nonspesifik serotonin reseptör antagonisti metiserjid (5 µg/0.5 µl) veya tuzlu su (0.5 µl) intra-NRM yolla enjekte edildi. Bu uygulamadan 15 dakika sonra i.s.v yolla CDP-kolin (1 µmol/10 µl) veya tuzlu su (10 µl) enjekte edilerek mekanik pençe çekme eşiği değerlendirildi. Bu amaçla, bu grupta da toplam 67 sıçan kullanıldı. Araştırmamızda kullandığımız CDP-kolin'in dozu daha önce laboratuvarımızda yapılan çalışmalardan (7-8)

seçilmiş olup antagonist maddelerin dozları da başta ağrı olmak üzere benzer fonksiyonların araştırıldığı çalışmalara göre belirlenmiştir (179,229-240).

İkinci seri çalışmada; i.s.v yolla uygulanan CDP-kolin'in NRM'taki kolin ve ACh seviyelerine etkisi araştırıldı. Bunun için sıçanlara hem i.s.v kanül hem de NRM'a mikrodiyaliz probu yerleştirildi. Ertesi gün kanülden CDP-kolin veya tuzlu su enjeksiyonu yapıldı ve enjeksiyonu takiben 60 dk boyunca toplanan diyalizatlarda kolin ve ACh analizi yapıldı. Bu amaçla bu grupta toplam 9 sıçan kullanıldı.

### 3. CDP-Kolin'in Akut Ağrı Üzerine Etkisinin Değerlendirilmesi

Bu çalışmada CDP-kolin'in akut ağrı üzerine etkisi mekanik pençe çekme testi kullanılarak değerlendirildi. Bunun için Randall-Selitto test cihazı-analjezimetre (Ugo-Basile, Comerio, VA, İtalya) kullanıldı (Şekil-14).



Şekil-14: Randall Selitto test cihazı

#### 3.1. Mekanik Pençe Çekme Testi

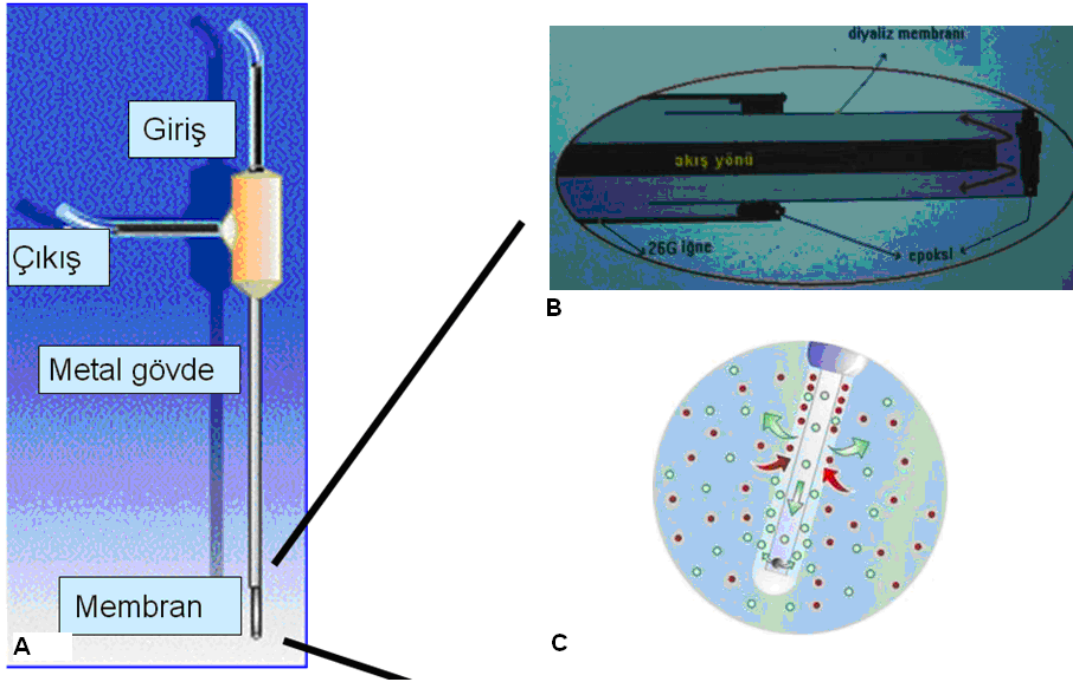
Bu testte Randall ve Selitto tarafından tarif edildiği şekilde (125) mekanik uyaran kullanıldı ve sıçanlarda nosiseptif duyarlılık, arka pençelerine sabit hızda artan mekanik bası uygulamasına verdikleri pençe çekme yanıtının gram cinsinden kaydedilmesi ile değerlendirildi. Deney gününden önce iki gün süreyle sıçanların ölçüm cihazına ve el ile tutulmaya adaptasyonları sağlandı. Bunun için sıçanlar üstü açık, altlıksız bir kafeste dördü bir arada olarak bırakılıp, 30 dakika boyunca ortama uyum sağlamaları için beklendi. Ardından sağ ve sol arka pençeleri cihazın konik uçlu sıkıştırıcısına sıkıştırılarak pedala basılmak suretiyle pençeye sabit hızda (48 g/s) artan bir mekanik bası uygulandı. Sıçanın ağrı duyup pençesini çektiği ağırlık cihaz üzerinde bulunan skala üzerinden okunarak gram cinsinden kaydedildi ve “pençe çekme eşiği” olarak kullanıldı. Doku hasarı olmaması için cut-off değeri 600 g olarak sabit tutuldu. On dakika ara ile ardışık olarak alınan üç ölçümün ortalaması kontrol değeri olarak kaydedildi. Deney günü sıçanların ortama adaptasyonlarını sağlamak amacıyla, yukarıda bahsedilen şekilde sıçanlar aynı kafese konulup, adaptasyonları sağlandı. İlaç enjeksiyonlarını takiben ölçümler 5, 10, 15, 30, 45 ve 60. dakikalarda alındı.

#### **4. İlaçlar ve Mikroenjeksiyon**

Çalışmada kullanılan CDP-kolin ve nalokson hidroklorid dihidrat (Fluka Chemie GmbH, İsviçre); atropin sülfat, mekamilamin hidroklorid, MLA, CGP-35348 ve metiserjid maleat Sigma (Sigma Chem. Co., MO, ABD) firmasından temin edildi. Deneylerde kullanılan ilaçlar tuzlu su (%0.9 NaCl) içinde hazırlandı. Enjeksiyonlar bölgeye daha önce yerleştirilmiş olan kılavuz kanül içine yerleştirilen enjeksiyon kanülleri ile yapıldı. Enjeksiyon kanülü i.s.v boşluk için kılavuz kanülün ucundan 0.3 mm; NRM için kılavuz kanülün ucundan 4 mm çıkacak şekilde hazırlandı. Nukleus rafe magnusa yerleştirilen enjeksiyon kanülü 25G'luk iğneden ve onun ucundan 1 mm çıkan kapiller membran ile yapıldı. Bu kanül 10 µl'lik Hamilton mikroenjektörüne 3 µl hacimde ilaç veya tuzlu su içeren PE-20 kateter içindeki kapiller membran aracılığı ile takıldı. Daha sonra infüzyon pompası yardımı ile 0.5 µl hacmindeki ilaç veya tuzlu su 1 dakika boyunca uygulandı. Enjeksiyon kanülü enjeksiyonu takip eden 1 dakika boyunca yerinde bırakılarak ilacın geri gelmesi önlenmiş oldu.

#### **5. İntraserebroventriküler Yolla Uygulanan CDP-kolin'in NRM'taki ACh ve Kolin Seviyeleri Üzerine Etkisinin Değerlendirilmesi**

Bu çalışmada CDP-kolin'in NRM'taki kolin ve ACh seviyeleri üzerine etkisi in vivo mikrodiyaliz yöntemi kullanılarak ölçüldü. Mikrodiyaliz yöntemi, beynin ve diğer bazı organların çeşitli bölgelerinde ekstrasellüler ortamdaki endojen madde miktarlarını ölçmeye olanak sağlamaktadır. Sıvı içindeki çözülmüş maddelerin yarı geçirgen bir zar yardımı ile çok yoğun oldukları ortamdan az yoğun oldukları ortama geçmeleri kuralına dayanan bu yöntemde; beyinde bulunan ancak diyaliz sıvısında olmayan maddeler yarı geçirgen membranı difüzyon ile geçerek toplanan örneklerle (diyalizat) geçmektedir. Toplanan örneklerde analiz edilmek istenen moleküller HPLC (High Performance Liquid Chromatography; Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi) ve kapiller elektroforez gibi hassas ölçüm sistemleri kullanılarak analiz edilir. Santral veya periferik yolla ilaç verildikten veya diyaliz sıvısına ilaç eklendikten sonra, incelenen beyin bölgesindeki nörotransmitter ve metabolitlerdeki değişimler gözlemlenebilir (241) (Şekil-15).



**Şekil-15:** (A) Diyaliz probunun şematik gösterimi. (B-C) Kapiller ve membran arasından sıvının geçişi ve diyalizatın toplanması.

### 5.1. İn vivo Mikrodiyaliz

İN vivo beyin mikrodiyalizi için sıçanların NRM bölgelerine, bölümümüzde geliştirilen ve kendi yaptığımız proplar yerleştirildi. Mikrodiyaliz propları PPD iğne uçları (26 G), kapiller boru (OD 165, ID 99, Polymicro), epoksi yapıştırıcı ve plastik çubuklardan imal edildi. Prob implantasyonu ile birlikte sağ ventriküle CDP-kolin enjeksiyonu yapmak için i.s.v kanülü implant edildi (Şekil-16).



**Şekil-16:** İntraserebroventriküler kanül ve intra-NRM mikrodiyaliz probu implantasyonu

İN vivo mikrodiyaliz deneyleri anestezinin etkilerinden kaçınmak için cerrahi işlemden 24 saat sonra yapıldı. Deney günü kafesinden alınan sıçanlar deney yapılacak laboratuvara getirilip ortama adaptasyon için herhangi bir işlem yapılmadan 1 saat bekletildi. Bir saatin

sonunda sıçanın NRM bölgesine yerleştirilen diyaliz probuna giriş kanülü takılıp hazırlanan Modifiye Krebs solüsyonu (CSF; pH=7.4; 148 mM NaCl, 3.0 mM KCl, 1.4 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.8 mM MgCl<sub>2</sub>, 1.3 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.2 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) ile 2 µl/dk hızında diyaliz yapıldı. Krebs solüsyonunun içine ACh'i ölçebilmek için daha önceki çalışmalarda rapor edildiği gibi (242) asetilkolinesteraz inhibitörü olan fizostigmin (10 µM) ilave edildi. Onar dakika aralıklarla toplanan iki bazal örneğin ardından mikrodiyaliz probu ile birlikte sağ ventriküle yerleştirilen i.s.v kanül aracılığı ile CDP-kolin enjeksiyonu yapıldı. Enjeksiyonu takiben 60 dk boyunca 10'ar dakikada bir örnek toplanmıştır.

Diyalizatlarda ACh ve kolin analizi enzimatik kolon ve elektrokimyasal dedektör donanımı olan HPLC (Hewlett Packard, Palo Alto, CA, USA) cihazı ile yapılmıştır. Mobil faz 0.5 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH 8.5)' tır (Şekil-17).



Şekil-17: HPLC cihazı

## 6. İstatistiksel Değerlendirmeler

Çalışmada istatistiksel işlemlerde SigmaPlot® (versiyon 11.0) bilgisayar programı kullanıldı. İstatistiksel değerlendirmeler iki yönlü ANOVA'yı takiben Student-Newman-Keuls test kullanılarak yapıldı. Elde edilen veriler "ortalama ± standart hata" şeklinde verildi. Anlamlılık P değeri ile gösterilerek, karşılaştırılan gruplar arasındaki değerlerin istatistiksel ölçüsü olarak sunuldu. P'nin 0.05'ten küçük olduğu değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. \*\*\* P<0,001; \*\* P<0,01; \* P<0,05 ifade etmektedir.

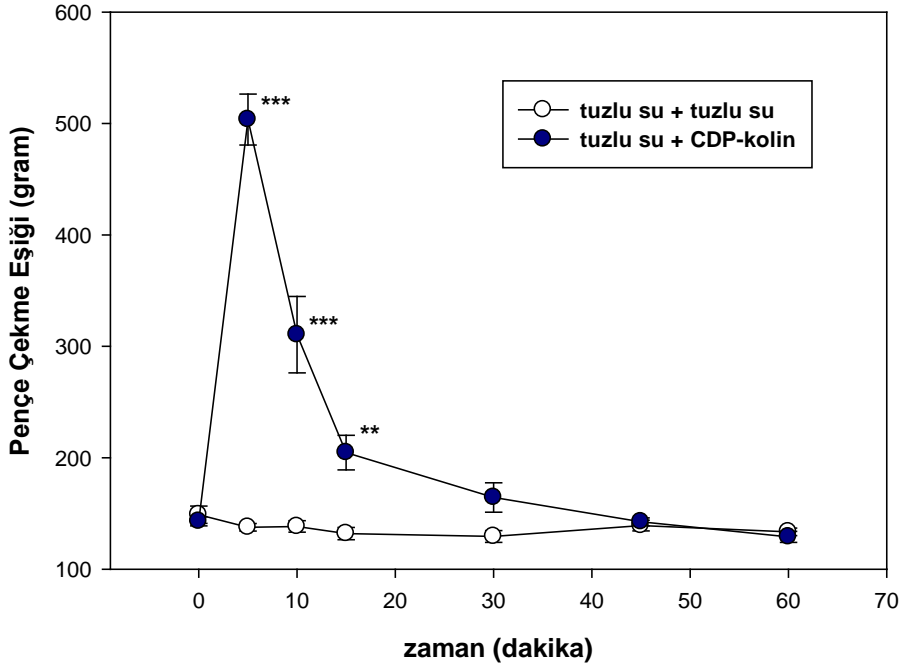
## BULGULAR

### 1. İntraserebroventriküler Yolla Uygulanan CDP-kolin'in Akut Ağrıdaki Analjezik Etkisinde NRM'a Uygulanan Kolinerjik Reseptör Antagonist Ön Tedavilerinin Etkisi

NRM'un ağrı ile ilişkili olduğunu gösteren çalışmalardan yola çıktığımız için ilk olarak çalışmamızda CDP-kolin (1µmol/0.5 µl) intra-NRM yolla uygulandı. CDP-kolin uygulamasını takiben birinci dakikadan itibaren sıçanlarda şiddetli konvulsiyon geliştiği gözlemlendi. Bu nedenle çalışma protokolü değiştirilerek CDP-kolin'in i.s.v; antagonistlerin ise intra-NRM yolla uygulanmasına karar verildi.

Akut ağrı modelinde i.s.v yolla uygulanan CDP-kolin'in bilinen analjezik etkisinde (7-8) NRM'taki kolinerjik sistemin rolünü araştırmak için CDP-kolin (1µmol/10 µl) veya tuzlu su (10 µl) enjeksiyonundan 15 dk önce intra-NRM yolla nonspesifik kolinerjik muskarinik reseptör antagonisti atropin sülfat (1 µg/0.5 µl; intraNRM), nonspesifik kolinerjik nikotinik reseptör antagonisti mekamilamin (3 µg/0.5 µl; intraNRM), spesifik  $\alpha 7$  nAChR antagonisti MLA (5 µg/0.5 µl; intraNRM) veya tuzlu su (0.5 µl; intraNRM) ön tedavileri uygulandı. CDP-kolin enjeksiyonunu takiben 5, 10, 15, 30, 45 ve 60. dakikalarda mekanik pençe çekme yanıtları ölçüldü.

Mekanik pençe çekme testinde i.s.v yolla tuzlu su veya CDP-kolin uygulaması öncesi NRM'a atropin, mekamilamin, MLA veya tuzlu su uygulanan sıçanların kontrol pençe çekme yanıtı eşik değerleri ortalaması  $141.4 \pm 2$  g (n=40) olarak ölçüldü. İntra-NRM tuzlu su ön tedavisini takiben i.s.v tuzlu su enjeksiyonu yapılan sıçanların mekanik pençe çekme yanıtı eşik değerleri 5. dakikada  $137.6 \pm 3.3$  g (n=4) olarak ölçülürken; CDP-kolin enjeksiyonu yapılan sıçanların pençe çekme yanıtı eşik değerleri 5. dakikada  $503.5 \pm 22$  g (n=7) olarak ölçüldü. Buna göre iki yönlü ANOVA analizine göre, mekanik pençe çekme testinde tuzlu su ön tedavisini takiben uygulanan CDP-kolin tedavi [ $F(1,9)=53.724$ ;  $P<0.001$ ], zaman [ $F(1,6)=37.390$ ;  $P<0.001$ ] ve tedavi-zaman ilişkisi bakımından [ $F(1,6)=37.334$ ;  $P<0.001$ ] istatistiksel olarak anlamlı analjezik etki meydana getirdi. Söz konusu etki enjeksiyonu takiben 15 dakika devam etti, 30 dakika sonra geri döndü (Şekil-18).

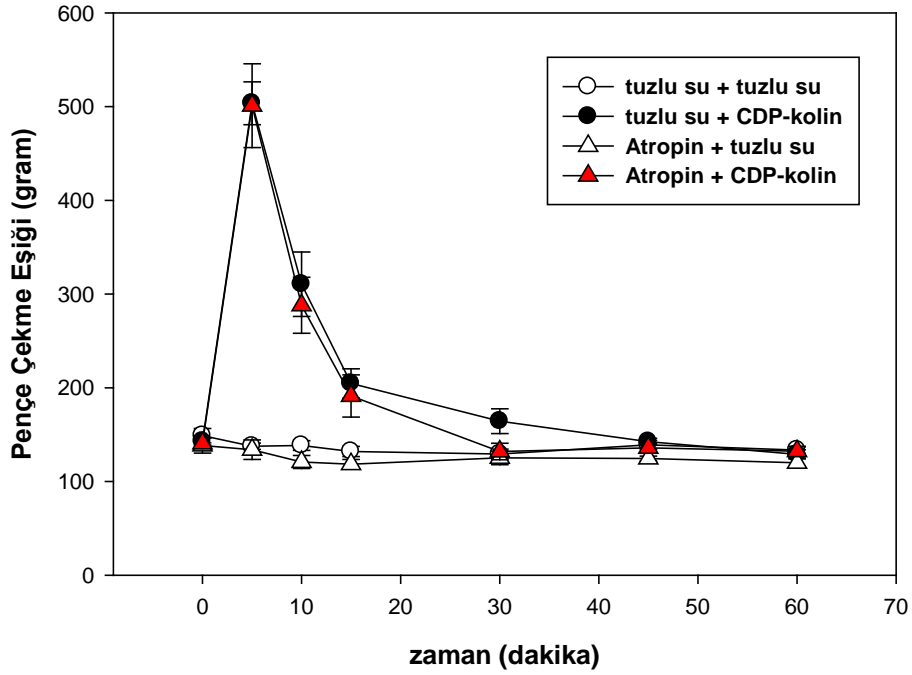


**Şekil-18:** İntra-NRM tuzlu su ön tedavisini takiben i.s.v yolla uygulanan CDP-kolin'in akut ağrı modelinde, mekanik pençe çekme testindeki analjezik etkisi. Mekanik pençe çekme testinde, kontrol pençe çekme yanıtı eşik değerleri alındıktan sonra intra-NRM tuzlu su (0.5 µl) ön tedavisini takiben CDP-kolin (1 µmol/10 µl; isv) veya tuzlu su (10 µl; isv) uygulanarak 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50 ve 60. dakikalarda pençe çekme yanıtı eşik değerleri ölçüldü. Değerler 7 sıçanın ortalama ± standart hatası olarak verildi. İstatistiksel değerlendirmeler iki yönlü ANOVA'yı takiben Student-Newman-Keuls testi ile yapıldı. \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001; tuzlu su grubuna göre anlamlı farkı göstermektedir.

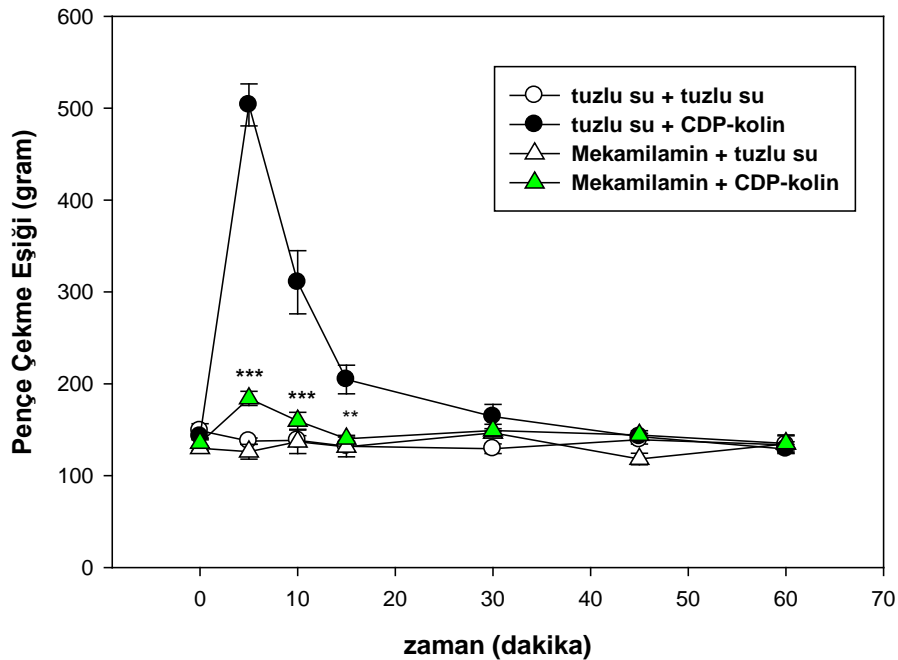
Atropin, mekamilamin ve MLA ön tedavileri sonrası CDP-kolin enjeksiyonu yapılan sıçanlarda ise pençe çekme yanıtı eşik değerleri 5. dakikada sırasıyla; 501.0 ± 44.6 (n=5); 184 ± 7.6 (n=7) ve 213 ± 14.5 g (n=5) olarak ölçüldü. Yapılan iki yönlü varyans analizinden elde edilen sonuçlara göre mekamilamin CDP-kolin'in analjezik etkisini neredeyse tamamen önlerken [F(1,12)=72.371; P<0.001], MLA ön tedavisi bu etkiyi belirgin şekilde azalttı [F(1,10)=22.273; P<0.001], (Şekil-20 ve 21). Bununla birlikte atropin ön tedavisi CDP-kolin'in analjezik etkisini değiştirmede [F(1,10)=0.685; P<0.427], (Şekil-19).

Atropin, mekamilamin ve MLA ön tedavilerinin, tek başlarına mekanik pençe çekme yanıtı eşik değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı bir değişikliğe neden olmadı (P> 0,05) (Şekil-19, 20 ve 21).



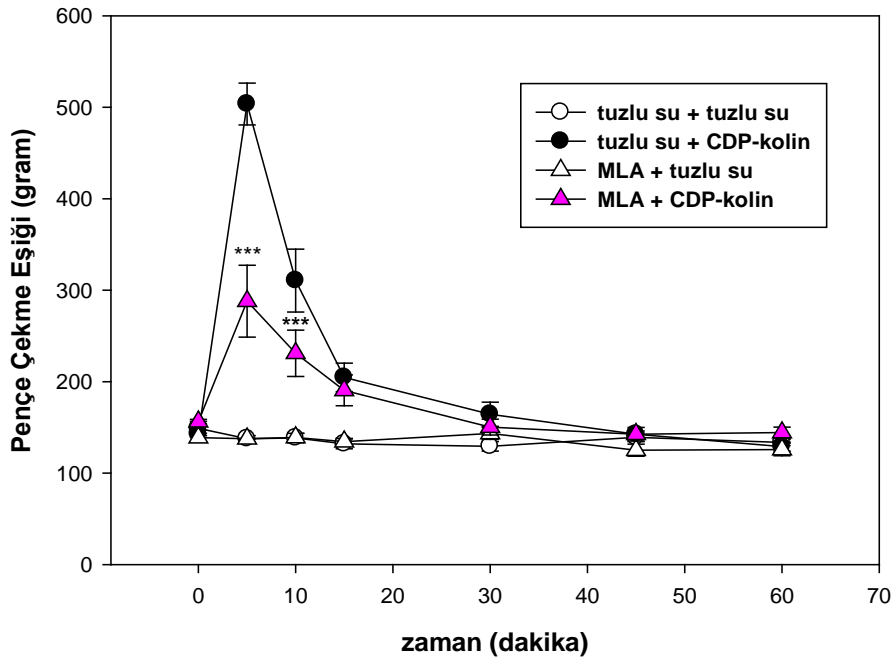


**Şekil-19:** İntraserebroventriküler yolla uygulanan CDP-kolin'in akut ağrı modelindeki analjezik etkisinde intra-NRM yolla uygulanan atropin ön tedavisinin etkisi  
Mekanik pençe çekme testinde, kontrol pençe çekme yanıtı eşik değerleri alındıktan sonra intra-NRM yolla atropin (1 µg/0.5 µl) veya tuzlu su (0.5 µl) ön tedavileri uygulandı. 15 dakika sonra CDP-kolin (1 µmol/10 µl) veya tuzlu su (10 µl) enjekte edildi. İkinci enjeksiyondan sonra 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50 ve 60. dakikalarda pençe çekme yanıtı eşik değerleri ölçüldü. Değerler 5 sıçanın ortalama ± standart hatası olarak verildi. İstatistiksel değerlendirmeler iki yönlü ANOVA'yı takiben Student-Newman-Keuls testi ile yapıldı.



**Şekil-20:** İntraserebroventriküler yolla uygulanan CDP-kolin'in akut ağrı modelindeki analjezik etkisinde intra-NRM yolla uygulanan mekamilamin ön tedavisinin etkisi  
Mekanik pençe çekme testinde, kontrol pençe çekme yanıtı eşik değerleri alındıktan sonra intra-NRM yolla mekamilamin (3 µg/0.5 µl) veya tuzlu su (0.5 µl) ön tedavileri uygulandı. 15 dakika sonra CDP-kolin (1 µmol/10 µl; i.s.v) veya tuzlu su (10 µl; i.s.v) enjekte edildi. İkinci enjeksiyondan sonra 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50 ve 60. dakikalarda pençe çekme yanıtı eşik değerleri ölçüldü. Değerler 7 sıçanın ortalama ± standart hatası olarak verildi. İstatistiksel değerlendirmeler iki yönlü ANOVA'yı takiben Student-Newman-Keuls testi ile yapıldı. \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001; kontrol grubuna göre anlamlı farkı göstermektedir.





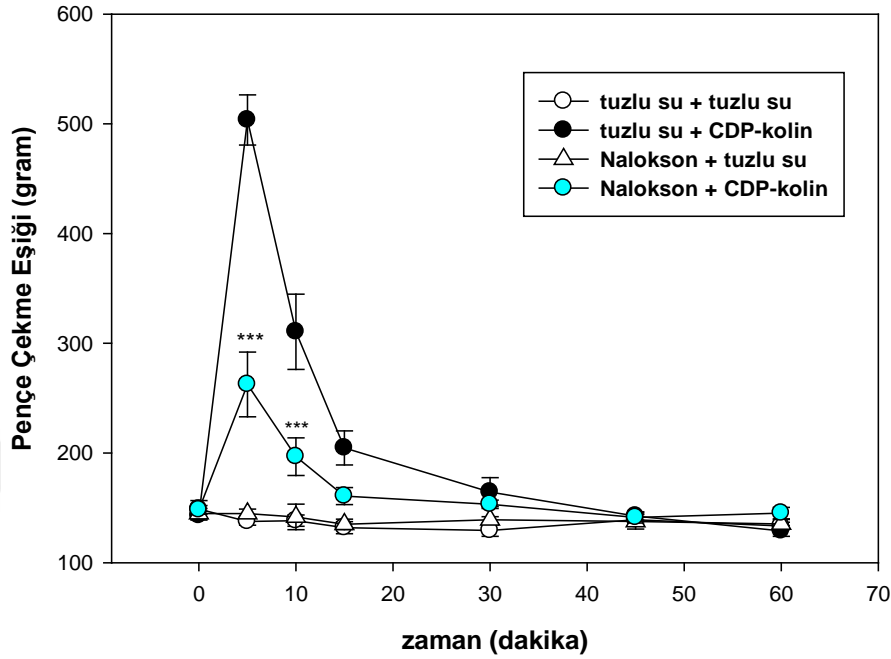
**Şekil-21:** İntraserebroventriküler yolla uygulanan CDP-kolin'in akut ağrı modelindeki analjezik etkisinde intra-NRM yolla uygulanan MLA ön tedavisinin etkisi. Mekanik pençe çekme testinde, kontrol pençe çekme yanıtı eşik değerleri alındıktan sonra intra-NRM yolla MLA (10 µg/0.5 µl) veya tuzlu su (0.5 µl) ön tedavileri uygulandı. 15 dakika sonra CDP-kolin (1 µmol/10 µl; i.s.v) veya tuzlu su (10 µl; i.s.v) enjekte edildi. İkinci enjeksiyondan sonra 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50 ve 60. dakikalarda pençe çekme yanıtı eşik değerleri ölçüldü. Değerler 5 sıçanın ortalama ± standart hatası olarak verildi. İstatistiksel değerlendirmeler iki yönlü ANOVA'yı takiben Student-Newman-Keuls testi ile yapıldı. \*\*\*p<0.001; kontrol grubuna göre anlamlı farkı göstermektedir.

## 2. İntraserebroventriküler Yolla Uygulanan CDP-kolin'in Akut Ağrıdaki Analjezik Etkisinde NRM'a Uygulanan Nalokson Ön Tedavisinin Etkisi

İntraserebroventriküler yolla uygulanan CDP-kolin'in akut ağrı modelinde oluşturduğu analjezik etkide NRM'taki opioidergik sistemin rolünü araştırmak amacıyla, CDP-kolin (1 µmol/10 µl) veya tuzlu su (10 µl) enjeksiyonundan 15 dk önce intra-NRM yolla nonspesifik opioid reseptör antagonisti nalokson (1 µg / 0.5 µl) veya tuzlu su (0.5 µl) uygulandı. CDP-kolin enjeksiyonunu takiben 5, 10, 15, 30, 45 ve 60. dakikalarda mekanik pençe çekme yanıtları ölçüldü.

Mekanik pençe çekme testinde i.s.v yolla tuzlu su veya CDP-kolin uygulaması öncesi NRM'a nalokson veya tuzlu su uygulanan sıçanların kontrol pençe çekme yanıtı eşik değerleri ortalaması  $145.8 \pm 2.3$  g (n=20) olarak ölçüldü. CDP-kolin enjeksiyonu öncesi nalokson ön tedavisi yapılan sıçanların mekanik pençe çekme yanıtı eşik değerleri 5. dakikada  $262.5 \pm 29.5$  g (n=5) olarak ölçülürken; tuzlu su ön tedavisi yapılan sıçanların pençe çekme yanıtı eşik değerleri 5. dakikada  $503.5 \pm 22$  g (n=7) olarak ölçüldü. Buna göre nalokson ön tedavisi mekanik pençe çekme testinde CDP-kolin ile ortaya çıkan analjezik etkiyi istatistiksel olarak

anlamli [ $F(1,10)=22.015$ ;  $P<0.001$ ] sekilde azaltirken tek basina mekanik pençe çekme yaniti eşik değerlerinde anlamli bir değisiklige neden olmadı ( $P> 0,05$ ) (Şekil-22).



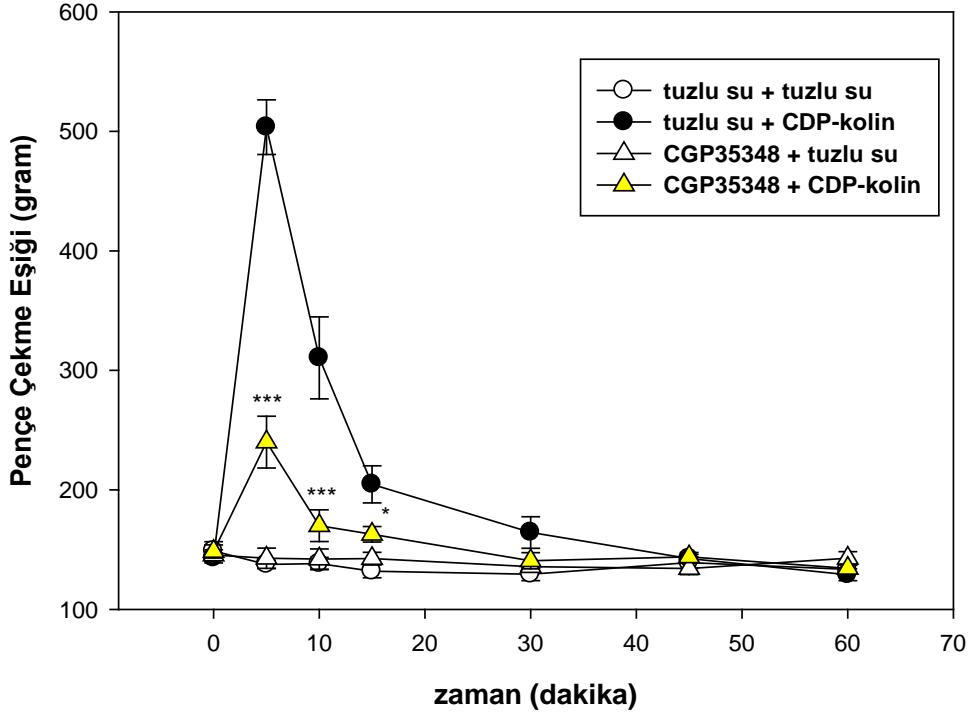
**Şekil-22:** İntraserebroventriküler yolla uygulanan CDP-kolin'in akut ağrı modelindeki analjezik etkisinde intra-NRM yolla uygulanan nalokson ön tedavisinin etkisi  
Mekanik pençe çekme testinde, kontrol pençe çekme yaniti eşik değerleri alındıktan sonra intra-NRM yolla nalokson (1  $\mu\text{g}/0.5 \mu\text{l}$ ) veya tuzlu su (0.5  $\mu\text{l}$ ) ön tedavileri uygulandı. 15 dakika sonra CDP-kolin (1  $\mu\text{mol}/10 \mu\text{l}$ ; i.s.v) veya tuzlu su (10  $\mu\text{l}$ ; i.s.v) enjekte edildi. İkinci enjeksiyondan sonra 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50 ve 60 dakikalarda pençe çekme yaniti eşik değerleri ölçüldü. Değerler 5 sıçanın ortalama  $\pm$  standart hatası olarak verildi. İstatistiksel değerlendirmeler iki yönlü ANOVA'yı takiben Student-Newman-Keuls testi ile yapıldı. \*\*\* $p<0.001$ ; kontrol grubuna göre anlamli farkı göstermektedir.

### 3. İntraserebroventriküler Yolla Uygulanan CDP-kolin'in Akut Ağrıdaki Analjezik Etkisinde NRM'a Uygulanan CGP-35348 Ön Tedavisinin Etkisi

Akut ağrı modelinde i.s.v yolla uygulanan CDP-kolin'in oluşturduğu analjezik etkide NRM'taki gabaerjik sistemin rolünü araştırmak amacıyla, CDP-kolin (1 $\mu\text{mol}/10 \mu\text{l}$ ) veya tuzlu su (10  $\mu\text{l}$ ) enjeksiyonundan 15 dk önce intra-NRM yolla  $\text{GABA}_B$  reseptör antagonisti CGP-35348 (3  $\mu\text{g}/0.5 \mu\text{l}$ ) veya tuzlu su (0.5  $\mu\text{l}$ ) uygulandı. CDP-kolin enjeksiyonunu takiben 5, 10, 15, 30, 45 ve 60. dakikalarda mekanik pençe çekme yanitları ölçüldü.

Mekanik pençe çekme testinde i.s.v yolla tuzlu su veya CDP-kolin uygulaması öncesi NRM'a CGP-35348 veya tuzlu uygulanan sıçanların kontrol pençe çekme yaniti eşik değerleri ortalaması  $146 \pm 2.4 \text{ g}$  ( $n=20$ ) olarak ölçüldü. CGP-35348 ön tedavisini takiben CDP-kolin enjeksiyonu yapılan sıçanların pençe çekme yaniti eşik değerleri 5. dakikada  $240 \pm 21.6 \text{ g}$  ( $n=5$ ) olarak ölçülürken; tuzlu su ön tedavisini takiben CDP-kolin enjeksiyonu yapılan sıçanların pençe çekme yaniti eşik değerleri 5. dakikada  $503.5 \pm 22 \text{ g}$  ( $n=7$ ) olarak

ölçüldü. Buna göre CGP-35348 ön tedavisi mekanik pençe çekme testinde, CDP-kolin ile ortaya çıkan analjezik etkiyi istatistiksel olarak anlamlı ölçüde azaltırken [ $F(1,10)=29.441$ ;  $P<0.001$ ] CGP-35348 ön tedavisi tek başına mekanik pençe çekme yanıtı eşik değerlerinde bir değişikliğe neden olmadı ( $P> 0,05$ ) (Şekil-23).



**Şekil-23:** İntraserebroventriküler yolla uygulanan CDP-kolin'in akut ağrı modelindeki analjezik etkisinde intra-NRM yolla uygulanan CGP-35348 ön tedavisinin etkisi

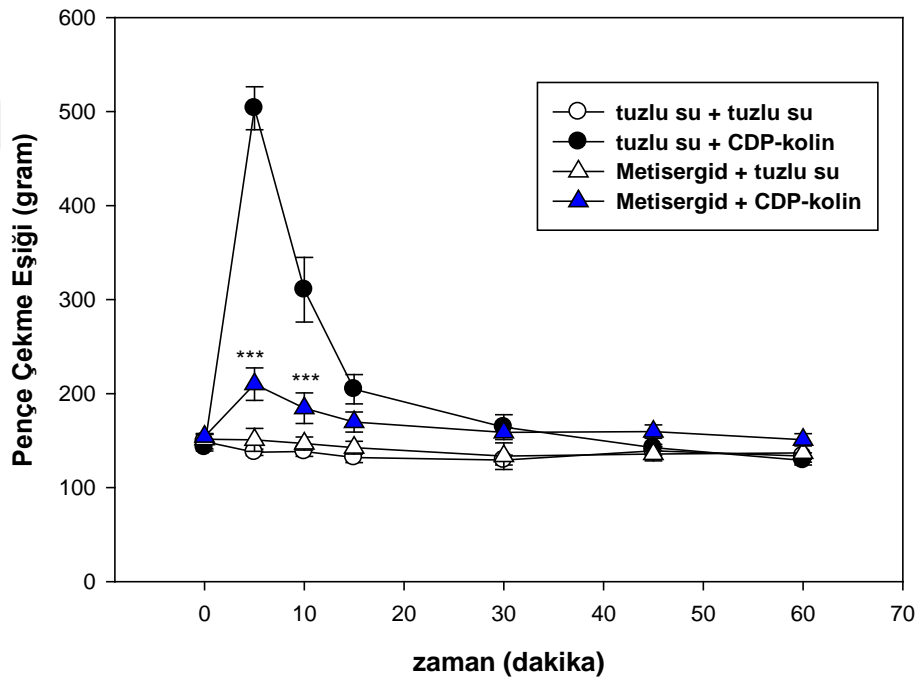
Mekanik pençe çekme testinde, kontrol pençe çekme yanıtı eşik değerleri alındıktan sonra intra-NRM yolla CDP-35348 (3 µg/0.5 µl) veya tuzlu su (0.5 µl) ön tedavileri uygulandı. 15 dakika sonra CDP-kolin (1 µmol/10 µl; i.s.v) veya tuzlu su (10 µl; i.s.v) enjekte edildi. İkinci enjeksiyondan sonra 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50 ve 60 dakikalarda pençe çekme yanıtı eşik değerleri ölçüldü. Değerler 5 sıçanın ortalama ± standart hatası olarak verildi. İstatistiksel değerlendirmeler iki yönlü ANOVA'yı takiben Student-Newman-Keuls testi ile yapıldı. \*\*\* $p<0.001$ ; kontrol grubuna göre anlamlı farkı göstermektedir.

#### 4. İntraserebroventriküler Yolla Uygulanan CDP-kolin'in Akut Ağrıdaki Analjezik Etkisinde NRM'a Uygulanan Metiserjid Ön Tedavisinin Etkisi

İntraserebroventriküler yolla uygulanan CDP-kolin'in akut ağrı modelinde oluşturduğu analjezik etkide NRM'taki serotonerjik sistemin rolünü araştırmak amacıyla, CDP-kolin (1 µmol/10 µl) veya tuzlu su (10 µl) enjeksiyonundan 15 dk önce intra-NRM yolla nonspesifik serotonerjik reseptör antagonisti metiserjid (5 µg/0.5 µl) veya tuzlu su (0.5 µl) uygulandı. CDP-kolin enjeksiyonunu takiben 5, 10, 15, 30, 45 ve 60. dakikalarda mekanik pençe çekme yanıtları ölçüldü.

Mekanik pençe çekme testinde i.s.v yolla tuzlu su veya CDP-kolin uygulaması öncesi NRM'a metiserjid veya tuzlu uygulanan sıçanların kontrol pençe çekme yanıtı eşik değerleri

ortalaması  $147.9 \pm 2.3$  g (n=20) olarak ölçüldü. Metiserjid ön tedavisini takiben CDP-kolin enjeksiyonu yapılan sıçanların mekanik pençe çekme yanıtı eşit değerleri 5. Dakikada  $189 \pm 10.4$  g (n=5) olarak ölçülürken; tuzlu su ön tedavisini takiben CDP-kolin enjeksiyonu yapılan sıçanların pençe çekme yanıtı eşik değerleri 5. Dakikada  $503.5 \pm 22$  g (n=7) olarak ölçüldü. Buna göre metiserjid ön tedavisi mekanik pençe çekme testinde, CDP-kolin ile ortaya çıkan analjezik etkiyi neredeyse tamamen engellerken  $[F(1,10)=30.962; P<0.001]$  tek başına mekanik pençe çekme yanıtı eşik değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı bir değişikliğe neden olmadı ( $P> 0,05$ ) (Şekil-24).



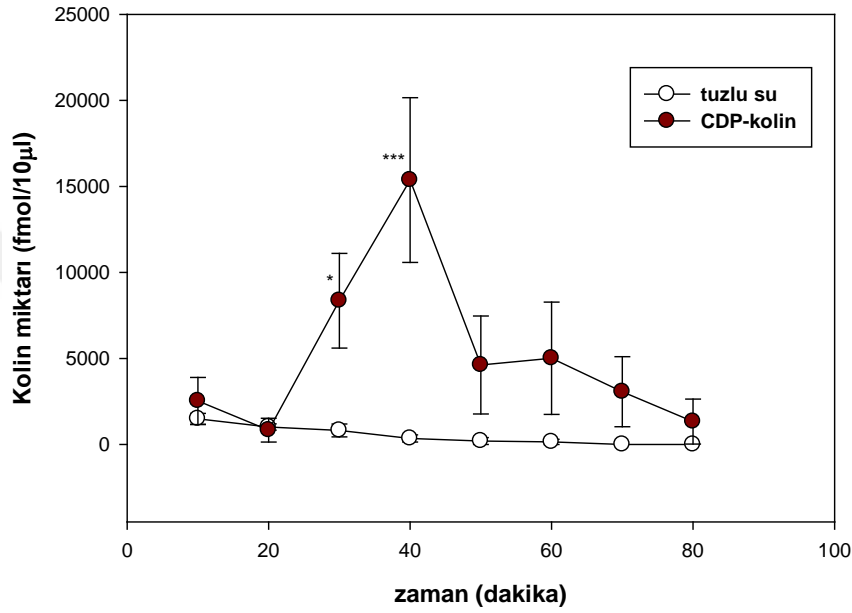
**Şekil-24:** İntraserebroventrülüler yolla uygulanan CDP-kolin'in akut ağrı modelindeki analjezik etkisinde intra-NRM yolla uygulanan metiserjid ön tedavisinin etkisi

Mekanik pençe çekme testinde, kontrol pençe çekme yanıtı eşik değerleri alındıktan sonra intra-NRM yolla metiserjid (5 µg/0.5 µl) veya tuzlu su (0.5 µl) ön tedavileri uygulandı. 15 dakika sonra CDP-kolin (1 µmol/10 µl; i.s.v) veya tuzlu su (10 µl; i.s.v) enjekte edildi. İkinci enjeksiyondan sonra 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50 ve 60 dakikalarda pençe çekme yanıtı eşik değerleri ölçüldü. Değerler 5 sıçanın ortalama ± standart hatası olarak verildi. İstatistiksel değerlendirmeler iki yönlü ANOVA'yı takiben Student-Newman-Keuls testi ile yapıldı. \*\*\*p<0.001; kontrol grubuna göre anlamlı farkı göstermektedir.

## 5. İntraserebroventriküler Yolla Uygulanan CDP-kolin'in NRM'taki ACh ve Kolin Konsantrasyonu Üzerine Etkisi

İntraserebroventriküler yolla uygulanan CDP-kolin'in NRM'taki ACh ve kolin seviyeleri üzerine etkisini araştırmak için mikrodiyaliz çalışması yapıldı. İki ardışık bazal mikrodiyaliz örneğinin toplanmasının ardından i.s.v yolla CDP-kolin veya tuzlu su enjeksiyonu yapıldı. Nukleus rafe magnustaki bazal ekstraselüler kolin düzeyi  $1466.725$  fmol/10 dk olarak hesaplanırken diyalizatlarda asetilkolin tespit edilemedi. Nukleus rafe magnustaki

ekstraselüler kolin düzeyi CDP-kolin (1 $\mu$ mol/10  $\mu$ l; i.s.v) enjeksiyonunu takiben 10 dakika sonra arttı, 20 dakika sonra en yüksek düzeyine (15367.8 fmol/10 dk) ulaştı. Yapılan iki yönlü varyans analizine göre i.s.v CDP-kolin'in NRM'taki ekstraselüler kolin seviyesini tedavi [F(1,7)=5.609; P<0.05], zaman [F(1,7)=3.614; P<0.01] ve tedavi-zaman ilişkisi [F(1,7)=3.813; P<0.01] bakımından anlamlı olarak arttırdığı görüldü. Söz konusu artış enjeksiyondan 30 dakika sonra geri döndü (Şekil-25).



**Şekil-25:** İntraserebroventriküler yolla uygulanan CDP-kolin'in NRM'taki kolin konsantrasyonuna etkisi. Onar dakika aralıklarla ardışık olarak toplanan 2 diyalizat örneğinin ardından i.s.v yolla CDP-kolin veya tuzlu su uygulandı. Uygulamayı takiben 60 dk boyunca 10 dakikada bir örnek toplandı. Değerler 5 sıçanın ortalama  $\pm$  standart hatası olarak verildi. İstatistiksel değerlendirmeler iki yönlü ANOVA'yı takiben Student-Newman-Keuls testi ile yapıldı. \*p<0.05, \*\*\*p<0.001; tuzlu su grubuna kıyasla anlamlı farkı göstermektedir.

## TARTIŞMA ve SONUÇ

Çalışmamızda akut ağrı modelinde CDP-kolin'in (i.s.v) neden olduğu analjezik etki NRM'a uygulanan mekamilamin, MLA, nalokson, CGP-35348 ve metiserjid ön tedavileri ile azalırken (Şekil-20-24), atropin ön tedavisi CDP-kolin'in söz konusu analjezik etkisini değiştirmemiştir (Şekil-19). Buna ek olarak yapılan mikrodiyaliz çalışmasında i.s.v yolla uygulanan CDP-kolin NRM'ta kolin düzeylerini arttırmıştır (Şekil-25).

Çalışmamızda ilk olarak CDP-kolin (1 µmol/10 µl) i.s.v yolla uygulanmış ve mekanik pençe çekme testi ile analjezik etki değerlendirilmiştir. Kullanılan CDP-kolin dozu, akut ağrı modelinde kullanılan CDP- kolin dozları göz önüne alınarak seçilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre akut ağrı modelinde intra-NRM tuzlu su ön tedavisinin ardından i.s.v yolla uygulanan CDP-kolin'in analjezik etkisi ve etkinin zaman profili daha önceki bulgularımızla uyumlu bulunmuştur (7-9).

L-Ek, M-Ek, β-Ep ve DynA gibi opiat peptidlerin (243) yanı sıra 5- HT, ACh, noradrenalin (NA) ve adrenalin gibi nörotransmitterlerin (104,117,244) NRM'un analjezik etkisine aracılık ettiği bilinmektedir. Yang ve arkadaşları NRM'a enjekte edilen nonspesifik opioid reseptör antagonisti nalokson, 5-HT reseptör antagonisti siproheptadin, nonspesifik muskarinik reseptör antagonisti atropin, α reseptör antagonisti fentolamin ve β reseptör antagonisti propranololün NRM'a uygulanan AVP'in indüklediği analjeziyi azalttığını göstermiştir (89). Biz de çalışmamızda öncelikle NRM'ta bulunan kolinerjik reseptörlerin i.s.v. yolla uygulanan CDP-kolin'in analjezik etkisindeki rolünü incelemeyi hedefledik. Bu amaçla ilk olarak nonspesifik nikotinik reseptör antagonisti mekamilamin ve nonspesifik muskarinik reseptör antagonisti atropin CDP kolin (1µmol/10 µl) injeksiyonundan 15 dakika önce inta-NRM yolla uygulandı. Atropin CDP-kolin'in analjezik etkisinde herhangi bir değişmeye yol açmazken (Şekil-19); mekamilamin ön tedavisi söz konusu etkiyi belirgin derecede azaltmıştır (Şekil-20). Kullanılan antagonist dozları daha önceki çalışmalardan seçilmiştir. Buna göre kullanılan atropin dozu muskarinik reseptörleri bloke etmesi için yeterli bir dozdur (179,229-230). Bununla birlikte intra-NRM yolla uygulanan atropin CDP-kolin (i.s.v)'in analjezik etkisini değiştirmemiştir. Elde ettiğimiz bu bulgulara göre CDP-kolin'in akut ağrı modelindeki analjezik etkisine NRM'ta bulunan nAChR'leri aracılık etmektedir. Bu sonuçlarımız NRM'ta bulunan kolinerjik sistemin ağrı modülasyonunda rol oynadığını gösteren çalışmalar ile uyumlu bulunmuştur. Brodie ve Proudfit NRM'a karbakol enjeksiyonunun analjezi meydana getirdiğini göstermiştir (17). Iwamoto sıçanda termal ağrı modeli kullanarak yaptığı çalışmada NRM'a direkt olarak yapılan nikotin uygulamasının

analjeziye neden olduğunu ortaya koymuştur (18). Yeni bir nikotinic reseptör agonisti olan ve ağrı çalışmalarında hedef molekül olarak sıklıkla kullanılan ABT-594'ün akut termal ağrı modelinde NRM'taki nAChR'lerini aktive ederek analjezik etki meydana getirdiği gösterilmiştir (19). Buna ek olarak Abe ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada da morfinin neden olduğu analjezik etkide NRM'taki kolinerjik nöronların aracılığı gösterilirken (20) bir başka çalışmada interiktal ve postiktal analjezide NRM'ta bulunan hem nikotinic hem de muskarinik reseptörlerin anahtar rol oynadığı görülmüştür (229). Bizim çalışmamızda NRM'ta bulunan nAChR'leri CDP-kolin'in analjezik etkisine aracılık ederken muskarinik reseptörlerin bu etkide bir rolü olmadığı görülmektedir.

Nikotinic reseptörler aracılığıyla sağlanan analjezide santral sistemde yaygın olarak bulunan nikotinic  $\alpha 4\beta 2$  ve nikotinic  $\alpha 7$  reseptör alttiplerinin major role sahip olduğu bilinmektedir (2,18-19,26). CDP-kolin'in hidroliz ürünü kolin  $\alpha 7$  nAChR alt tipine agonistik etki göstermekte ve spesifik  $\alpha 7$  nAChR antagonistlerinden MLA ve  $\alpha$ -bungaratoksin ( $\alpha$ -BTX) kolinin analjezik etkisini engellemektedir (6). Daha önceki çalışmalarımızda CDP-kolin'in analjezik etkisinin MLA; antihiperalezik etkisinin  $\alpha$ -BTX tarafından inhibe edildiğini, dolayısıyla CDP-kolin'in oluşturduğu analjezide  $\alpha 7$  nAChR alttipinin aracılığı olduğu gösterilmiştir (9-10). Bu çalışmamızda da i.s.v. yolla uygulanan CDP-kolin'in analjezik etkisinde NRM'ta bulunan  $\alpha 7$  nAChR'lerinin rolünü belirlemek amacıyla NRM'a MLA ön tedavisi uygulanmış ve elde ettiğimiz bulgulara göre MLA ön tedavisi CDP-kolin'in analjezik etkisini azaltmıştır (Şekil-21). Bununla birlikte MLA ön tedavisi ile elde edilen analjezik etki azalmasının mekamilamin ön tedavisi sonuçları ile karşılaştırıldığında daha az oranda olduğu görülmüştür. Nukleus rafe magnus bölgesinde sadece  $\alpha 7$  nAChR alttipinin değil aynı zamanda  $\alpha 4\beta 2$  nAChR alttipinin de bulunmasının bu sonuçta rol oynayabileceği düşünülmüştür. Nitekim Bitner ve arkadaşları yaptıkları çalışmada NRM'taki serotonerjik nöronların nAChR alttipi olan  $\alpha 4$  reseptörlerini içerdiğini immünohistokimyasal analizler ile göstermiştir (19). Aynı zamanda NRM'taki  $\alpha 4\beta 2$  nAChR'lerinin nikotinin supraspinal analjezik etkilerine aracılık ettiği de kanıtlanmıştır (2,18-19,245-247).

Enkefalin, endorfin ve dinorfinden oluşan endojen opiat peptid ailesinin analjezi ile ilişkili olduğu bilinmektedir (248). Ayrıca RVM'da yer alan NRM'tan inen inhibitör projeksiyonlar opioidlerin neden olduğu analjezi ile ilişkilidir (60,80-81). Buna ek olarak NRM'un hasarlanması sonucu sistemik veya intra-NRM ve intra-PAG yolla uygulanan opioidlerin analjezik etkisinin azaldığı bilinmektedir (53). Dickenson ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada morfinin NRM'a mikroenjeksiyonu analjezi oluşturmuş ve sistemik ve

intra-NRM yolla nonspesifik opioid reseptör antagonisti nalokson uygulaması söz konusu analjeziyi azaltmıştır (83). Vazquez ve arkadaşları iv yolla uygulanan dipironun indüklediği analjezide NRM'taki endojen opioidlerin etkili olduğunu (249), Yang ve arkadaşları da NRM'a opioid reseptör antagonisti uygulamasının intra-NRM AVP uygulamasının neden olduğu analjeziyi azalttığını gözlemlemiştir (89). Bu delillerden yola çıkarak, akut ağrıda santral yolla uygulanan CDP-kolin'in analjezik etkisine NRM'taki endojen opioidlerjik sistemin aracılık edebileceğini düşündük ve CDP-kolin uygulamasından önce nonspesifik opioidlerjik reseptör antagonisti olan nalokson ön tedavisi uyguladık. İntra-NRM yolla uygulanan nalokson mekanik pençe çekme testinde CDP-kolin'in analjezik etkisini belirgin bir şekilde azalttı (Şekil-22). Bu bulgu laboratuvarımızda yapılan, CDP-kolin'in analjezik ve antihiperalezik etkisinde opioid reseptörlerinin aracılığı olduğunu gösteren diğer çalışmaları da desteklemektedir (240,250). Bilindiği gibi opioidlerjik sistem ve endojen opioidler, ağrının inhibisyonundan sorumlu primer nöronların aktivasyonunu artırarak NRM'tan inen inhibe edici yolları aktive etmektedir. Sonuç olarak CDP-kolin'in neden olduğu analjezik etkinin nalokson ön tedavisi ile azalması bize NRM'tan spinal korda uzanan inhibe edici yolların aktivasyonunun CDP-kolin'in meydana getirdiği analjezik etkide aracılığı olabileceğini düşündürmektedir.

Çalışmamızın bir sonraki aşamasında NRM'ta bulunan gabaerjik sistemin CDP-kolin'in analjezik etkisindeki rolünü araştırdık. Santral sinir sisteminin ana inhibitör nörotransmiteri olan GABA ve gabaerjik sistemin ağrıyı düzenlemesi ile ilgili çelişkili bulgular mevcuttur. Ağrının inhibisyonundan sorumlu olan NRM'un primer nöronlarının GABA-aracılı sinaptik aktivasyon ile inhibe olduğu, NRM'un sekonder nöronlarının ise gabaerjik internöronlar olduğu ve ağrıyı fasilite ettikleri belirtilmiştir (84). Aynı zamanda rafe çekirdeklerindeki serotonerjik nöronların gabaerjik inhibitör sistemin etkisi altında olduğu bilinmektedir (32). Diğer yandan santral sinir sisteminin bazı bölgelerinde gabaerjik nöronların kolinerjik nikotinik reseptörler ihtiva ettiği (251-253) bilinmektedir ve bu nöronların ACh ve kolin gibi kolinerjik agonistlerin analjezik etkilerine aracılık ettikleri düşünülmektedir (254). Nitekim daha önce laboratuvarımızda yapılan çalışmalarda CDP-kolin'in analjezik ve antihiperalezik etkinliği GABA<sub>B</sub> reseptör antagonisti CGP-35348 tarafından ortadan kaldırılmıştır (240,250). Eldeki verilerden yola çıkarak uyguladığımız CGP-35348 (intra-NRM) ön tedavisi CDP-kolin'in analjezik etkisini inhibe etmiştir (Şekil-23). Elde ettiğimiz bu sonuç NRM içinde yerleşik olan GABAerjik sistemin merkezi yolla uygulanan CDP-kolin'in analjezik etkisinde rolü bulunduğunu düşündürmektedir.



Antagonist çalışmalarımızın son basamağında akut ağrı modelinde merkezi yolla uygulanan CDP-kolin'in analjezik etkisinde NRM'taki mevcut serotonerjik sistemin aracılığını araştırdık. Bilindiği gibi serotonin periferik ve santral sinir sisteminde ağrı kontrolünde önemli rolü olan bir nörotransmitterdir (255) ve yapılan deneysel ağrı çalışmalarında hem akut hem de kronik ağrı modellerindeki etkileri oldukça geniş şekilde araştırılmıştır (256-258). Buna ek olarak anatomik, elektrofizyolojik ve farmakolojik çalışmalar göstermiştir ki serotonin, ağrı modülasyonunun en önemli yollarından birisi olan PAG-RVM-spinal kord yolağını hem inhibe hem de fasilite edebilmektedir (255,259-260). Rostral ventromedial medulladaki serotonerjik hücrelerin ağrıyı çoğaltan 'on' veya ağrıyı inhibe eden 'off' hücre grubundan olmadığı (95) iddia edilse de bazı 'on' hücrelerin nörotransmitter olarak serotoninini kullandığı bilinmektedir (261-264). Son yıllarda yapılan çalışmalar ağrının inhibisyonunda RVM'da yer alan ve NRM'tan inen serotonerjik yolların rolü üzerinde yoğunlaşmış ve spinal korda ulaşan serotonerjik iletilerin ana kaynağının RVM'da yer alan NRM olduğu ortaya konmuştur (265-268). Periakuaduktal gri madde ve NRM'un elektriksel yolla uyarılması ile oluşan analjezik etki NRM'tan inen serotonerjik yolların analjezi ile ilgisi olduğunu kanıtlayan önemli bir bulgudur (269-274). Diğer bir çalışmada da 5-HT antagonistlerinin intratekal yolla uygulanmasının NRM'un stimülasyonunun neden olduğu analjeziyi azalttığı bildirilmiştir (101). Viisanen ve Pertovaara'nın yaptığı çalışmada ise nöropatik sıçanlarda primer korteksin stimülasyonu ile indüklenen analjeziye RVM'dan spinal korda uzanan serotonerjik liflerin spinal 5-HT<sub>1A</sub> reseptör aracılığıyla katkıda buldukları gösterilmiştir (275). Bu bulguların ışığında biz de çalışmamızda nonspesifik serotonerjik reseptör antagonisti metiserjid ön tedavisi uyguladık. İntra-NRM yolla uygulanan metiserjid merkezi yolla uygulanan CDP-kolin'in analjezik etkisini neredeyse tama yakın şekilde önlemiştir (Şekil-24). Laboratuvarımızda daha önce Hamurtekin ve Gurun tarafından yapılan çalışmada akut ağrı modelinde i.s.v. yolla uygulanan metiserjid, i.s.v yolla uygulanan CDP-kolin'in analjezik etkisini değiştirmemiştir (250). Bununla birlikte laboratuvarımızda yapılan bir diğer çalışmada ise kronik siyatik sinir ligasyonu uygulanarak oluşturulmuş olan nöropatik ağrı modelinde amigdalaya uygulanan metiserjid amigdala içine uygulanan CDP-kolin'in antihiperalezik etkisini ortadan kaldırmıştır (240). Bizim bu çalışmamızdan elde ettiğimiz sonuçlar CDP-kolin'in analjezik etkisinde NRM'ta bulunan serotonerjik sistemin önemli rolü olduğunu göstermektedir.

Yukarıda verilen sonuçlara dayanarak son olarak çalışmamızda i.s.v. yolla uygulanan CDP-kolin'in NRM'taki kolin ve ACh seviyeleri üzerine etkisi araştırıldı. Bu amaçla NRM içine mikrodializ probu yerleştirildi. Elde ettiğimiz sonuçlara göre CDP-kolin (1µmol/10 µl;

i.s.v) enjeksiyonunu takiben NRM'taki ekstraselüler kolin düzeyleri artış gösterirken ACh ise ölçülemedi (Şekil-25). Diyalizatlarda ACh ölçülememesinin teknik nedenlerden dolayı olduğunu düşünmekteyiz. Laboratuvarımızda daha önce Savcı ve arkadaşları tarafından yapılan mikrodiyaliz çalışmasında i.s.v. yolla uygulanan CDP-kolin'in hipotalamus ve lateral serebral ventrikülde kolin düzeyini artırdığı gösterilmiştir (179). Aynı araştırmacıların yaptıkları bir ön çalışmada ise i.s.v yolla CDP-kolin uygulamasını takiben lateral serebral ventrikül ve corpus striatumda ACh seviyesinde artış olduğu gözlenmiştir. Çalışmamızda CDP-kolin (i.s.v)'in NRM'ta kolin düzeylerini artırıyor olması şu ana kadar elde ettiğimiz bulgularla uyumludur. Buna göre ventrikül içine verilen CDP-kolin süratle hidroliz olmakta ve NRM'ta artan kolin bu bölgedeki kolinerjik nörotransmisyonu arttırmaktadır.

Sonuç olarak NRM'un ve burada bulunan kolinerjik, opioidergik, GABAergik ve serotonergik sistemin i.s.v yolla uygulanan CDP-kolin'in analjezik etkisinde önemli rolleri bulunmaktadır. CDP- kolin uygulamasını takiben NRM bölgesinde artan kolinin öncelikle  $\alpha 7$  nAChR olmak üzere diğer nAChR'ler aracılığı ile opioidergik, GABAergik ve serotonergik sistemi aktive ettiği düşünülmektedir. Bu çalışmada elde ettiğimiz veriler, NRM'un santral yoldan verilen CDP-kolin'in, analjezik etkilerine aracılık ettiğini ilk kez ortaya koyması bakımından önemlidir. Bulgularımız NRM'un ve nAChR'lerinin analjezik ilaç geliştirmede önemli birer hedef oldukları düşüncesini pekiştirmektedir ve CDP-kolin ile elde ettiğimiz veriler ağrının farmakolojik tedavisi konusunda yapılacak daha sonraki araştırmalara ışık tutacaktır.

## KAYNAKLAR

1. WANG Y, SU DM, WANG RH, LIU Y, WANG H. Antinociceptive effects of choline against to acute and inflammatory pain. *Neuroscience*, 132: 49-56, 2005.
2. DECKER MW, MEYER MD. Therapeutic potential of neuronal nicotinic acetylcholine receptor agonist as novel analgesics. *Biocem Pharmacol*, 58: 917-923, 1999.
3. DECKER MW, MEYER MD, SULLIVAN JP. The therapeutic potential of nicotinic acetylcholine receptor agonists for pain control. *Expert Opin Investig Drug*, 10: 1819-1830, 2001.
4. FLORES CM. The promise and pitfalls of a nicotinic cholinergic approach to pain management. *Pain*, 88: 1-6, 2000.
5. VINCLER M. Neuronal nicotinic receptors as targets for novel analgesics. *Expert Opin Investig Drugs*, 14: 1191-8, 2005.
6. DAMAJ MI, MEYER EM, MARTIN BR. The antinociceptive effects of alpha7 nicotinic agonists in an acute pain model. *Neuropharmacology*, 39: 2785-91, 2000.
7. HAMURTEKIN E, GURUN MS. The antinociceptive effects of centrally administered CDP-choline on acute pain models in rats: the involvement of cholinergic system. *Brain Res*, 1117: 92-100, 2006.
8. BAGDAS D, SONAT FA, HAMURTEKIN E, SONAL S, GURUN MS. The antihyperalgesic effect of cytidine-5'-diphosphate-choline in neuropathic and inflammatory pain models. *Behav Pharmacol*, 22(5-6): 589-98, 2011.
9. GURUN MS, PARKER R, EISENACH JC, VINCLER M. The effect of peripherally administered CDP-choline in an acute inflammatory pain model: the role of alpha7 nicotinic acetylcholine receptor. *Anesth Analg*, 108: 1680-7, 2009.
10. KANAT O, BAGDAS D, OZBOLUK HY, GURUN MS. Preclinical evidence for the antihyperalgesic activity of CDP-choline in oxaliplatin-induced neuropathic pain. *J Buon*, 18(4): 1012-8, 2013
11. BASBAUM A, FIELDS HL. The origin of descending pathways in the dorsolateral funiculus of the spinal cord of the cat and rat: further studies on the anatomy of pain modulation. *J Comp Neurol*, 187(3): 513-31, 1979.
12. MILLAN MJ, PRZEWLOCKI R, HERZ A. A non-beta-endorphinergic adenohipophyseal mechanism is essential for an analgetic response to stress. *Pain*, 8: 343-53, 1980.
13. GOGAS KR, PRESLEY RW, LEVINE JD, BASBAUM AI. The antinociceptive action of supraspinal opioids results from an increase in descending inhibitory control: correlation of nociceptive behavior and c-fos expression. *Neuroscience*, 42: 617-28, 1991.
14. BOWKER RM, WESTLUND KN, SULLIVAN MC, COULTER JD. Organization of descending serotonergic projections to the spinal cord. *Prog Brain Res*, 57: 239-65, 1982.
15. JONES SL, LIGHT AR. Electrical stimulation in the medullary nucleus raphe magnus inhibits noxious heat-evoked protein-like immunoreactivity in the rat lumbar spinal cord. *Brain Res*, 530: 335-8, 1990.
16. OLESON TD, TWOMBLY DA, LIEBESKIND JC. Effects of pain-attenuating brain stimulation and morphine on electrical activity in the raphe nuclei of the awake rat. *Pain*, 4: 211-30, 1978.

17. BRODIE MS, PROUDFIT HK. Antinociception induced by local injections of carbAChol into the nucleus raphe magnus in rats: alteration by intrathecal injection of monoaminergic antagonists. *Brain Res*, 371: 70-9, 1986.
18. IWAMATO ET. Characterization of the antinociception induced by nicotine in the pedunculopontine tegmental nucleus and the nucleus raphe magnus. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 257(1): 120-33, 1991.
19. BITNER RS, NIKKEL AL, CURZON P, et al. Role of the Nucleus Raphe Magnus in antinociception produced by ABT-594: immediate early gene responses possibly linked to neuronal nicotinic acetylcholine receptors on serotonergic neurons. *The Journal of Neuroscience*, 18(14): 5426-5432, 1998.
20. ABE K, ISHIDA K, KATO M, et al. Effect of morphine-induced antinociception is altered by AF64A-induced lesions on cholinergic neurons in rat nucleus raphe magnus. *Acta Pharmacol Sin*, 23 (11): 961-966, 2002.
21. MILEIKOVSKII BY, NOZDRACHEV AD. Electrophysiological analysis of the interaction of the neuron population of the pons and the medulla oblongata involved in the inhibition of motor activity. *Ros Fiziol Zh im IM Sechenova*, 11-12: 57-63, 1997.
22. CAO Y, MATSUYAMA K, FUJITO Y, AOKI M. Involvement of medullary GABAergic and serotonergic raphe neurons in respiratory control: Electrophysiological and immunohistochemical studies in rats. *Neurosci Res.*, 56: 322-331, 2006.
23. SILVA LFS, MENESCAL-de-OLIVEIRA L. Role of opioidergic and GABAergic neurotransmission of the nucleus raphe magnus in the modulation of tonic immobility in guinea pigs. *Brain Res Bull*, 72: 25-31, 2007.
24. KERMAN IA, SHABRANG C, TAYLOR L, AKIL H, WATSON SJ. Relationship of presynaptic transmitter system-premotor neurons to the serotonergic transmitter system in the brainstem. *J Comp Neurol*, 499: 882-896, 2006.
25. MASON P. Contributions of the medullary raphe and ventromedial reticular region to pain modulation and other homeostatic functions. *Ann Rev Neurosci*, 24: 737-777, 2001.
26. MASON P. Deconstructing endogenous pain modulations. *J Neurophysiol*, 94: 1659-1663, 2005.
27. MASON P, GAO K, GENSEN JR. Serotonergic raphe magnus cell discharge reflects ongoing autonomic and respiratory activities. *J Neurophysiol*, 98: 1919-1927, 2007.
28. NASON MW, MASON P. Medullary raphe neurons facilitate brown adipose tissue activation. *J Neurosci*, 26: 1190-1198, 2006.
29. URBAIN N, CREAMER K, DEBONNEL G. Electrophysiological diversity of the dorsal raphe cells across the sleep-wake cycle of the rat. *J Physiol*, 573: 679-695, 2006.
30. VERNER TA, GOODCHILD AK, POKOWSKY PM. A mapping study of cardiorespiratory responses to chemical stimulation of the midline medulla oblongata in ventilated and freely breathing rats. *Am J Physiol*, 287: R411-21, 2004.
31. VIANNA DML, ALLEN C, CARRIVE P. Cardiovascular and behavioral responses to conditioned fear after medullary raphe neuronal blockade. *Neuroscience*, 153: 1344-1353, 2008.

32. INYUSHKIN AN, MERKULOVA NA, ORLOVA AO, INYUSHKINA EM. Local gabaergic modulation of the activity of serotonergic neurons in the nucleus raphe magnus. *Neuroscience and Behavioral Physiology*, 95(7): 750-61, 2009.
33. HELMAN KM, BRINKS TS, MASON P. Activity of murine magnus raphe cells predicts tAChypnea and on-going nociceptive responsiveness. *Journal of Neurophysiology*, 98(6): 3121- 33, 2007.
34. LOESER JD, MELZACK R. Pain: an overview. *Lancet*, 353(9164): 1607-9, 1999.
35. FROLICH JC. A classification of NSAIDS according to the relative inhibition of cyclooxygenase isoenzymes. *Trends Pharmacol Sci*, 18: 30-34, 1997.
36. KINGERY WS. A critical review of controlled clinical trials for peripheral neuropathic pain and complex regional pain syndromes. *Pain*, 73:123-139, 1997.
37. MCQUAY H. Opioids in pain management. *Lancet*, 353: 2229-2232, 1999.
38. DAHLSTROM A, FUXE K. Evidence for the existence of monoamine containing neurons in the central nervous system. *Acta Physiol Scand*, 62 (232): 1-55, 1964.
39. DAVAL G, VERGE D, BASBAUM AI, BOURGOIN S, HARMON M. Autoradiographic evidence of serotonin binding sites on primary afferent fibers in the dorsal horn of the rat spinal cord. *Neurosci Lett*, 83: 71-76, 1987.
40. LAUDER JM, WALLACE JA, KREBS H, PETRUSZ P, MCCARTHY K. In vivo and in vitro development of serotonergic neurons. *Brain Res Bull*, 9: 605-625, 1982.
41. GALTER D, UNSICKER K. Regulation of the transmitter phenotype of rostral and caudal groups of cultured serotonergic raphe neurons. *Neurosci*, 88(2): 549-559, 1998.
42. AITKEN AR, TORK I. Early development of serotonin-containing neurons and pathways as seen in whole-mount preparation of the fetal rat brain. *J Comp Neurol*, 274: 32-47, 1988.
43. ALTMAN J, BAYER SA. Development of the brain stem in the rat. *J Comp Neurol*, 198: 677-716, 1981.
44. BAUMGARTEN HG, GROZDANOVIC Z. Serotonergic neurons and 5-HT receptors in the CNS. In: Baumgarten HG, Göthert M (eds). *Handbook of Experimental Pharmacology*, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 129: 41-88, 1997.
45. HERMANN DM, LUPPI PH, PEYRON C, HINCKEL P, JOUVET M. Afferent projections to the rat nuclei raphe magnus, raphe pallidus and reticularis gigantocellularis pars a demonstrated by iontophoretic application of cholera toxin (subunit b). *Journal of Chemical Neuroanatomy*, 13:1-21, 1997.
46. STEINBUSCH HWM. Distribution of serotonin-immunoreactivity in the central nervous system of the rat-cell bodies and terminals. *Neuroscience*, 6: 557-618, 1981.
47. TAKAGI H, SHIOSAKA S, TOHYAMA M, SENBA E, SAKANAKA M. Ascending components of the medial forebrain bundle from the lower brain stem in the rat, with special reference to raphe and catecholamine cell groups. A study by the HRP method. *Brain Res*, 193: 315-337, 1980.
48. BOWKER RM. The relationship between descending serotonin projections and ascending projections in the nucleus raphe magnus: A double labeling study. *Neurosci Lett*, 70: 348-353, 1986.
49. HERMANN DM, LUPPI PH, HINCKEL P, JOUVET M. Afferent projections to the rostral nucleus raphe pallidus by iontophoretic application of cholera toxin b. *Soc Neurosci Abstr*, 20 (2): 1180, 1994.

50. SIM LJ, JOSEPH SA. Efferent projections of the nucleus raphe magnus. *Brain Res Bull*, 28(5): 679-82, 1992.
51. FIELDS HL, BASBAUM AI. Brain stem control of spinal pain transmission neurons. *Annu Rev Physiol*, 40: 193-221, 1978.
52. DUBNER R, BENNETT GJ. Spinal and trigeminal mechanisms of nociception. *Annu Rev Neurosci*, 6: 381-418, 1983.
53. BASBAUM AI, FIELDS HL. Endogenous pain control systems: brain stem spinal pathway; and endorphin circuitry. *Annu Rev Neurosci*, 7: 309-338, 1984.
54. GEBHART GF. Modulatory effects of descending system on spinal dorsal horn neurons. In: Yaksh TL (eds), *Spinal Afferent Processing*, Plenum, New York, pp. 391-416, 1986.
55. BESSON JM, CHAOUCH A. Peripheral and spinal mechanisms of nociception. *Physiol Res*, 172: 243-257, 1987.
56. DUGGAN AW, MORTON CR. Tonic descending inhibition and spinal nociceptive transmission. *Prog Brain Res*, 77: 193-211, 1988.
57. OLIVERAS JL, REDJEMI F, GUILBAUD G, BESSON JM. Analgesia induced by electrical stimulation of the inferior centralis nucleus of the raphe in the cat. *Pain*, 1: 139-145, 1975.
58. WILLIS WD, HABER LH, MARTIN RF. Inhibition of spinothalamic tract cells and interneurons by brain stem stimulation in the monkey. *J Neurophysiol*, 40: 968-981, 1977.
59. JENSEN TS, YAKSH TL. Spinal monoamine and opiate systems partly mediate the antinociceptive effects produced by glutamate at brain stem sites. *Brain Res*, 321: 287-289, 1984.
60. FIELDS HL, HEINRICHER MM, MASON P. Neurotransmitters in nociceptive modulatory circuits. *Annu Rev Neurosci*, 14: 219-245, 1991.
61. MCGOWAN MK, HAMMOND DL. Intrathecal GABA<sub>B</sub> antagonists attenuate the antinociception produced by microinjection of  $\lambda$ -glutamate into the ventromedial medulla of the rat. *Brain Res*, 607: 39-46, 1993.
62. FOONG FW, DUGGAN AW. Brain stem areas tonically inhibiting dorsal horn neurones: studies with microinjection of the GABA analogue piperidine-4-sulphonic acid. *Pain*, 27: 361-372, 1986.
63. DROWER E, HAMMOND DL. GABAergic modulation of nociceptive threshold: effects of THIP and bicuculline microinjected in the ventral medulla of the rats. *Brain Res*, 450: 316-324, 1988.
64. HEINRICHER MM, KAPLAN HJ. GABA-mediated inhibition in the rostral ventromedial medulla: role in nociceptive modulation in the lightly anesthetized rat. *Pain*, 47: 105-113, 1991.
65. MCCREERY DB, BLOEDEL JR, HAMES EG. Effects of stimulating in raphe nuclei and in reticular formation on response of spinothalamic neurons to mechanical stimuli. *J Neurophysiol*, 42: 166-182, 1979.
66. HABER LH, MARTIN RF, CHUNG JM, WILLIS WD. Inhibition and excitation of primate spinothalamic tract neurons by stimulation in region of nucleus reticularis gigantocellularis. *J Neurophysiol*, 43: 1578-1593, 1980.
67. MCMAHON SB, WALL PD. Descending excitation and inhibition of spinal cord lamina I projection neurons. *J Neurophysiol*, 59: 1204-1219, 1988.
68. ZHUO M, GEBHART GF. Characterization of descending inhibition and facilitation of spinal nociceptive transmission from the nuclei reticularis gigantocellularis and gigantocellularis pars alpha in rat. *Pain*, 42: 337-350, 1990.

69. ZHUO M, GEBHART GF. Characterization of descending facilitation and inhibition of spinal nociceptive transmission from the nuclei reticularis gigantocellularis and gigantocellularis pars alpha in the rat. *J Neurophysiol*, 67: 1599-1614, 1992.
70. FIELDS HL, BASBAUM AJ, CLANTON CH, ANDERSON SD. Nucleus raphe magnus inhibition of spinal cord dorsal horn neurons. *Brain Res*, 126: 441-453, 1977.
71. WILLIS WD, WESTLUND KN. Neuroanatomy of the pain system and of the pathways that modulate pain. *J Clin Neurophysiol*, 14(1): 2-31, 1997.
72. FIELDS HL, BASBAUM AJ. Brainstem control of spinal pain transmission neurons. *Annu Rev Phys*, 40: 217-248, 1978.
73. BESSON JM, CHAOUCH A. Peripheral and spinal mechanisms of nociception. *Physiol Rev*, 67: 67-186, 1987.
74. BEHBEHANI MM. The role of acetylcholine in the function of the nucleus raphe magnus and in the interaction of this nucleus with the periaqueductal gray. *Brain Res*, 252: 299-307, 1982.
75. BRODIE MS, PROUDFIT HK. Antinociception induced by local injections of carbachol into the nucleus raphe magnus in rats: alteration by intrathecal injection of monoaminergic antagonists. *Brain Res*, 371: 70-9, 1986.
76. BASBAUM AI, CLANTON CH, FIELDS HL. Opiate and stimulusproduced analgesia: Functional anatomy of a medullospinal pathway. *Proc Natl Acad Sci USA*, 73: 4685-4688, 1976.
77. PROUDFIT HK. Pharmacologic evidence for the modulation of nociception by noradrenergic neurons. In: Fields HL, Besson JM (eds). *Progress in Brain Research*, vol. 77, Elsevier Science Publishers, Amsterdam, pp. 357-370, 1988.
78. CURZON P, BITNER RS, NIKKEL AL, et al. Central mechanisms involved in ABT-594 antinociception. *Soc Neurosci Abstr*, 23: 1200, 1997.
79. BANNON AW, DECKER MW, HOLLADAY MW, et al. Broad spectrum, non-opioid analgesic activity by selective modulation of neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *Science*, 279: 77- 81, 1998.
80. PROUDFIT HK, YEOMANS DC. The modulation of nociception by enkephalin-containing neurons in the brainstem. In: Tseng L, ed. *The pharmacology of opioid peptides*, Harwood Academic Publishers, UK, pp.197-217, 1995.
81. HABER S, ELDE R. The distribution of enkephalin immunoreactive fibers and terminals in the monkey central nervous system: an immunohistochemical study. *Neuroscience*, 7: 1049-95, 1982.
82. LU Y, SWEITZER SM, LAURITO CE, YEOMANS DC. Differential opioid inhibition of C- and Ad-fiber mediated thermonociception after stimulation of the nucleus raphe magnus. *Anesth Analg*, 98: 414-9, 2003.
83. DICKENSON AH, OLIVERAS JL, BESSON JM. Role of the nucleus raphe magnus in opiate analgesia as studied by the microinjection technique in the rat. *Brain Res*, 170: 95-111, 1979.
84. PAN ZZ, WILLIAMS JT, OSBOURNE PB. Opioid actions on single nucleus raphe magnus neurons from rat and guinea-pig in vitro. *Journal of Physiology*, 427: 519-532, 1990.
85. BOWKER RM, DILTS RP. Distribution of  $\mu$ -opioid receptors in the nucleus raphe magnus and nucleus gigantocellularis: a quantitative autoradiographic study. *Neuroscience Letters*, 88: 247-252, 1988.
86. MANSOUR A, KHACHATURIAN H, LEWIS ME, AKIL H, WATSON SJ. Anatomy of CNS opioid receptors. *Trends in Neurosciences*, 11: 308-314, 1988.

87. FIELDS HL, VANEGAS H, HENTALL ID, ZORMAN G. Evidence that disinhibition of brain stem neurons contributes to morphine analgesia. *Nature*, 306: 684-686, 1983.
88. FIELDS HL, BARBARO NM, HEINRICHER MM. Brain stem neuronal circuitry underlying the antinociceptive action of opiates. *Progress in Brain Research*, 77: 245-257, 1988.
89. YANG J, YUAN HUIFENG Y, CHU J, et al. Arginine vasopressin antinociception in the rat nucleus raphe magnus is involved in the endogenous opiate peptide and serotonin system. *Peptides*, 30: 1355-1361, 2009.
90. HOMUNG JP. The human raphe nuclei and the serotonergic system. *J Chem Neuroanat*, 26: 331-343, 2003.
91. POTREBIC SB, FIELDS HL, MASON P. Serotonin immunoreactivity is contained in one physiological cell class in the rat rostral ventromedial medulla. *J Neurosci*, 14: 1655-1665, 2003.
92. DEAKIN JF, DOSTROVSKY JO. Involvement of the periaqueductal grey matter and spinal 5-hydroxytryptaminergic pathways in morphine analgesia: effects of lesions and 5-hydroxytryptamine depletion. *Br J Pharmacol*, 63: 159-165, 1978.
93. KAPLAN H, FIELDS HL. Hyperalgesia during acute opioid abstinence: evidence for a nociceptive facilitating function of the rostral ventromedial medulla. *J Neurosci*, 11: 1433-1439, 1991.
94. FIELDS HL, BRY J, HENTALL I, ZORMAN G. The activity of neurons in the rostral medulla of the rat during withdrawal from noxious heat. *J Neurosci*, 3: 2545-2552, 1983.
95. GAO K, MASON P. Serotonergic raphe magnus cells that respond to noxious tail heat are not on or off cells. *J Neurophysiol*, 84: 1719-1725, 2000.
96. DAHLSTORM A, FUXE K. Evidence for the existence of monoamine-containing neurons in the central nervous system. I. Demonstration of monoamine in the cell bodies of brain stem neurons. *Acta Physiol Scand*, 232: 1-36, 1964.
97. JOHANSSON O, HOKFELT T, PERNOW B, et al. Immunohistochemical support for three putative transmitters in one neuron: coexistence of 5-hydroxytryptamine, substance P- and thyrotropin releasing hormone-like immunoreactivity in medullary neurons projecting to the spinal cord. *Neuroscience*, 6: 1857-1881, 1981.
98. OLIVERAS JL, BOURGIN S, HERY F, BESSON JM, HAMON M. The topographical distribution of serotonergic terminals in the spinal cord of the cat: biochemical mapping by the combined use of microdissection and microassay procedures. *Brain Res* 138: 393-406, 1977.
99. BARBARO NM, HAMMOND DL, FIELDS HL. Effects of intrathecally administered methysergide and yohimbine on microstimulation-produced antinociception in the rat. *Brain Res*, 343: 223-229, 1985.
100. HAMMOND DL, YAKSH TL. Antagonism of stimulation-produced antinociception by intrathecal administration of methysergide or phentolamine. *Brain Res*, 298: 329-337, 1984.
101. JENSEN TS, YAKSH TL. Examination of spinal monoamine receptors through which brainstem opiate-sensitive systems act in the rat. *Brain Res* 363: 114-127, 1986.
102. VASKO MR, PANG IH, VOGT M. Involvement of 5-hydroxytryptamine-containing neurons in antinociception produced by injection of morphine into nucleus raphe magnus or onto spinal cord. *Brain Res* 306: 341-348, 1984.



103. ZHUO M, GEBHART GF. Spinal serotonin receptors mediate descending facilitation of a nociceptive reflex from the nuclei reticularis gigantocellularis and gigantocellularis pars alpha in the rat. *Brain Res* 550: 35–48, 1991.
104. De OLIVEIRA RC, de OLIVEIRA R, FERREIRA CMR, COIMBRA NC. Involvement of 5-HT<sub>2</sub> serotonergic receptors of the nucleus raphe magnus and nucleus reticularis gigantocellularis/paragigantocellularis complex neural networks in the antinociceptive phenomenon that follows the post-ictal immobility syndrome. *Exp Neurol*, 201: 144–53, 2006.
105. CHALMERS DT, WATSON SJ. Comparative anatomical distribution of 5-HT<sub>1A</sub> receptor mRNA and 5-HT<sub>1A</sub> binding in rat brain—a combined in situ hybridization/in vitro receptor autoradiographic study. *Brain Res*, 561: 51-60, 1991.
106. STEINBUSCH HWM. Distribution of serotonin-immunoreactivity in the central nervous system of the rat. Cell bodies and terminals, *Neuroscience*, 6: 557-618, 1981.
107. GLENNON RA, NAIMAN NA, PIERSON ME, et al. NAN-190: an arylpiperazine analog that antagonizes the stimulus effects of the 5-HT agonist 8-hydroxy 2-(di-*n*-propylamino)tetralin (8-OH-DPAT). *Eur J Pharmacol.*, 15: 339–341, 1988.
108. ZHANG Y, GAO X, JI G, HUANG Y, WU G. Expression of 5-HT<sub>2A</sub> receptor mRNA in rat nucleus raphe magnus neurons after peripheral inflammation. *Acta Pharmacol Sin*, 22(10): 923-8, 2001.
109. De OLIVEIRA RC, de OLIVEIRA R, dos REIS FERREIRA CM, COIMBRA NC. Involvement of 5-HT<sub>2</sub> serotonergic receptors of the nucleus raphe magnus and nucleus reticularis gigantocellularis/paragigantocellularis complex neural networks in the antinociceptive phenomenon that follows the post-ictal immobility syndrome. *Experimental Neurology*, 201: 144-153, 2006.
110. ZHANG Y, GAO X, YANG Z, HUANG Y, WU G. Expression of 5-HT<sub>1A</sub> receptor mRNA in rat nucleus raphe magnus neurons after peripheral inflammation. *Brain Research*, 887: 465-468, 2000.
111. HASEGAWA S, FIKRE-MERID M, DIKSIC M. 5-HT<sub>2A</sub> receptor antagonist M100907 reduces serotonin synthesis: An autoradiographic study. *Brain Res Bull*, 87(1): 4, 2012.
112. MILLHORN DE, HOKFELT T, SEROOGY K, VERHOFSTAD A. Extent of colocalization of serotonin and GABA in neurons of the ventral medulla oblongata in rat. *Brain Res*, 461: 169-174, 1988.
113. NAGAI T, MAEDA H, IMAI H, MCGEER PL, MCGEER EG. Distribution of GABA-T-intensive neurons in the rat hindbrain. *J Comp Neurol*, 231: 260-269, 1985.
114. RENNO WM, ALKHALAF M, MOUSA A, KANAAN RA. A comparative study of excitatory and inhibitory amino acids in three different brainstem nuclei. *Neurochem Res*, 33: 150-159, 2008.
115. HAWS CM, HEINRICHER MM, FIELDS HL.  $\alpha$ -adrenergic receptor agonists, but not antagonists, alter the tail-flick latency when microinjected into the rostral ventromedial medulla of the lightly anesthetized rat. *Brain Res*, 533: 192-5, 1990.
116. KANDA T, OHTA Y, KIDA A, KEMMOTSU O. The Effect of  $\alpha$ 2-Adrenergic Drugs on the Activity of Neurons in the Rat Nucleus Raphe Magnus In Vitro. *Anesth Analg*, 88: 459-61, 1999.
117. BIE B, FIELDS HL, WILLIAMS JT, PAN ZZ. Roles of  $\alpha$ 1- and  $\alpha$ 2-adrenoceptors in the nucleus raphe magnus in opioid analgesia and opioid

- abstinence-induced hyperalgesia. *The Journal of Neuroscience*, 23(21): 7950 – 7957, 2003.
118. BONICA JJ. The management of pain, vol. 1, Lea&Febiger Press, Philadelphia, London, 1990.
  119. MIZUMURA K. Peripheral mechanisms of hyperalgesia – sensitization of nociceptors. *Nagoya J Med Sci*, 60: 69-87, 1997.
  120. LOESER JD, BUTLER SH, CHAPMAN CR, TURK DC (eds). *Bonica's Management of Pain*, 3rd edition, Lippincott Williams & Wilkins (LWW), 2001.
  121. MCMAHON S, KOLTZENBURG M (eds). *Wall and Melzack's Textbook of Pain*, 5th edition, Churchill Livingstone, 2005.
  122. URCH C. Normal Pain Transmission. *Pain*, 1: 2, 2007.
  123. Physiology and psychology of acute pain. In: MACINTYRE PE, SCOTT DA, SCHUG SA, VISSER EJ, WALKER SM (eds). *Acute Pain Management: Scientific Evidence*, 3th edition, Anzca&FPM, Melbourne, 2010.
  124. SANTOS-NOGUEIRA E, CASTRO ER, MANCUSO R, NAVARRO X. Randall-Selitto Test: A New Approach for the Detection of Neuropathic Pain after Spinal Cord Injury. *Journal of Neurotrauma* 29: 898-904, 2012.
  125. RANDALL LO, SELITTO JJ. A method for measurement of analgesic activity on inflamed tissue. *Arch Int Pharmacodyn Ther.*, 111(4): 409-19, 1957.
  126. HERZ A. Actions of arecoline on the central nervous system. *Naunyn-Schmiedelbergs Arch Exp Patimol Pharmacoi*, 242: 414-429, 1962.
  127. CHEN G. The anti-tremorine effect of some drugs as determined by Hoffner's method of, testing analgesia in mice. *J. Pharmacol Exp Ther*, 124: 73-76, 1958.
  128. HARRIS LS, DEWEY WL, HOWES JF. The tail-flick test, cholinergic mechanisms. *Fed Proc*, 27: 753, 1968.
  129. DOMINO EF. Effects of narcotic analgesics on sensory input, activating system and motor. *Proc Ass Res Nerv Ment Dis*, 46: 117-149, 1968.
  130. LITS RKS. A revised concept of the mechanism of analgesia anti pain. In: Knigimton RS, Cumke PB (eds). *Pain*, Little, Brown and Company, Boston, 1966.
  131. MARTIN WR, ZARDES CG. Strong analgesics. In: Rost WS and Hormann FG (eds). *Physiological Pharmacology*, vol. 1, Academic Press, New York, pp. 275-312, 1963.
  132. WINTER CA. The physiology and pharmacology of pain and its relief. In: DeStevens G. *Analgetics*, Academic Press, New York, pp. 9-74, 1965.
  133. SAXENA PN. Mechanism of cholinergic potentiation of morphine analgesia. *Indian J. Med. Res.*, 46: 653-658, 1958.
  134. SLAUGHTER D, MUNSELL DW. Some new aspects of morphine action effects on pain. *J Pharmacoi Exp Ther*, 68: 104-112, 1940.
  135. CHRISTENSEN EM, GROSS EG. Analgesic effects in human subjects of morphine, meperidine, and methadon. *J Amer Med Ass*, 137: 594-598, 1948.
  136. PEDIGO NW, WILLIAM LD, LOUIS SH. Determination and characterization of the antinociceptive activity of intraventricularly administered acetylcholine in mice. *J Pharmacol Exp Ther*, 193: 845-852, 1975.
  137. IWAMATO ET. Antinociception after Nicotine Administration into the Mesopontine Tegmentum of Rats: Evidence for Muscarinic Actions. *J Pharmacol Exp Ther*, 251(2): 412-21, 1989.
  138. POMERLAU OF. Nicotine as a psychoactive drug: anxiety and pain reduction. *Psychopharmacol Bull*, 22: 865–869, 1986.
  139. JAMNER LD, GIRDLER SS, SHAPIRO D, JARVIK ME. Pain inhibition, nicotine, and gender. *Exp Clin Psychopharmacol*, 6: 96–106, 1998.

140. PICCIOTTO MR, CALDARONE BJ, KING SL, ZACHARIOU V. Nicotinic receptors in the brain: links between molecular biology and behavior. *Neuropsychopharmacology*, 22: 451–465, 2000.
141. MARUBIO LM, CHANGEUX J. Nicotinic acetylcholine receptor knockout mice as animal models for studying receptor function. *Eur J Pharmacol*, 393: 113–121, 2000.
142. KESINGLAND AC, GENTRY CT, PANESAR MS, et al. Analgesic profile of the nicotinic acetylcholine receptor agonists, (+)-epibatidine and ABT-594 in models of persistent inflammatory and neuropathic pain. *Pain* 86: 113–118, 2000.
143. BOYCE S, WEBB JK, SHEPHEARD SL, et al. Analgesic and toxic effects of ABT-594 resemble epibatidine and nicotine in rats. *Pain* 85: 443–450, 2000.
144. MEYER MD, DECKER MW, RUETER LE, et al. The identification of novel structural compound classes exhibiting high affinity for neuronal nicotinic acetylcholine receptors and analgesic efficacy in preclinical models of pain. *Eur J Pharmacol* 393: 171–177, 2000.
145. BRODIE RS, LESLIE FM. The alpha7 nicotinic acetylcholine receptor in neuronal plasticity. *Mol Neurobiol* 20: 1–16, 1999.
146. GENZEN JR, VAN CLEVE W, MCGEHEE DS. Dorsal root ganglion neurons express multiple nicotinic acetylcholine receptor subtypes. *J Neurophysiol* 86: 1773–1782, 2001.
147. WANG Y, PEREIRA EF, MAUS AD, et al. Human bronchial epithelial and endothelial cells express alpha7 nicotinic acetylcholine receptors. *Mol Pharmacol*, 60: 1201–1209, 2001.
148. LUKAS RJ, CHANGEUX JP, LE NOVE`RE N, et al. International Union of Pharmacology. XX. Current status of the nomenclature for nicotinic acetylcholine receptors and their subunits. *Pharmacol Rev*, 51: 397–401, 1999.
149. SHEN JX, YAKEL JL. Nicotinic acetylcholine receptor-mediated calcium signaling in the nervous system. *Acta Pharmacol Sin*, 30(6): 673–80, 2009.
150. FEUERBACH D, LINGENHOEHL K, OLPE HR, et al. The selective nicotinic acetylcholine receptor alpha7 agonist JN403 is active in animal models of cognition, sensory gating, epilepsy and pain. *Neuropharmacology*, 56(1): 254–63, 2009.
151. WANG H, YU M, OCHANI M, et al. Nicotinic acetylcholine receptor alpha7 subunit is an essential regulator of inflammation. *Nature*, 421: 384–388, 2003.
152. GILLBERG PG, AQUILONIUS SM. Cholinergic, opioid and glycine receptor binding sites localized in human spinal cord by in vitro autoradiography. Changes in amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neurol Scand*, 72: 299–306, 1985.
153. WADA E, WADA K, BOULTER J, et al. Distribution of alpha 2, alpha 3, alpha 4, and beta 2 neuronal nicotinic receptor subunit mRNAs in the central nervous system: a hybridization histochemical study in the rat. *J Comp Neurol*, 284: 314–35, 1989.
154. SEGUELA P, WADICHE J, DINELEY-MILLER K, DANI JA, PATRICK JW. Molecular cloning, functional properties, and distribution of rat brain alpha 7: a nicotinic cation channel highly permeable to calcium. *J Neurosci*, 13: 596–604, 1993.
155. CORDERO-ERAUSQUIN M, CHANGEUX JP. Tonic nicotinic modulation of serotonergic transmission in the spinal cord. *Proc Natl Acad Sci USA*, 98: 2803–7, 2001.

156. CORDERO-ERAUSQUIN M, PONS S, FAURE P, CHANGEUX JP. Nicotine differentially activates inhibitory and excitatory neurons in the dorsal spinal cord. *Pain*, 109: 308–18, 2004.
157. XIAO HS, HUANG QH, ZHANG FX, et al. Identification of gene expression profile of dorsal root ganglion in the rat peripheral axotomy model of neuropathic pain. *Proc Natl Acad Sci USA*, 12: 8360-5, 2002.
158. STEVEN J. Medhurst, Jon P, Hatcher, Christopher J. Hille, et al. Activation of the  $\alpha$ 7-Nicotinic acetylcholine receptor reverses complete Freund adjuvant-induced mechanical hyperalgesia in rat via a central site of action. *The Journal of Pain*, 9: 7, 2008.
159. ROWLEY TJ, MCKINSTRY A, GREENIDGE E, et al. Antinociceptive and antiinflammatory effects of choline in a mouse model of postoperative pain. *British Journal Of Anaesthesia*, 105(2): 201-7, 2010.
160. ROWBOTHAM MC, DUAN WR, THOMAS J, NOTHAFT W, BACKONJA MM. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial evaluating the efficacy and safety of ABT-594 in patients with diabetic peripheral neuropathic pain. *Pain*, 146(3): 245-52, 2009.
161. BANNON AW, GUNTHER KL, DECKER W. Is Epibatidine Really Analgesic? Dissociation of the Activity, Temperature, and Analgesic Effects of (+)-Epibatidine. *Pharmacol Biochem Behav*, 51(4): 693-8, 1995.
162. JONGE de WJ, ULLOA L. The alpha7 nicotinic acetylcholine receptor as a pharmacological target for inflammation. *British Journal Of Pharmacology*, 151: 915-929, 2007.
163. BERTRAND D, GOPALAKRISHNAN M. Allosteric modulation of nicotinic acetylcholine receptors. *Biochem Pharmacol*, 74: 1155–63, 2007.
164. WEISS GB. Metabolism and actions of CDP-choline as an endogenous compound and administered exogenously as citicoline. *Life Sci*, 56: 637-660, 1995.
165. LAKHER MB, WURTMAN RJ. Molecular composition of the phosphatidylcholines produced by the phospholipid methylation pathway in rat brain in vivo. *Biochem J.*, 244(2): 325-30, 1987.
166. FAGONE P, JAWKOWSKI S. Phosphatidylcholine and the CDP-choline cycle. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1831: 523-532, 2013.
167. LACAL JC. Choline kinase: a novel target for antitumor drugs. *IDrugs*, 4: 419-426, 2001.
168. RAMIREZ de MOLINA A, RODRIGUEZ-GONZALEZ A, LACAL JC. From Ras signalling to ChoK inhibitors: a further advance in anticancer drug design. *Cancer Lett*, 206: 137-148, 2004.
169. CUI Z, HOUWELING M, CHEN MH, et al. A genetic defect in phosphatidylcholine biosynthesis triggers apoptosis in chinese hamster ovary cells. *J Biol Chem*, 271: 14668-14671, 1996.
170. VAN BLITTERSWIJK WJ, VERHEJI M. Anticancer alkylphospholipids: mechanisms of action, cellular sensitivity and resistance, and clinical prospects. *Curr Pharm Des*, 14: 2061-2074, 2008.
171. CUI Z, HOUWELING M. Phosphatidylcholine and cell death. *Biochim Biophys Acta*, 1585: 87-96, 2002.
172. JOO JH, JETTEN AM. Molecular mechanisms involved in farnesol-induced apoptosis. *Cancer Lett*, 287: 123-135, 2010.
173. RODRIGUEZ-GONZALEZ A, RAMIREZ de MOLINA A, BENITEZ-RAJAL J, LACAL JC. Phospholipase D and choline kinase: their role in cancer development and their potential as drug targets. *Prog Cell Cycle Res*, 5: 191-201, 2003.

174. RODRIGUEZ-GONZALEZ A, RAMIREZ de MOLINA A, FEMANDEZ F, et al. Inhibition of choline kinase as a specific cytotoxic strategy in oncogene-transformed cells. *Oncogene*, 22: 8803-8812, 2003.
175. Citicoline. *Alternative Medicine Review Volume*, 13(1): 50-7, 2008.
176. SECADES JJ. Citicoline: pharmacological and clinical review, 2010 update. *Revista De Neurologia*, 52: 2, 2011.
177. FRESTA M, WEHRLI E, PUSGLISI G. Enhanced therapeutic effect of cytidine-5'-diphosphate choline when associated with GM1 containing small liposomes as demonstrated in a rat ischemia model. *Pharm Res*, 12(11): 1769-74, 1995.
178. GALETTI P, de ROSA M, COTTICELLI MG, et al. Biochemical rationale for the use of CDPcholine in traumatic brain injury: pharmacokinetics of the orally administered drug. *J Neurol Sci*, 103: 19-25, 1991.
179. SAVCI V, CAVUN S, GOKTALAY G, ULUS IH. Cardiovascular effects of intracerebroventricularly injected CDP-choline in normotensive and hypotensive animals: the involvement of cholinergic system. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 365(5): 388-98, 2002.
180. ZEISEL SH. Choline: essential for brain development and function. *Adv Pediatr*, 263-95, 1997.
181. ZEISEL SH. Nutritional Importance of choline for brain development. *J Am Coll Nutr*, 23(6): 621-6, 2004.
182. CERMAK JM, HOLLER T, JACKSON DA, BLUSZTAJN JK. Prenatal availability of choline modifies development of the hippocampal cholinergic system. *FASEB J*, 12(3): 349-57, 1998.
183. GROWDON JH, COHEN EL, WURTMAN RJ. Huntington's disease: clinical and chemical effects of choline administration. *Ann Neurol*, 1: 418-422, 1977.
184. SMITH CM, SWASH M, EXTON-SMITH AN, et al. Choline therapy in Alzheimer's disease. *Lancet*, 2: 318, 1978.
185. HARMS L, MEIERKOD H, TIMM G, PFEIFFER L, LUDOLPH AC. Decreased N-acetyl-aspartate/choline ratio and increased lactate in the frontal lobe of patients with Huntington's disease: a proton magnetic resonance spectroscopy study. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 62: 27-30, 1997.
186. UTESHEV VV, MEYER EM, PAPKE RL. Regulation of neuronal function by choline and 4OH-GTS-21 through alpha 7 nicotinic receptors. *J Neurophysiol* 89: 1797-1806, 2003.
187. WEISS GB. Metabolism and actions of CDP-choline as an endogenous compound and administered exogenously as citicoline. *Life Sci*, 56: 637-660, 1995.
188. WURTMAN RJ, REGAN M, ULUS I, YU L. Effect of oral CDP-choline on plasma choline and uridine levels in humans. *Biochem Pharmacol*, 60: 989-992, 2000.
189. G-COVIELLA IL, WURTMAN RJ. Enhancement by cytidine of membrane phospholipid synthesis. *J Neurochem*, 59(1): 338-43, 1992.
190. CANSEV M. Uridine and cytidine in the brain: Their transport and utilization. *Brain Research Reviews*, 52: 389-397, 2006.
191. HOGANS AF, GUROFF G, UDENFRIEND S. Studies on the origin of the pyrimidines for biosynthesis of neural RNA in the rat. *J Neurochem*, 18: 1699-1710, 1971.
192. RICHARDSON UI, WATKINS CJ, PIERRE C, et al. Stimulation of CDP-choline synthesis by uridine or cytidine in PC12 rat pheochromocytoma cells. *Brain Res*, 971: 161-167, 2003.

193. CANSEV M, WATKINS CJ, van der BEEK E, WURTMAN RJ. Oral uridine-5-monophosphate (UMP), increase brain CDP-choline levels in gerbils. *Brain Res*, 1058: 101-108, 2005.
194. POOLER AM, GUEZ DH, BENEDICTUS R, WURTMAN RJ. Uridine enhances neurite outgrowth in the nerve growth factor-differentiated pheochromocytoma cells. *Neuroscience*, 134: 207-214, 2005.
195. ULUS IH, WATKINS CJ, CANSEV M, WURTMAN RJ. Cytidine and uridine increase striatal CDP-choline levels without decreasing acetylcholine synthesis or release. *Cell Mol Neurobiol*, 26(4-6): 563-77, 2006.
196. HAMURTEKIN E. CDP-kolin'in analjezik etkisi ve etkiye aracılık eden mekanizmalar (Tıpta Uzmanlık Tezi). Bursa: Uludağ Üniversitesi; 2007.
197. MATSUOKA K, UOZUMI T, KANO M, et al. Clinical study of the effect of cytidine diphosphate choline on sequelae of cerebral circulation disorders. *Gendai no Rinsho*, 1: 184-9, 1967.
198. MIYAZAKI M. Effects of CDP-choline on sequelae of cerebral apoplexy. *Gendai no Rinsho*, 1: 169-71, 1967.
199. YUCEL N, CAYLI SR, ATES O, et al. Evaluation of the neuroprotective effects of citicoline after experimental spinal cord injury: improved behavioral and neuroanatomical recovery. *Neurochem Res*, 31: 767-75, 2006.
200. COSKUN C, AVCI B, OCAK N, et al. Effect of repeatedly given CDP-choline on cardiovascular and tissue injury in spinal shock conditions: investigation of the acute phase. *J Pharm Pharmacol*, 62: 497-506, 2010.
201. LINGETTI M, CIARIMBOLI M, RUMIANO C, et al. Cerebropatie involutive senili gravi: trattamento con citicolina ad alto dosaggio. *Rass Int Clin Ter*, 62:704-14, 1982.
202. STRAMBA-BADIALE M, SCILLIERI E. Attività della citicolina nel decadimento mentale senile. *Minerva Med*, 74: 819-21, 1983.
203. BONAVIDA E, CHIOMA V, DALL'OCA P, et al. Studio in doppio cieco sull'azione della citicolina nel cervello senile. *Minerva Psichiatr*, 24: 53-62, 1983.
204. LOZANO R, FERNANDEZ MV, BALAGUE A. Alteraciones neuropsiquicas del anciano: evolucion tras la administracion de CDP-colina (citicolina). *Med Clin (Barc)*, 87(1): 30-3, 1986.
205. PALLESCHI M, CAPOBIANCO G. Invecchiamento cerebrale patologico. Osservazioni personali con l'impiego della citicolina. *Clin Ter*, 125: 121-8, 1988.
206. SCHERGNA E, LUPO L. La citicolina nella medicina di base: esperienza clinica multicentrica nell'area Veneto-Trentino Alto Adige-Friuli Venezia Giulia. *Giornale di Gerontologia*, 36: 341-50, 1988.
207. CAAMANO J, GOMEZ MJ, FRANCO A, CACABELOS R. Effects of CDPcholine on cognition and cerebral hemodynamics in patients with Alzheimer's disease. *Methods Find Exp Clin Pharmacol*, 16(3): 211-8, 1994.
208. CACABELOS R, CAAMANO J, GOMEZ MJ, et al. Therapeutic effects of CDP-choline in Alzheimer's disease. Cognition, brain mapping, cerebrovascular hemodynamics, and immune factors. *Ann N Y Acad Sci*, 777: 399-403, 1996.
209. CACABELOS R, ALVAREZ A, FENANDEZ-NOVOA L, LOMBARDI VR. A pharmacogenomic approach to Alzheimer's disease. *Acta Neurol Scand*, 176: 12-9, 2000.
210. FRANCO-MASIDE A, CAAMANO J, GOMEZ MJ, CACABELOS R. Brain mapping activity and mental performance after chronic treatment with CDP-choline in Alzheimer's disease. *Methods Find Exp Clin Pharmacol*, 16(8): 597-607, 1994.

211. AMENTA F, PARNETTI L, GALLAI V, WALLIN A. Treatment of cognitive dysfunction associated with Alzheimer's disease with cholinergic precursors. Ineffective treatments or inappropriate approaches? *Mech Ageing Dev*, 122(16): 2025-40, 2001.
212. ALVAREZ XA, MOUZO R, PICHEL V, et al. Double-blind placebo-controlled study with citicoline in APOE genotyped Alzheimer's disease patients. Effects on cognitive performance, brain bioelectrical activity and cerebral perfusion. *Methods Find Exp Clin Pharmacol*, 21(9): 633-44, 1999.
213. SHIMAMOTO K, HIRANO T, ARAMAKI Y. Therapeutic mechanism of cytidine diphosphate choline (CDP-choline) in parkinsonism. *Journal of the Takeda Research Laboratory*, 34: 440-8, 1975.
214. CHINCHILLA A, LOPEZ-IBOR JJ, VEG M, CAMARERO M. CDP-colina en la evolucion de las funciones mentales en el sindrome de abstinencia alcoholica. *Psiquiatria Biologica*, 2: 171-5, 1995.
215. RENSHAW PF, DANIELS S, LUNDAHL LH, ROGERS V, LUKAS SE. Short-term treatment with citicoline (CDP-choline) attenuates some measures of craving in cocaine-dependent subjects: a preliminary report. *Psychopharmacology*, 142: 132-8, 1999.
216. LUKAS SE, KOURI EM, RHEE C, MADRID A, MCNEIL J, RENSHAW PF. Citicoline treatment for cocaine abuse: effects of acute cocaine challenge on subjective mood and cardiovascular responses in adult male and female volunteers. *Drug Alcohol Depend*, 63(1): 94, 2001.
217. LUKAS SE, KOURI EM, RHEE C, MADRID A, RENSHAW PF. Effects of short-term citicoline treatment on acute cocaine intoxication and cardiovascular effects. *Psychopharmacology*, 157: 163-7, 2001.
218. CAMPOS EC, SCHIAVI C, BENEDETTI P, BOLZANI R, PORCIATTI V. Effect of citicoline on visual acuity in amblyopia: preliminary results. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 233: 307-12, 1995.
219. CAMPOS EC, BOLZANI R, SCHIAVI C, BALDI A, PORCIATTI V. Cytidin-5'-diphosphocholine enhances the effect of part-time occlusion in amblyopia. *Doc Ophthalmol*, 93: 247-63, 1997.
220. CAMPOS EC. Future directions in the treatment of amblyopia. *Lancet*, 349: 1190, 1997.
221. PARISI V, MANNI G, COLACINO G, BUCCI MG. Cytidine-5'-diphosphocholine (citicoline) improves retinal and cortical responses in patients with glaucoma. *Ophthalmology*, 106: 1126-34, 1999.
222. PARISI V. Electrophysiological assessment of glaucomatous visual dysfunction during treatment with cytidine-5'-diphosphocholine (citicoline): a study of 8 years of follow-up. *Doc Ophthalmol*, 110: 91-102, 2005.
223. VIRNO M, PECORI-GIRALDI J, LIGUORI A, De GREGORIO F. The protective effect of citicoline on the progression of the perimetric defects in glaucomatous patients (perimetric study with a 10-year follow-up). *Acta Ophthalmol Scand*, 78: 56-57, 2000.
224. PARISI V, COPPOLA G, ZICCARDI L, GALLINARO G, FALSINI B. Cytidine-5'-diphosphocholine (Citicoline): a pilot study in patients with non-arteritic ischaemic optic neuropathy. *Eur J Neurol*, 15: 465-74, 2008.
225. MANAKA S, SANO K, FUCHINOUE T, SEKINO H. Mechanism of action CDP-choline in parkinsonism. *Experientia*, 30: 179-80, 1974.

226. HORROCKS LA, DORMAN RV, DABROWIECKI ZM, GORACCI G, PORCELLATI G. CDPcholine and CDPethanolamine prevent the release of free fatty acids during brain ischemia. *Prog Lipid Res*, 20: 531–4, 1981.
227. HORROCKS LA, DORMAN RV, DABROWIECKI ZM. Therapeutic agents for preventing phospholipid degradation and free fatty acid proliferation. United States Patent, no: 4,386,078, 1981.
228. KAMEI J, OHSAWA M, MIYATA S, ENDO K, HAYAKAWA H. Effects of cytidine 5'-diphosphocholine (CDP-choline) on the thermal nociceptive threshold in streptozotocin-induced diabetic mice. *European Journal of Pharmacology*, 598: 32–36, 2008.
229. De OLIVEIRA RC, de Oliveira R, ZANANDREA PC, PASCHOALIN-MAURIN T, COIMBRA NC. Acetylcholine-mediated neurotransmission within the nucleus raphe magnus exerts a key role in the organization of both interictal and postictal antinociception. *Epilepsy & Behavior* 22: 178–185, 2011.
230. CAVUN S, SAVCI V. CDP-choline increases plasma ACTH and potentiates the stimulated release of GH, TSH and LH: the cholinergic involvement. *Fundam Clin Pharmacol*, 18(5): 513-23, 2004.
231. RICHARD JM, BERRIDGE KC. Metabotropic glutamate receptor blockade in nucleus accumbens shell shifts affective valence towards fear and disgust. *Eur J Neurosci*, 33(4): 736-47, 2011.
232. MIYASE CI, KISHI R, de FREITAS RL, PAZ DA, COIMBRA NC. Involvement of pre- and post-synaptic serotonergic receptors of dorsal raphe nucleus neural network in the control of the sweet-substance-induced analgesia in adult *Rattus norvegicus* (Rodentia, Muridae). *Neurosci Lett*, 379(3): 169-73, 2005.
233. FREITAS RL, BASSI GS, de OLIVEIRA AM, COIMBRA NC. Serotonergic neurotransmission in the dorsal raphe nucleus recruits in situ 5-HT(2A/2C) receptors to modulate the post-ictal antinociception. *Exp Neurol*, 213(2): 410-8, 2008.
234. OLIVEIRA MA, PRADO WA. Role of PAG in the antinociception evoked from the medial or central amygdala in rats. *Brain Res Bull*, 54(1): 55-63, 2001.
235. THOMAS DA, NAVARRETE IM, GRAHAM BA, MCGOWAN MK, HAMMOND DL. Antinociception produced by systemic R(+)-baclofen hydrochloride is attenuated by CGP 35348 administered to the spinal cord or ventromedial medulla of rats. *Brain Res*, 718(1-2): 129-37, 1996.
236. ABE K, KIKUTA J, KATO M, et al. Effects of microinjected carbachol on the antinociceptive response to noxious heat stimuli. *Biol Pharm Bull*, 26(2): 162-5, 2003.
237. Li GZ, Liang QC, Jin YH, et al. The effect of acetylcholine on pain-related electric activities in the hippocampal CA3 of rats. *Journal of Neural Transmission*, 118(4): 555-61, 2011.
238. GUIMARAES AP, PRADO WA. Antinociceptive effects of carbachol microinjected into different portions of the mesencephalic periaqueductal gray matter of the rat. *Brain Res*, 647(2): 220-30, 1994.
239. NOMIKOS GG, HILDEBRAND BE, PANAGIS G, SVENSSON TH. Nicotine withdrawal in the rat: role of alpha7 nicotinic receptors in the ventral tegmental area. *Neuroreport*, 10(4): 697-702, 1999.
240. OZBOLUK HY. Akut ve nöropatik ağrı modelinde amigdalaya uygulanan CDP-kolin'in analjezik etkisinin tanımlanması (Tıpta Uzmanlık Tezi). Bursa: Uludağ Üniversitesi; 2013.



241. CHEFER VI, THAMPSON AC, ZAPATA A, SHIPPENBERG TS. Overview of brain microdialysis. *Curr Protoc Neurosci*, 7:701-47, 2009.
242. WESTERINK BH. Analysis of biogenic amines in microdialysates of the brain. *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.*, 747: 21-32, 2000.
243. VALVERDE O, FOURNIE-ZALUSKI MC, ROQUES BP, MALDONADO R. Similar involvement of several brain areas in the antinociception of endogenous and exogenous opioids. *Eur J Pharmacol*, 12: 15-25, 1996.
244. Da SILVA LF, MENESCAL-de-OLIVEIRA L. Cholinergic modulation of tonic immobility and nociception in the NRM of guinea pig. *Physiol Behav*, 87: 821-7, 2006.
245. HUNT TE, WU WH, ZBUZEK VK. The effects of serotonin biosynthesis inhibition on nicotine and nifedipine-induced analgesia in rats. *Anesth Analg*, 87: 1109-1112, 1998.
246. MARUBIO LM, Del Mar ARROYO-JIMENEZ M, CORDERO-ERAUSQUIN M, et al. Reduced antinociception in mice lacking neuronal nicotinic receptor subunits. *Nature*, 398: 805-809, 1999.
247. MA HC, DOHI S, WANG YF, ISHIZAWA Y, YANAGIDATE F. The antinociceptive and sedative effects of carbachol and oxycodone administered into brainstem pontine reticular formation and spinal subarachnoid space in rats. *Anesth Analg*, 92: 1307-1315, 2001.
248. YANG J. Intrathecal administration of oxytocin induces analgesia in low back pain involving the endogenous opiate peptide system. *Spine*, 19: 867-71, 1994.
249. VAZQUEZ E, HERNANDEZ N, ESCOBAR W, VANEGAS H. Antinociception induced by intravenous dipyrone (metamizol) upon dorsal horn neurons: Involvement of endogenous opioids at the periaqueductal gray matter, the nucleus raphe magnus, and the spinal cord in rats. *Brain Research*, 1048: 211-217, 2005.
250. HAMURTEKIN E, BAGDAS D, GURUN MS. Possible involvement of supraspinal opioid and GABA receptors in CDP-choline-induced antinociception in acute pain models in rats. *Neuroscience Letters*, 420: 116-121, 2007.
251. ALOKONDON M, PEREIRA EF, EISENBERG HM, ALBUQUERQUE EX. Choline and selective antagonists identify two subtypes of nicotinic acetylcholine receptors that modulate GABA release from CA1 interneurons in rat hippocampal slices. *J Neurosci*, 19(7): 2693-705, 1999.
252. MAGGI L, SHER E, CHERUBINI E. Regulation of GABA release by nicotinic acetylcholine receptors in the neonatal rat hippocampus. *J Physiol*, 536(1): 89-100, 2001.
253. FINENGAN TF, CHEN SR, PAN HL.  $\mu$ -Opioid Receptor Activation Inhibits GABAergic Kv1.1/1.2 Channels Inputs to Basolateral Amygdala Neurons Through. *J Neurophysiol*, 95: 2032-41, 2006.
254. ALKONDON M, BRAGA MF, PEREIRA EF, MAELICKE A, ALBUQUERGUE EX. Alpha7 nicotinic acetylcholine receptors and modulation of gabaergic synaptic transmission in the hippocampus. *Eur J Pharmacol*, 393(1-3):59-67, 2000.
255. MILLAN MJ. Descending control of pain. *Prog Neurobiol*, 66: 355-474, 2002.
256. BARDIN L. The complex role of serotonin and 5-HT receptors in chronic pain. *Behav Pharmacol*, 22: 390-404, 2011.
257. KAYSER V, BOURGOIN S, VIGUIER F, MICHOT B, HAMON M. Toward deciphering the respective roles of multiple 5-HT receptors in the complex serotonin-mediated control of pain. In: BEAULIEU P, LUSSIER D, PORRECA

- F, DICKENSON AH (eds.), *Pharmacology of Pain*, IASP Press, Seattle, 185-206, 2010.
258. SUZUKI R, RYGH LJ, DICKENSON AH. Bad news from the brain: descending 5-HT pathways that control spinal pain processing. *Trends Pharmacol Sci*, 25: 613-7, 2004.
  259. FIELDS HL, BASBAUM AI, HEINRICHER MM. Central nervous system mechanisms of pain modulation. In: McMahon S, Koltzenburg M. Wall and Melzack's *Textbook of Pain*, Elsevier, London, pp. 125-142, 2006.
  260. HEINRICHER MM, TAVARES I, LEITH JL, LUMB BM. Descending control of nociception: Specificity, recruitment and plasticity. *Brain Res Rev*, 60: 214-225, 2009.
  261. PORRECA F, OSSIPOV MH, GEBHART GF. Chronic pain and medullary descending facilitation. *Trends Neurosci*, 25: 319-325, 2002.
  262. RAHMAN W, SUZUKI R, WEBBER M, HUNT SP, DICKENSON AH. Depletion of endogenous spinal 5-HT attenuates the behavioural hypersensitivity to mechanical and cooling stimuli induced by spinal nerve ligation. *Pain*, 123: 264-274, 2006.
  263. GERANTON SM, FRATTO V, TOCHIKI KK, HUNT SP. Descending serotonergic controls regulate inflammation-induced mechanical sensitivity and methyl- CpG-binding protein 2 phosphorylation in the rat superficial dorsal horn. *Mol Pain*, 4: 35, 2008.
  264. OSSIPOV MH, DUSSOR GO, PORRECA F. Central modulation of pain. *J Clin Invest*, 120: 3779-3787, 2010.
  265. BJORKLUND A, SKAGERBERG G. Descending monoaminergic projections to the spinal cord. In: Sjölund B, Björklund A (eds), *Brain Stem Control of Spinal Mechanisms*, Elsevier, Amsterdam, pp. 55-88, 1982.
  266. JONES SL, LIGHT AR. Serotonergic medullary raphespinal projection to the lumbar spinal cord in the rat: a retrograde immunohistochemical study. *J Comp Neurol*, 322(4): 599-610, 1992.
  267. WANG QP, NAKAI Y. The dorsal raphe: an important nucleus in pain modulation. *Brain Res Bull*, 34(6): 575-585, 1994.
  268. MASON P. Central mechanisms of pain modulation. *Curr Opin Neurobiol*, 9: 436-44, 1999.
  269. BESSON JM, OLIVERAS JL, CHAOUCH A, RIVOT JP. Role of raphe nuclei in stimulation-producing analgesia. In: Haber B, Gabay S, Issidorides MR, Alivisatos SGA (eds), *Serotonin, Neurochemistry and Function: Advances in Experimental Biology and Medicine*, vol. 33, Plenum Press, New York, pp. 153-176, 1981.
  270. FIELDS HL, BASBAUM AI. Brainstem control of spinal pain-transmission neurons. *Annu Rev Physiol*, 40: 217-248, 1978.
  271. MILLAN MJ. Endorphins and nociception: an overview. *Methods Find Exp Clin Pharmacol*, 14: 445-462, 1982.
  272. BESSON JM, CHAOUCH A. Peripheral and spinal mechanisms of nociception. *Physiol Rev* 67: 67-186, 1987.
  273. CAMERON AA, KHAN IA, WESTLUND KN, WILLIS WD. The efferent projections of the periaqueductal gray in the rat: phaseolus vulgaris-leucoagglutinin study. Part II. Descending projections. *J Comp Neurol*, 351: 585-601, 1995.

274. YAKSH TL. Central pharmacology of nociceptive transmission. In: Wall PD, Melzack R (eds). Textbook of Pain, 4th Edition, Churchill Livingstone, Edinburgh, pp. 253–308, 1999.
275. VIISANEN H, PERTOVAARA A. Roles of the rostroventromedial medulla and the spinal 5-HT<sub>1A</sub> receptor in descending antinociception induced by motor cortex stimulation in the neuropathic rat. *Neurosci Lett*, 476: 133–137, 2010.



## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim süresince ve tezimi hazırlarken engin bilgi ve tecrübeleri ile bana yol gösteren, yetersiz olduğum durumlarda dahi benden anlayış ve desteğini esirgemeyen değerli hocam ve Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Mine Sibel GÜRÜN ile kıymetli hocalarım Prof. Dr. R. Levent BÜYÜKUYSAL, Prof. Dr. Vahide SAVCI, Prof. Dr. Sinan ÇAVUN, Prof. Dr. Mehmet CANSEV, Doç. Dr. Gökhan GÖKTALAY ve Doç. Dr. M. Sertaç YILMAZ'a, çalışmamın histolojik değerlendirme kısmına olan katkılarından dolayı Prof. Dr. Özhan EYİĞÖR ve Araştırma Görevlisi Duygu GÖK YURTSEVEN'e, tezimin istatistiksel değerlendirmeler kısmında bana yardımcı olan Araştırma Görevlisi Ecz. Zülfiye GÜL'e, laboratuvara alışma sürecinde benden tecrübe ve dostluğunu eksik etmeyen Uzm. Dr. Hasret Yücel ÖZBÖLÜK ile bilimsel merak, bilgi ve becerisi ile örnek aldığım Veteriner Hekim Dr. Deniz BAĞDAŞ'a, akıllı ve eğlenceli kişiliği ile eğitim sürecimi renklendiren Uzm. Dr. Fulya ORHAN'a, düşünme sistemini örnek aldığım, felsefe ve bilime dair çok şey öğrendiğim Kimyager Sami AYDIN'a, aynı laboratuvar ortamını paylaşmasak da çalışmalarım boyunca ihtiyaç duyduğumda yardımına koşan, yemeğimi, kahkahamı ve üzüntümü paylaştığım, çalışmalarını ve gayretini yürekten desteklediğim Biyolog Mesut TÜRKYILMAZ'a, eğitim sürecimde tanıştığım ve birlikte olmaktan büyük keyif aldığım Biyolog Cansu SEVİNÇ, Kimyager Özlem AKTAŞ, Dr. Ayşen ÇAKIR ve Biyolog Büşra ÖCALAN'a, tüm resmi ve idari işlerimizin sorunsuz bir şekilde yürümesini sağlayan Tıp Fakültesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü çalışanlarına ve sekreterimiz Özlem KAYGISIZ'a teşekkür ederim.

Maddi ve manevi anlamda her zaman yanımda olan sevgili eşim Emre ÜLKAN'a, varlığı ile hayatıma güzellik katan kardeşlerim Beyza ve Burak GÜRBÜZOĞLU ile tüm eğitim süreçlerimde benden emek ve desteklerini esirgemeyen sevgili anne ve babama sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

## ÖZGEÇMİŞ

21 Mayıs 1988 yılında Karabük'te doğdum. İlk ve orta öğrenimimi Karabük'te Yunus Emre İlköğretim Okulu'nda; lise öğrenimimi Bursa'da Gazi Anadolu Lisesi'nde tamamladım. 2006 yılında başladığım lisans eğitimimi 2011 yılında İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi'nde bitirdim. 2011 yılından bu yana Bursa Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans öğrenimi görmekteyim. Evliyim.

