



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

SIÇANLARDA OXALİPLATİNİN NEDEN OLDUĞU NÖROPATİK AĞRIDA
CDP-KOLİNİN ETKİSİ VE ETKİ MEKANİZMASI

Doç. Dr. Özkan KANAT

(DOKTORA TEZİ)

BURSA-2013



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

SIÇANLARDA OXALİPLATİNİN NEDEN OLDUĞU NÖROPATİK AĞRIDA
CDP-KOLİNİN ETKİSİ VE ETKİ MEKANİZMASI

Doç. Dr. Özkan KANAT

(DOKTORA TEZİ)

Danışman: Prof. Dr. M. Sibel GÜRÜN

Bursa–2013

İÇİNDEKİLER

TÜRKÇE ÖZET	II
İNGİLİZCE ÖZET	III
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. Kemoterapi ve periferik nöropati	4
2.2. Oxaliplatin hakkında kısa bilgi	5
2.3. Oxaliplatinin neden olduğu nöropati ve muhtemel oluşum mekanizmaları.....	8
2.4. CDP-kolin	13
2.5. Ağrı ve kolinerjik sistem.....	21
3. GEREÇ ve YÖNTEM.....	25
3.1. Çalışmada kullanılan hayvanlar	25
3.2. Çalışmada kullanılan ajanlar.....	25
3.2. İntraserebroventriküler kanülasyon işlemi.....	25
3.4. Davranış testleri-Mekanik hiperaljezi.....	26
3.5. Deney planı.....	27
3.6. İstatistiksel değerlendirmeler ve veri analizi	30
4. BULGULAR.....	31
5. TARTIŞMA ve SONUÇ.....	37
6. KAYNAKLAR	41
7. TEŞEKKÜR.....	49
8. ÖZGEÇMİŞ.....	50

ÖZET

Oxaliplatin (OXA), gastrointestinal sistem kanserlerinin tedavisinde yaygın olarak kullanılan üçüncü kuşak, platin bileşiği bir kemoterapötik ilaçtır ve ağırlı periferik nöropati OXA'nın en önemli yan etkilerinden birisidir. CDP-kolin, vücutta endojen olarak sentezlenen bir nükleotiddir ve akut, nöropatik ve inflamatuvar ağrı modellerinde ekzojen (intraserbroventriküler [i.s.v.] veya lokal yolla) uygulanan CDP-kolin'in analjezik ve antihiperalezik etki meydana getirdiği bilinmektedir. Bu çalışmada OXA'nın neden olduğu nöropatik ağrıda CDP-kolin'in antihiperalezik etkisi ve etki mekanizmasının araştırılması amaçlandı. Deney hayvanı olarak sıçanlar kullanıldı ve ağrı eşiği Randall-Selitto cihazı ile pençe çekme eşiği olarak değerlendirildi. Sıçanlara tek doz (6 mg/kg) intraperitoneal yolla uygulanan OXA, uygulamadan bir gün sonra başlayan ve 14 gün süreyle devam eden mekanik hiperaleziye neden oldu. OXA uygulamasından 48 saat sonra i.s.v. yolla uygulanan CDP-kolin (0.5, 1.0 ve 2.0 µmol), OXA'nın neden olduğu mekanik hiperaleziyi doza ve zamana bağlı olarak azalttı. Eşmolar dozlarda (1 µmol; i.s.v.) uygulanan CDP-kolin'in hidroliz ürünü kolin ve sitidin de CDP-kolin'e benzer şekilde antihiperalezik etki gösterdi. CDP-kolin'in antihiperalezik etkisi, yüksek afiniteli nöronal kolin geri alım inhibitörü hemikolinium-3 (1 µg; i.s.v.), selektif olmayan nikotinik kolinerjik reseptör antagonisti mekamilamin (50 µg; i.s.v.), selektif α7 nikotinik asetilkolin reseptör (nAChR) antagonisti α-bungarotoxin (2 µg; i.s.v.) ve spesifik GABA_B reseptör antagonisti CGP-35348 (20 µg; i.s.v.) ön tedavileri ile önlendi. Bununla birlikte, selektif olmayan opioid reseptör antagonisti nalokson (10 µg; i.s.v.) ve selektif olmayan muskarinik reseptör antagonisti atropin (10 µg; i.s.v.) ön tedavileri, CDP-kolin'in antihiperalezik etkisini değiştirmedi. Bu çalışmadan elde edilen sonuçlara göre, merkezi yolla uygulanan CDP-kolin'in OXA tedavisinin neden olduğu nöropatik hiperaleziyi azalttığı ve CDP-kolin'in bu etkisine presinaptik kolinerjik mekanizmalarla birlikte supraspinal α7 nAChR ve GABA_B reseptörlerinin aracılık ettiği ilk defa gösterildi.

Anahtar kelimeler: Oxaliplatin, nöropatik ağrı, hiperalezi, CDP-kolin.

SUMMARY

EFFECT OF CDP-CHOLINE ON OXALIPLATIN-INDUCED NEUROPATHIC PAIN IN RATS AND ITS MECHANISM OF ACTION

Oxaliplatin (OXA) is a third-generation platinum compound that is commonly used for the treatment of gastrointestinal cancer, and painful peripheral neuropathy is one of the most important side effects of OXA. CDP-choline is synthesized endogenously in the body, and it is known that exogenously administered (intracerebroventricularly [i.c.v.] or locally) CDP-choline produces analgesic and anti-hyperalgesic effects in acute, neuropathic and inflammatory pain models. In this study, we aimed to investigate the anti-hyperalgesic effect of CDP-choline and the mechanisms of its anti-hyperalgesic action in OXA-induced neuropathic pain. Rats were used in the experiment, and paw withdrawal pain threshold was assessed using the Randall-Selitto instrument. Intraperitoneal administration of a single dose (6 mg/kg) OXA to the rats caused mechanical hyperalgesia beginning on day 1 and continuing through 14 days after the injection. CDP-choline (0.5, 1.0 and 2.0 μmol), which was given i.c.v. 48 hours after OXA injection, significantly reduced OXA-induced mechanical hyperalgesia, in a dose- and time-dependent manner. Equimolar doses (1 μmol ; i.c.v.) of choline and cytidine (hydrolysis products of CDP-choline) also showed significant antihyperalgesic effect. The antihyperalgesic effect of CDP-choline was blocked by the pretreatment with neuronal high affinity choline uptake inhibitor hemicholinium-3 (1 μg ; i.c.v.), nonselective nicotinic receptor antagonist mecamylamine (50 μg ; i.c.v.), $\alpha 7$ selective nicotinic acetylcholine receptor antagonist α -bungarotoxin (2 μg ; i.c.v.), and gamma-amino butyric acid (GABA)-B receptor antagonist CGP-35348 (20 μg ; i.c.v.). However, it was not changed by the pretreatment with nonselective opioid receptor antagonist naloxone (10 μg ; icv) and nonselective muscarinic receptor antagonist atropine (10 μg ; icv). The results of the present study demonstrated that for the first time centrally administered CDP-choline attenuates hyperalgesia caused by OXA treatment, and antihyperalgesic effect of CDP-choline is mediated by a presynaptic cholinergic mechanisms and activation supraspinal $\alpha 7$ nAChR and GABA_B receptors.

Key words: Oxaliplatin, neuropathic pain, hyperalgesia, CDP-choline.

1. GİRİŞ

Oxaliptatin (OXA) üçüncü kuşak bir platin bileşiği olup gastrointestinal sistem kanserlerinin tedavisinde en sık kullanılan kemoterapi ilaçlarından biridir (1). Günümüzde, erken veya ileri evre kolon kanserinin tedavisinde standart olarak kabul edilmektedir (1). Bu endikasyonda çoğunlukla 5-fluorourasil ve leukovorin ile birlikte uygulanmaktadır (2). OXA tedavisi alan hastalarda en sık görülen yan etkiler sitopeni, periferik nöropati (PN), diyare ve bulantı-kusmadır (1,2). Bunlardan PN, OXA'nın başlıca doz kısıtlayıcı bir yan etkisi olma özelliğindedir (3-7). OXA'nın neden olduğu PN akut ve kronik olmak üzere iki farklı şekilde kliniğe yansımaktadır (3-7).

Akut nöropati, ilacın infüzyonu esnasında veya infüzyonun tamamlanmasından saatler sonra görülür. Ellerde ve ayaklarda uyuşma, karıncalanma, dizestezi ve ağrı oluşması ile karakterizedir. Bu tip nöropati, OXA alan hastaların neredeyse tamamında oluşmakta, zaman içinde yoğunlaşmakta ve yaşam kalitesini önemli ölçüde bozmaktadır. Akut nöropati OXA'ya özgü bir yan olup, soğuk ile temas semptomlarının başlamasını tetikleyen veya şiddetini arttıran başlıca faktördür (3-7). Kronik nöropati ise OXA'nın tekrarlayan kullanımı ile ortaya çıkan ve kümülatif doz ile ilişkili olan bir periferik nöropatidir. Duyu kaybı ve motor disfonksiyon ile karakterize olup, hastaların %10-15'inde rastlanmaktadır (3-7). Her iki tip nöropatinin ortak özelliği şiddetli boyutlara varabilen ve hastaların günlük aktivitelerini engelleyebilen ağrı ile birlikte olmasıdır (3-7). Bu tip bir yan etki OXA'nın dışındaki platin bileşiklerinde görülmemektedir.

OXA'ya bağlı PN'nin ve nöropatik ağrının oluşmasında hangi fizyopatolojik mekanizmaların rol oynadığı henüz tam olarak ortaya konulamamıştır. Konuyla ilgili yapılan prelinik çalışmalarda, çoğunlukla sıçan modeli kullanılarak OXA'nın indüklediği nöropatinin fizyopatolojik, davranışsal ve patolojik özellikleri araştırılmıştır (8-14). Özellikle nöropatik ağrı modeli üzerine odaklanmış çalışmalarda, OXA tek doz şeklinde uygulanmış ve takiben soğuk ve mekanik allodini geliştiği gözlenmiştir (8). Diğer yandan, bu şekilde tek doz uygulama ile elde edilen bulguların, klinik pratikte OXA tedavisine bağlı olarak oluşan kronik nöropatiyi temsil etmeyeceği belirtilmektedir (8, 9). Cavaletti ve arkadaşları (14), sıçanlarda kronik OXA tedavisinin dorsal kök ganglion nöronlarında atrofiye neden olduğunu ve periferik sinir ileti hızını azalttığını göstermiştir. Diğer bir çalışmada, kronik OXA tedavisinin, tedavinin kesilmesinden sonra 3 hafta süren, mekanik allodini ile birlikte soğuk ve sıcak hipersensitivitesine neden olduğu tespit edilmiştir (15). OXA'ya bağlı nöropatinin oluşmasında rol oynayan mekanizmaların daha iyi anlaşılması,

bu yan etkinin nasıl önlenebileceği ve/veya tedavi edilebileceği konusuna ışık tutacaktır. Bu konudaki literatür verilerinin sınırlı olması, daha fazla sayıda prelinik çalışmaya gereksinim olduğunu ortaya koymaktadır.

CDP-kolin (sitidin-5'-difosfat kolin veya sitikolin), hücre membran fosfolipidlerinden fosfatidilkolin sentezinde bir ara ürün olarak ortaya çıkan ve endojen olarak vücutta meydana gelen nükleotid yapısında bir bileşiktir (16). Son yıllarda yürütülen laboratuvar çalışmaları, ekzojen (intraserebroventriküler [i.s.v.] veya lokal yolla) verilen CDP-kolin'in, sıçanlarda nöropatik ve inflamatuvar ağrı modellerinde antihiperalezik bir aktivite gösterdiğini ortaya koymuştur (17-19). Bu çalışmalarda, CDP-kolin'in antihiperalezik aktivitesinin oluşmasında, supraspinal veya lokal alfa-7 nikotinik asetilkolin reseptörlerinin ($\alpha 7$ nAChR), santral gamma-amino butirik asit (GABA)-B reseptörlerinin ve/veya opioid reseptörlerinin rol oynadığı tespit edilmiştir (17-19). Hamurtekin ve Gürün (18), sıçanlarda i.s.v. yoldan verilen farklı dozlarda (0.1, 0.5, 1 ve 2 μ mol) CDP-kolin'in antinosiseptif etkisini, üç farklı ağrı modelinde (termal pençe çekme, mekanik pençe çekme ve asetik asit kıvranma testi) test etmiştir. CDP-kolin'in 0.5, 1 ve 2 μ mol (i.s.v.) dozlarında uygulandığında, doza ve zamana bağlı olarak antinosiseptif etki sergilediğini; bu etkinin CDP-kolin öncesinde i.s.v yoldan uygulanan yüksek afiniteli kolin uptake inhibitörü hemikolinyum-3 (HC-3), selektif olmayan nikotinik reseptör antagonisti mekamilamin ve selektif $\alpha 7$ nAChR antagonisti metilkakonitin ile bloke edildiğini tespit edip, CDP-kolin'in antinosiseptif etkisinin muhtemelen santral kolinerjik mekanizmalarla oluştuğunu öne sürmüşlerdir. Diğer bir çalışmada Hamurtekin ve arkadaşları (19), sıçanlarda i.s.v. yoldan verilen CDP-kolin'in antinosiseptif etkisinde supraspinal opioid ve GABA_B reseptörlerinin de rol oynayabileceğini ortaya koymuştur. Gürün ve arkadaşları (20), caragenan ile oluşturulan inflamatuvar ağrı modelinde topikal olarak uygulanan CDP-kolin'in antihiperalezik etki gösterdiğini ve bu etkiye lokal $\alpha 7$ nAChR'inin ve dokuda TNF-alfa azalmasının aracılık ettiğini göstermiştir. Bağdas ve arkadaşları (17), sıçanlarda oluşturdukları nöropatik ve inflamatuvar ağrı modellerinde CDP-kolin'in antihiperalezik etkisini göstermiş, supraspinal $\alpha 7$ nAChR ve GABA_B reseptörlerinin her iki ağrı modelinde; santral opioid reseptörlerinin ise sadece nöropatik ağrı modelinde rol aldığını gözlemlemiştir.

Santral ve periferal yolla uygulanan CDP-kolin'in, farklı ağrı modellerinde antinosiseptif ve antihiperalezik özelliğini ortaya koyan bu veriler, bu ajanın kemoterapi ilaçlarının neden olduğu nöropatik ağrıda da etkili olabileceğini düşündürmektedir. Bununla birlikte, literatürde bu konu ile ilgili bir bilgi henüz mevcut değildir. Bu nedenle

Çalışmamızda, sıçanlarda OXA ile oluşturulan akut nöropatik ağrı modelinde, CDP-kolin'in etkisinin ve etki mekanizmasının araştırılması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kemoterapi ve Periferik Nöropati (PN)

PN kemoterapi ilaçlarının en sık karşılaşılan yan etkilerinden biridir (21). Görülme sıklığı %40'lara ulaşabilmekle birlikte, bu oran kullanılan ilacın tipine, uygulama süresine ve dozuna bağlı olarak değişmektedir (21, 22). Ayrıca, ileri yaşın, alkol kullanımının ve diyabetin PN sıklığını arttırdığı belirtilmektedir (21-23).

Kemoterapiye bağlı PN çoğunlukla aksonal hasar (aksonopati) ile ilişkilidir (21-23). Aksonopati, genellikle ilaçların uygulanmasından haftalar veya aylar sonra oluşmaktadır. PN tedavinin kesilmesine rağmen devam edebilir ve geri dönüşümsüz olabilir. Eğer aksonal hasar şiddetli değil ise tam iyileşme mümkün olabilir. Bununla birlikte, dorsal kök ganglionu hasarına sekonder olarak gelişen bir nöron apoptozisi söz konusu olduğunda, şiddetli ve çoğu kez geri dönüşümü olmayan bir duysal nöropati meydana gelir (21-23).

PN'nin klinik belirti ve bulguları, periferik sinir sisteminin etkilenen bölümüne göre değişmektedir. İnce fibrillerin hasarı yanıcı ve/veya delici bir ağrının oluşmasına, ciltte hiperesteziye, ağrı ve ısı duyusunun kaybına neden olur. Kalın fibrillerin hasar görmesi vibrasyon duyusunun kaybına, propriosepsiyon kaybına, refleks kaybına, kas güçsüzlüğüne ve sinir ileti hızında yavaşlamaya yol açar. Otonom sinirlerin etkilenmesi ise kardiyak ritim bozukluğu, ortostatik hipotansiyon, gastroparezi ve nöropatik diyare gibi klinik tabloların oluşmasına sebebiyet verir (21, 22). PN'nin neden olduğu ağrı çok şiddetli boyutlara ulaşır hastanın günlük aktivitelerini engelleyebilir ve yaşam kalitesini bozabilir.

Kemoterapi ilaçları arasında en çok PN'ye neden olanlar platin bileşikleridir, taksanlar ve vinka alkaloidleridir (23) (Tablo 1). Bunlardan platin bileşikleridir solid organ tümörlerinin tedavisinde en yaygın kullanılan ilaçlardan olup, DNA alkilleyici ajanlar grubunda yer alırlar (2, 21, 23). Platin bileşikleridir hücre içine girerek DNA'nın N7 guaninine bağlanırlar. Bu şekilde her bir DNA zincirinde veya çift sarmalı oluşturan zincirler arasında çapraz bağların oluşmasına neden olurlar. Sonuç olarak DNA ve RNA sentezi bozulur (2, 21). Platin bileşikleridir hücre siklusunun G1 ve S fazında etki gösterirler (2, 21). Klinik pratikte en çok tercih edilen platin bileşikleridir sisplatin, karboplatin ve OXA'dır .

Tablo-1: Periferik nöropatiye neden olan kemoterapi ilaçları (23)

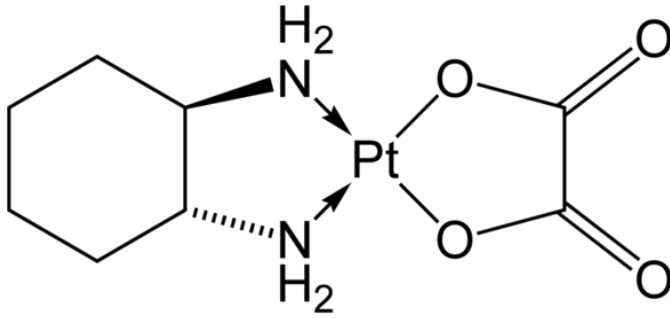
Kemoterapi ilaçları
Platin bileşikleri
Sisplatin
Okzaliplatin
Karboplatin
Taksanlar
Paklitaksel
Dosetaksel
Vinka alkaloidleri
Vinkristin
Vinblastin
Vinorelbin
Diğer ajanlar
Bortezomib
Talidomid
Lelanidomid

2.2. Oxaliplatin Hakkında Kısa Bilgi

OXA (*cis*-[(1*R*,2*R*)-1,2-cyclohexanediamine-*N,N'*] oxalato (2-)-*O,O'*] platinum) bir 3. kuşak organoplatin bileşiğidir (Şekil 1) (4). OXA'nın *in vitro* ortamda grubun en eski üyesi olan sisplatininden daha güçlü bir anti-tümöral etkiye sahip olduğu gösterilmiştir (2).

OXA intravenöz yolla 2 saat içinde verilir. Karaciğerde sitokrom P450 enzimleri tarafından metabolize edilerek biyotransformasyon ürünlerine dönüştürülür (Şekil 2). Bu ürünler DNA sentezini bozarak sitotoksik etki oluşturur. OXA'nın biyotransformasyon bileşiklerinin farmakokinetiği kesin olarak belirlenememiştir. OXA 130 mg/m² dozunda üç haftada bir uygulandığında, üçüncü uygulamayı takiben eritrositlerin içinde önemli miktarda platinin biriktiği (İlk uygulama ile karşılaştırıldığında 3. uygulamada %91'lik bir artış; p=000018) ve biriken platininin yarılanma ömrünün eritrositlerinki ile aynı olduğu tespit edilmiştir (2). OXA enzimatik olmayan degradasyon yoluyla birkaç farklı aktif

metabolite dönüştürülür. Bu metabolitler çoğunlukla idrarla atılır (2). Platinin ortalama terminal plazma eliminasyon yarı ömrü 9 gündür (2). Dışkı ile de çok az miktarda (%5) platin atılmaktadır (2).



Oxaliplatin $C_8H_{14}N_2O_4Pt$

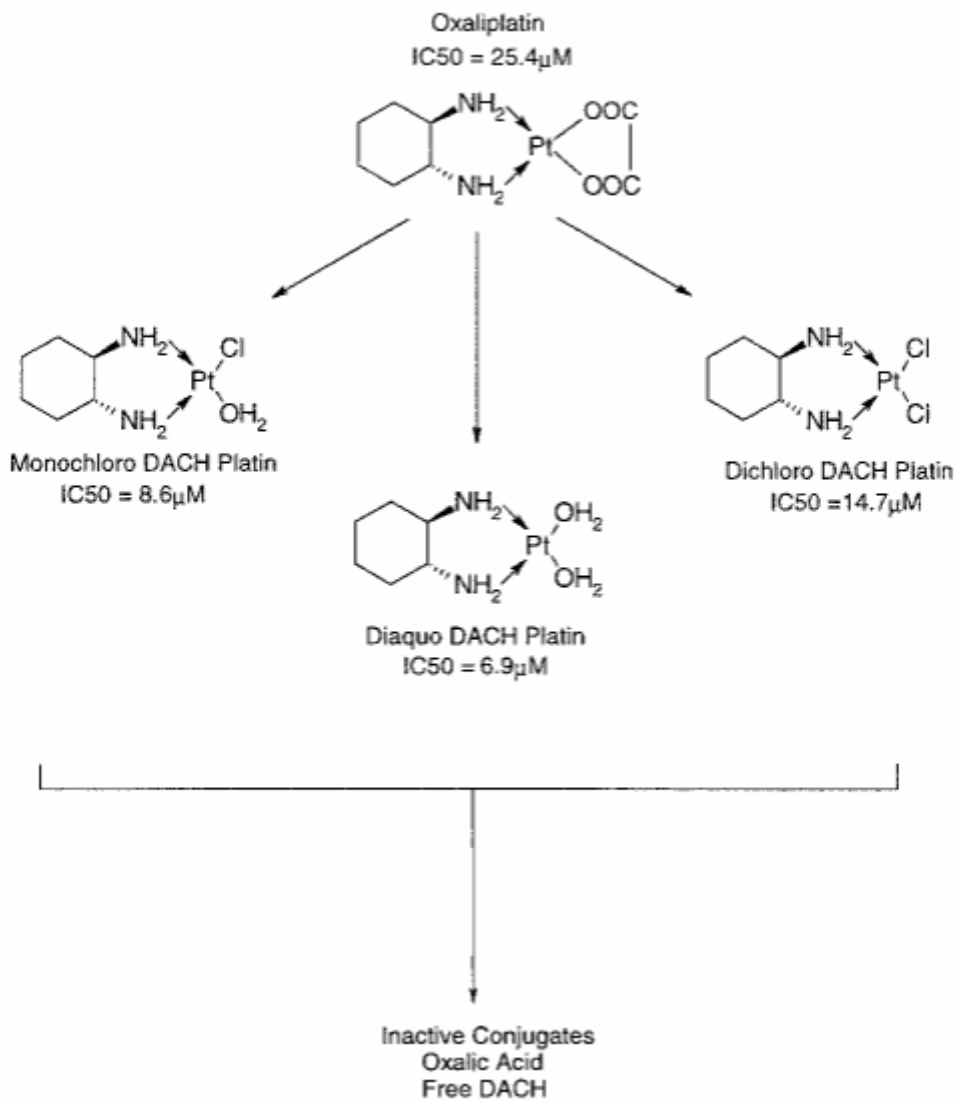
Şekil- 1: Oxaliplatinin moleküler yapısı

2.2.1. Oxaliplatinin Kanser Tedavisindeki Gelişim Süreci ve Günümüzdeki Rolü

OXA bazlı tedavilerin klinik gelişimi 1990'lı yıllarda başlamıştır. OXA, çoğunlukla 5-fluorourasil (5-FU) ve lökoverin (LV) ile birlikte kullanılmakta olup, bu kombinasyon "FOLFOX" olarak adlandırılmaktadır. Bu tedavi rejiminde OXA 15 günde 1 olmak üzere, 85 mg/m^2 dozunda uygulanır (3). FOLFOX ilk olarak Fransız araştırmacılar tarafından 5-FU ve LV'ye dirençli ileri evre kolon kanserli hastalarda kullanılmış ve %46 oranında bir yanıt oluşturduğu bildirilmiştir (3). Günümüzde, FOLFOX rejimi Avrupa ve Kuzey Amerika'da erken veya ileri evre kolon kanserinin standart tedavisi olarak kabul görmektedir (1, 3).

OXA, kolon kanseri dışında gastrointestinal sistemin diğer kanserlerinin tedavisinde de önemli kemoterapi ilaçlarından biri haline gelmiştir (1, 3). Yeni yapılan bir faz 3 çalışmada, ileri evre özofago-gastrik kanserde sisplatin kadar etkili olduğu ve tedavide onun yerine alabileceği bildirilmiştir (24). Bir meta-analiz sonucuna göre, yine bu

endikasyonda, epirubisin, OXA ve kapesitabin kombinasyonunun, standart tedavilerden biri olan epirubisin, sisplatin ve 5-FU kombinasyonuna göre daha etkili olduğu ve sağkalım süresini daha fazla uzattığı belirtilmiştir (25). Yine, ileri evre pankreas kanseri tedavisinde, OXA'nın, irinotekan ve 5-FU ile birlikte kullanılmasının sağkalım süresini arttırdığı tespit edilmiştir (3). Sonuç olarak, OXA günümüzde gastrointestinal sistemin farklı tümörlerinin tedavisinde kullanılan kemoterapi kombinasyonlarının temel ilaçlarından biri konumundadır.



Şekil- 2: Oxaliplatinin biyotransformasyonu ve majör ürünlerin farmakolojik aktivitesi (in vitro HT-29 insan kolon karsinomu hücrelerinde IC₅₀ değerleri) (2)

2.2.2. Oxaliplatinin Nöropati Dışında Görülen Yan Etkileri

2.2.2.1. Gastrointestinal Yan Etkiler ve Karaciğer Toksikitesi

İştahsızlık, bulantı, kusma, diyare, stomatit ve/veya mukozit ve karın ağrısı hastalar tarafından en çok bildirilen gastrointestinal yan etkilerdir. Bu yan etkiler OXA'nın 5-FU ve LV ile kombine kullanıldığı durumlarda nispeten daha sıktır (3).

Hepatotoksite, OXA içeren kombinasyon tedavilerinin diğer önemli bir yan etkisidir (3). Kliniğe transaminaz ve alkalin fosfataz enzimlerinin yükselmesi şeklinde yansır. Bu yan etkinin, OXA'nın karaciğer sinuzoidlerinde oluşturduğu hasarın bir sonucu olarak olduğu tespit edilmiştir (26). Çalışmalarda, sinuzoidal hasarın sıklığı %19 ile %53 arasında bildirilmektedir (27, 28). OXA'ya bağlı sinuzoidal hasarın histolojik bulguları sinuzoidal dilatasyon/konjesyon ve nodüler rejeneratif hiperplazi şeklindedir (29).

2.2.2.2. Trombositopeni

Kısa süren bir trombositopeni OXA ile tedavi edilen hastalarda nispeten sık görülen bir yan etkidir. Görülme sıklığı %40'ın üzerine çıkabilir (3). Miyelosupresyon, splenomegali veya immün trombositopeni, trombositopeninin potansiyel nedenleri olarak öne sürülmektedir (3, 30).

2.2.2.3. Hipersensitivite Reaksiyonları

Diğer platin bileşikleri gibi, OXA da hipersensitivite reaksiyonlarını tetikleyebilir. Hiper-sensitivite reaksiyonları ilacın infüzyonu esnasında meydana gelir. En sık döküntü, ürtiker, eritem ve kaşıntı, nadiren de bronkospazm ve hipotansiyon şeklinde ortaya çıkan hipersensitivite reaksiyonlarına OXA alan hastaların %12-19'unda rastlanır (31). Bu tür yan etkiler OXA'nın ilk uygulamalarında da görülebilse de, daha çok tedavinin 6-8. siklusundan sonra oluşmaktadır (3).

2.3. Oxaliplatinin Neden Olduğu Nöropati ve Muhtemel Oluşum Mekanizmaları

Giriş bölümünde de belirtildiği gibi, PN OXA'nın en sık doz kısıtlayıcı yan etkisidir ve ilacın kesilmesine yol açan en önemli nedenlerden biridir (1-7). OXA tedavisine bağlı gelişen PN'nin iki ayrı klinik formu mevcuttur. Bunlardan akut PN, ilacın uygulanması esnasında veya infüzyonunun tamamlanmasını takiben birkaç saat içinde meydana gelir. OXA uygulanan hastaların yaklaşık %90'ında akut PN görülebilir (1-7). Ellerde, ayaklarda ve ağız çevresinde parestezi, dizestezi ve ağrı şeklinde prezente olmaktadır. Buna çoğu zaman çene kaslarında sertleşme de ilave olur. Nadiren, tedaviden saatler sonra hastalarda

faringo-larino-dizestezi ile birlikte nefes almada zorlanma hissi oluşabilir. Akut PN'nin bu belirtileri çoğunlukla geçici olup dakikalar veya birkaç saat içinde kaybolur. Soğuk ile temas belirtilerin oluşmasını tetiklemektedir. Kronik PN ise daha nadir görülen bir yan etkidir. Distal simetrik nöropati, duysal ataksi, fonksiyon bozuklukları, çene ağrısı, göz ağrısı, pitozis, bacak krampları, görme ve ses bozuklukları gibi belirtiler ile karakterizedir. Kronik PN, OXA'nın toplamda 540 mg/m² veya daha yüksek dozlarda uygulanmasından sonra gelişmektedir ve genellikle geri dönüşümlüdür (1-7). OXA'nın neden olduğu akut ve kronik nörotoksitenin klinik özellikleri Tablo 2'de özetlenmiştir.

Tablo- 2: Oxaliplatinin neden olduğu akut ve kronik nörotoksosite (5)

Akut	Kronik
<p>Akut geçici dizestezi ve/veya parestezi</p> <ul style="list-style-type: none"> —Tedaviden sonraki saatler veya günler içinde görülür —Daima geri dönüşümlüdür, duysal fonksiyon bozuklukları kalıcı değildir — İlacın kesilmesini gerektirmez <p><i>Belirtiler:</i> Parestezi, dizestezi, boyun ve çene kaslarında sertleşme hissi, disfoni, soğuk hipersensitivitesi, ekstremitelerde soğuğa bağlı kas kontraksiyonları</p>	<p>Kümülatif distal nörotoksosite (bir çeşit periferik duysal nöropati)</p> <ul style="list-style-type: none"> —Kümülatif dozla ilişkilidir; kümülatif doz 800 mg/m² olduğunda neredeyse olguların tamamında görülür —Geri dönüşümlü olmasına rağmen aylarca sürebilir; tedavinin kesilmesini gerektirebilir <p><i>Belirtiler:</i> Yüzeysel ve derin duyu kaybı, duysal ataksi, fonksiyon bozuklukları, çene ağrısı</p>

OXA tedavisinin neden olduğu akut veya kronik nöropatinin oluşum mekanizması henüz netlik kazanamamıştır. Kemoterapi ilaçlarına bağlı nöropatik ağrının oluşmasında sodyum (Na⁺) kanallarının önemli bir rol oynadığı öne sürülmektedir (21, 22). Literatür

verileri bu durumun OXA için de geçerli olabileceğini düşündürmektedir. Ling ve arkadaşları (9), tek doz (6 mg/kg; intraperitoneal [i.p.]) OXA ile oluşturulan bir sıçan nöropatik ağrı modelinde, Na⁺ kanal blokeri lidokain'in (3 mg/kg; i.v.) antinöroseptif etkiye sahip olduğunu ve OXA'nın indüklediği soğuk allodiniyi hafiflettiğini göstermiştir. Egashira ve arkadaşları (32), diğer bir Na⁺ kanal blokeri olan ve diyabetik ağrılı nöropatide yaygın olarak kullanılan meksiletin'in, sıçanlarda oral yoldan 100 mg/kg dozunda verildiğinde OXA'nın (4 mg/kg, i.p.) neden olduğu mekanik allodini ve soğuk hiperaljeziyi tam olarak düzelttiğini tespit etmiştir. Adelsberger ve arkadaşları (33), OXA dorsal kök ganglion nöronlarına enjekte edildiğinde, Na⁺ akımında bir artma olduğunu ve bunun Na⁺ kanal blokeri karbamazepin tarafından antagonize edildiğini gözlemlemiştir. Grolleau ve arkadaşları (34), OXA'nın metabolitlerinden birinin, voltaj kapılı Na⁺ kanallarının yapısal özelliklerini değiştirerek kanalların daha uzun süre açık kalmasına neden olabileceğini ve duysal nöronlarda hipereksitabilite yaratabileceğini; bu metabolitin de okzalot olabileceğini öne sürmüşlerdir. Konu ile ilgili diğer deneysel modellerde, OXA'nın Na⁺ kanalı inaktivasyon kinetiğini yavaşlattığı ve Na⁺ akımını azalttığı saptanmıştır (35). Soğuk ile temasın Na⁺ kanallarının kinetiğini etkilediği ve düşük ısılarda kanal disfonksiyonunun arttığı bildirilmiştir (36) ve bu durum OXA'nın indüklediği nöropatinin tipik bir özelliğidir (1-7). Yakın zamanda yapılan bir çalışmada, insan Nav1.7 sodyum kanallarının tokainid ile blokajının, OXA'ya bağlı nöropatik ağrıyı hafiflettiği tespit edilmiştir (37).

Diğer yandan, siyatik sinir fibrilleri ile yapılan in vitro çalışmalarda, OXA'nın voltaj kapılı potasyum kanallarında fonksiyonel değişikliklere neden olduğu bildirilmiştir (38). OXA'nın TREK1 ve TRAAK tipindeki potasyum kanallarının ekspresyonunu azaltarak ve hiperpolarizasyon ile aktive olan kanalların ekspresyonunu artırarak aşırı eksitabiliteyi teşvik ettiği ve bunun da soğuk hipersensitivitesinde rol oynadığı belirtilmiştir (39). Hiperpolarizasyon ile aktive olan kanalların spesifik inhibitörü ivabradin'in OXA'nın indüklediği soğuk hipersensitivitesini ortadan kaldırdığı gözlenmiştir (39).

OXA'nın neden olduğu nöropatik ağrıda, bir kapsaisin reseptörü olan geçici reseptör potansiyeli vanilloidlerin (TRPV1) rolünün olabileceği bildirilmiştir (40). Dorsal kök ganglion nöron kültürlerinde, OXA tedavisinin TRPV1, TRPA1 (geçici reseptör potansiyeli ankrin 1) ve TRPM8 (geçici reseptör potansiyeli melastatin 8) up-regülasyonunu arttırdığı gösterilmiştir (41, 42). OXA'nın indüklediği soğuk allodininin TRPM8 ve TRPA1 ekspresyon seviyelerinde ve duyarlılıklarında oluşan artmanın bir sonucu olduğu öne sürülmüştür (41, 42). Gauchan ve arkadaşları (41) TRPM8 fonksiyonları

kapsazepin ile bloke edildiğinde OXA'nın neden olduğu soğuk allodininin kaybolduğunu göstermiştir.

Asetil-L-karnitin, alfa-lipoik asit ve C vitamini gibi antioksidanların klinikte kullanımının OXA'nın neden olduğu hiperaljeziyi azaltıyor olması, oksidatif stresin bu yan etkinin oluşmasında kritik bir rol oynayabileceğini düşündürmüştür (22). IB4-pozitif nosiseptör nörotoksini IB4-saporin'in intratekal verilmesinin OXA'nın indüklediği hiperaljeziyi hafiflettiği ve OXA'nın IB4-pozitif reseptörler üzerinden oksidatif strese bağlı akut periferik duysal nöropatiyi oluşturduğu öne sürülmüştür (15).

OXA'nın sıçanlarda dorsal kök ganglion nöronlarında TUNEL-pozitif hücrelerinde artmaya neden olduğu, bir kaspaz inhibitörü olan z-VAD-fmk'ın bunu geri çevirdiği ve bu sonucun OXA nörotoksitesinde kaspaz aracılı apoptozisin bir rolünün olabileceği belirtilmiştir (22, 40).

Eksitoksik glutamat salınımı aşırı glutamaterjik nörotransmisyonu ve N-metil-D-aspartat (NMDA) reseptörlerinin aktive olmasına yol açmaktadır. Bu da nöron hasarı ile sonuçlanır. OXA'nın indüklediği nöropatide, sıçan spinal kordunda NMDA reseptörlerinin bir alt tipi olan NR2B proteininin ve mRNA'nın ekspresyonunun arttığı tespit edilmiştir (43). Selektif NRB2 antagonisti Ro25-6981 ve ifenrodil'in OXA'nın neden olduğu nöropatik ağrının şiddetini azalttığı bildirilmiştir. Ayrıca, MK-801 ve memantin gibi NMDA reseptör antagonistlerinin nöropatik ağrıyı giderdiği, OXA'nın indüklediği mekanik allodiniide spinal NR2B içeren NMDA reseptörlerinin kritik bir rolünün olabileceği belirtilmiştir (43).

OXA tedavisinin talamus ve periakvaduktal alan içinde protein kinaz C'nin (PKC) gamma izoformunun upregülasyonuna ve gamma/epsilon PKC izoformunun fosforilasyonunun artmasına neden olduğu tespit edilmiştir (44, 45). Selektif PKC inhibitörü kalfostin C'nin supraspinal uygulanmasının OXA'nın neden olduğu mekanik hiperaljezinin şiddetini azalttığı gözlenmiştir (44). Sarı kantaron'un (St. John's Wort) hiperisin aracılığı ile PKC gamma ve epsilon aktivitesini inhibe ederek OXA'nın neden olduğu nöropatik ağrıyı hafiflettiği gösterilmiştir (45).

OXA'ya bağlı mitokondrial hasar nöropati oluşumundan sorumlu olabilecek diğer bir mekanizma olarak önerilmiştir (46). Xiao ve arkadaşları (12), sıçanlarda OXA'nın neden olduğu kronik ağrılı PN'yi karakterize etmiş ve paklitaksel'in neden olduğu nöropati ile karşılaştırmıştır. Bu çalışmanın sonuçlarına göre, OXA mekano-allodoni, mekano-hiperaljezi ve soğuk allodiniye neden olmakta, bulgular geç dönemde ortaya çıkmakta, şiddeti giderek artmakta ve yaklaşık 2.5 ay devam etmektedir. Bu patern paklitaksel için de

geçerlidir. OXA'nın paklitaksel'den farklı olarak sıcak hipersensitivitesi oluşturmadığı görülmüştür. Elektron mikroskopunda, periferik sinirlerde aksonal dejenerasyon bulgusuna rastlanmamıştır. Pençe derisindeki intraepidermal sinir liflerinde anlamlı miktarda bir azalma tespit edilmiştir. OXA tedavisinin periferik sinir aksonlarında mitokondrial şişme ve vakuolleşmeye neden olduğu, Schwann hücrelerinin etkilenmediği gözlenmiştir. Sinir ileti çalışmaları duysal aksonlarda anlamlı bir yavaşlamanın olduğunu, motor aksonların etkilenmediğini ortaya çıkarmıştır. A ve C- fibrillerinde düzensiz ve düşük frekanslı spontan deşarjların olduğu kaydedilmiştir.

Renn ve arkadaşları (47), farelerde iki haftada bir uygulanan OXA'nın (3.5 mg/kg, i.v.) kaudal ve dijital sinir ileti hızını yavaşlattığını, dorsal kök ganglion nöronlarında ve siyatik sinirde nöronal atrofiye ve multinükleasyona neden olduğunu tespit etmiştir. OXA'nın, tedavinin ilk haftasından itibaren mekanik allodini ve soğuk hiperaljeziyi indüklediği, spinal dorsal boynuzda yer alan geniş dinamik sınırlı (wide dynamic range) nöronlarda anlamlı aktivite artışına yol açtığı gözlenmiştir.

Binder ve arkadaşlarının (48) gerçekleştirdiği bir klinik çalışmada, değişik kanser türleri için OXA tedavisi alan hastalarda görülen akut nöropatik ağrının, periferik (soğuk ve sıcak hiperaljezi) ve santral (mekanik hiperaljezi) nosiseptif sistemde meydana gelen bir duyarılılaşmanın sonucu olduğu düşündürülen birtakım bulgular elde edilmiştir. Araştırmacılar bu durumdan yukarıda bahsedilen mekanizmalardan biri veya birkaçının sorumlu olabileceğini öne sürmüşlerdir.

2.3.1. Oxaliplatinin neden olduğu nöropatik ağrı için kullanılan hayvan modelleri

Son yirmi içinde, platin bileşikleri, taksanlar ve vinkristin başta olmak üzere, kemoterapi ilaçlarının neden olduğu ağrılı periferik nöropatinin araştırılması amacıyla çeşitli hayvan modelleri geliştirilmiştir (49). OXA için ilk ağrı davranış modeli Ling ve arkadaşları (11) tarafından tanımlanmış olup, araştırmacılar 3 hafta boyunca devam eden soğuk ve sıcak hipersensitiviteye eşlik eden mekanik allodini ve hiperaljezi bildirmiştir. Ling ve arkadaşları diğer bir çalışmalarında, sıçanlarda tek doz OXA tedavisinin soğuk allodini ve hiperaljeziye eşlik eden mekanik allodiniye neden olduğunu gözlemiştir (8). Diğer bir akut nöropatik ağrı modeli Joseph ve arkadaşları (13) tarafından oluşturulmuş ve doza bağımlı bir sıcak ve soğuk allodini ile birlikte mekanik hiperaljezi saptanmıştır.

Yakın bir geçmişte OXA'nın tek doz veya tekrarlanan dozlar şeklinde uygulandığı fare modelleri rapor edilmiştir (41, 50). Bu modellerde anlamlı mekanik ve soğuk allodini ve

hiperaljezi bildirilmiştir. OXA'nın indüklediği nöropatik ağrının hayvan modelleri Tablo 3'te özetlenmiştir.

Tablo- 3: Oxaliplatin'in indüklediği nöropatik ağrının hayvan modelleri (49)

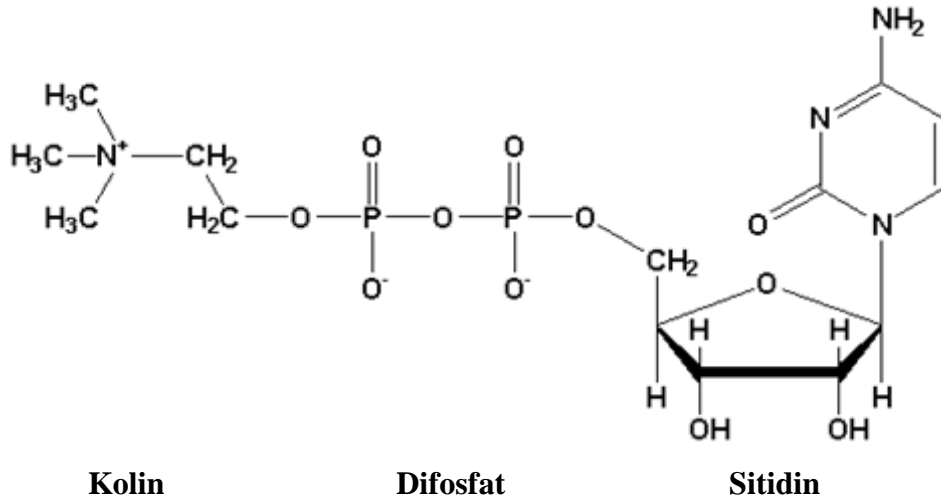
Hayvanlar	Şema	Süre	Enjeksiyon	Kümülatif doz
Sıçan erkek, SD, 175-200 gr	2 mg/kg, 2/hf	4 hf	IV	16
Sıçan erkek, SD, 175-200 gr	6 mg/kg x 1	30 saat	IP	6
Sıçan erkek, SD, 220-250 gr	2 mg/kg x 1	5 gün	IV	2
Fare erkek, C57BL/6, 6 hf	3 mg/kg x 1	10 gün	IP	3
Fare erkek, C57BL/6, 14 hf	3 mg/kg, 5 gün/5 2 hf gün, dinlenme/5 gün		IP	30

Kısaltmalar: SD: Sprague-Dawley, gr: gram, hf: hafta, IV: intravenöz, IP: intraperitoneal

2.4. CDP-kolin

CDP-kolin (Şekil-3) endojen olarak üretilen bir nükleotid olup, membran fosfolipidlerinin sentezinin gerçekleştiği “ Kennedy yolağında” bir ara ürün olarak meydana gelmektedir (Şekil-4). Bu yolak 1956 yılında Kennedy ve Weiss tarafından tanımlanmıştır ve üç temel sentez basamağından oluşmaktadır (51). Bu sentetik basamakların ilkinde kolin, kolin kinaz enziminin katalizlediği bir reaksiyon ile fosforile olur ve fosfokolin sentezlenir. İkinci basamakta sitidin trifosfat (CTP) ile reaksiyona girer ve CDP-kolin sentezlenir. CDP-kolin'in diaçilgliserol ile birleşmesi sonucu fosfodilkolin oluşur. Fosfodilkolin membran fosfolipidlerinin en önemli ve esansiyel bileşenini oluşturur. Kennedy yolağı sentez edilen fosfotidilkolinin büyük kısmından sorumludur. Bu yolakta CTP ve fosfokolinden CDP-kolin sentezi, fosfotidilkolin sentezinin hız belirleyici basamağını oluşturması nedeniyle son derece önemlidir. Kolin, sitidin ve orotik asit gibi ön

maddelerin ekzojen olarak verilmesi ile CDP-kolin miktarının artırıldığı durumlarda veya doğrudan CDP-kolin'in verilmesi ile fosfatidilkolin sentezinde artış olabilmektedir.



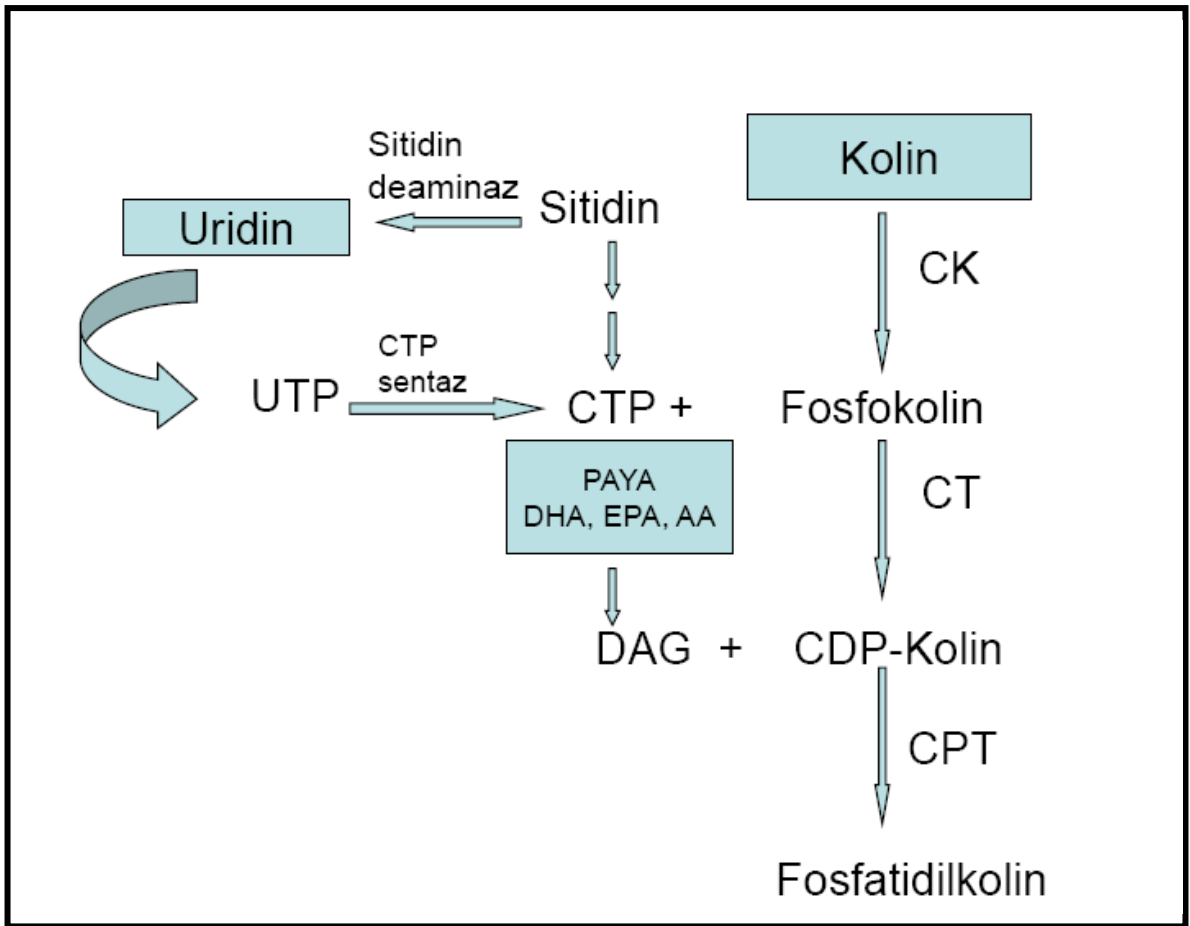
Şekil – 3: CDP-kolin'in moleküler yapısı.

2.4.1. CDP-Kolin'in Metabolizması

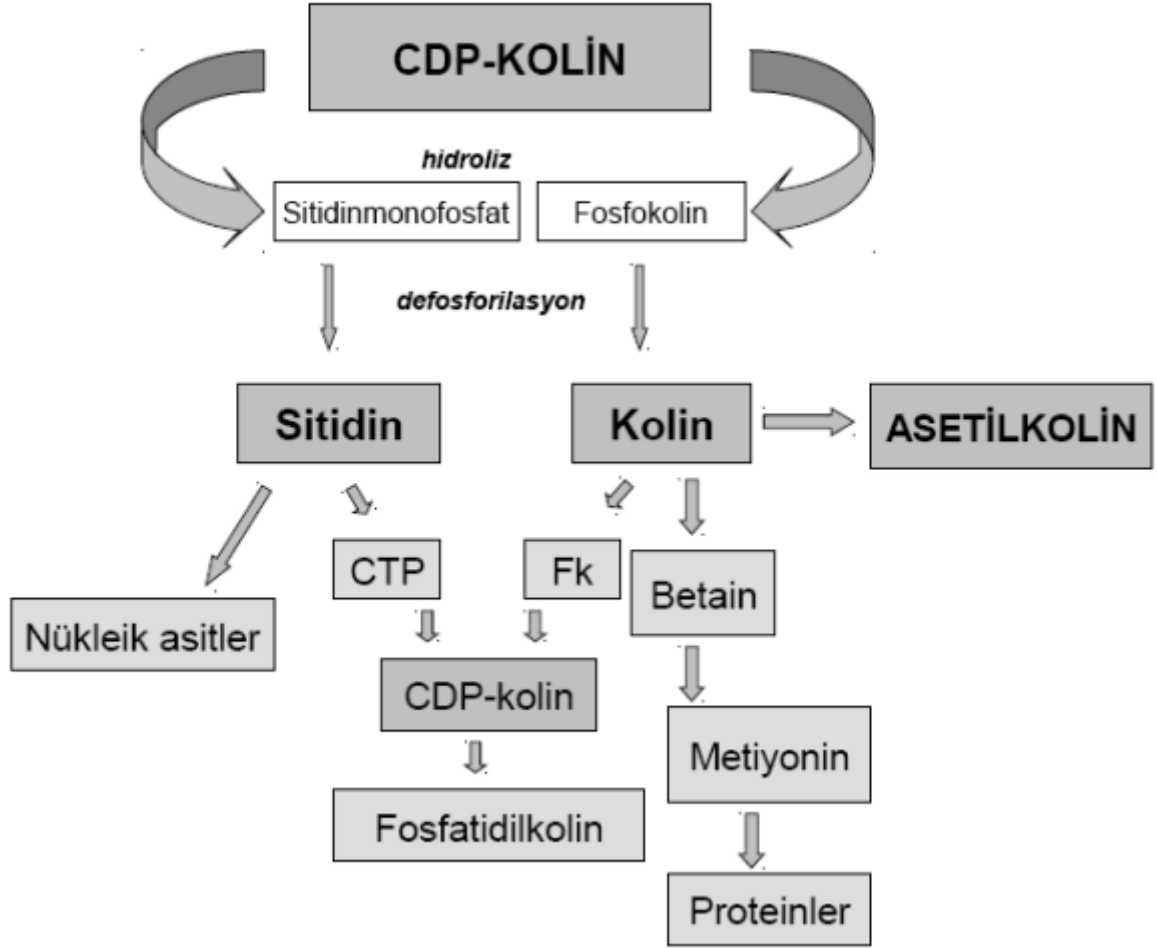
CDP-kolin in vivo koşullarda hücre membranında bulunan fosfodiesterazlar tarafından hızlı bir şekilde hidroliz edilerek sitidin monofosfat ve fosfokolin'e dönüşür (16). Daha sonra bu iki molekülün tekrar defosforile olması ile oluşan kolin ve sitidin hücre içine alınır ve kendilerine ait etkilere aracılık ederler (Şekil-5).

Bir primidin olan sitidin başlıca nükleik asitlerin yapımına katılır. Ayrıca sitidin aracılığı ile oluşan CTP, kolinin membran fosfatidilkolin sentezine katılımını artırır. Kolin, hücre membranlarında fosfatidilkolin, sfingomyelin ve plazmalojenlerin polar alt ünitesini oluşturur. Ayrıca iki önemli sentezde ön madde olarak kullanılır. Bunlardan ilkinde metioninin betainin transmetilasyonu aracılığı ile sentezine katkıda bulunur. Ancak bu transmetilasyon işlemi beyin hücrelerinde gerçekleşmez. Bu nedenle beyin hücreleri kolini bu amaçla kullanmazlar. İkinci önemli sentez ise kolinerjik nöronlarda nörotransmitter olan asetilkolin sentezidir. Asetilkolin, kolin ve asetilkoenzim A'dan kolin asetiltransferaz

enziminin katalizlediği bir reaksiyonla sentezlenir. Kolinerjik nöronlardaki kolin konsantrasyonu, nöronlardaki asetilkolin sentez ve saliverilme hızını belirleyen en önemli parametredir. Beyin hücrelerinde sentezlenen kolin miktarı çok düşüktür. Dolayısıyla, merkezi kolinerjik nöronların dolaşımdan gelecek koline gereksinimleri vardır. Bu nedenle, plazma kolin konsantrasyonu, beyin kolin konsantrasyonunun en önemli belirleyicisi durumundadır.



Şekil-4: Kennedy yoluyla aracılığıyla CDP-kolin sentezi; CK: Choline kinaz, CT: Choline transferase, CPT: CDP-choline, 1,2 - diacylglycerol cholinephosphotransferase, CTP: cytidine triphosphate, UTP: Uridine-5'-triphosphate, PAYA: Poliansatüre yağ asiti, DHA: Docosahexaenoic acid, EPA: Eicosapentaenoic acid, AA: Arachidonic acid, DAG: Diacylglycerol



Şekil- 5: CDP-kolin'in metabolizması. Kısaltmalar: CTP: sitidin trifosfat, Fk: Fosfokolin

2.4.2. Periferik Yolla Verilen CDP-kolin'in Dokulardaki Dağılımı

CDP-kolin oral yolla alındıktan sonra barsaklarda kolin ve sitidine hidroliz olmaktadır. Bu metabolitler emilerek dolaşıma geçmektedir. Sıçanlara oral yoldan CDP-kolin verildiğinde, 6-8 saat içinde plazma sitidin ve kolin seviyelerinin maksimum değerlere ulaştığı görülmüştür (52). CDP-kolin ile ilgili farmakokinetik çalışmaların bir kısmında radyoaktif işaretli CDP-kolin kullanılmıştır. Kolin grubunun metil karbonlarında ^{14}C ile ve

sitidin grubunun ^3H ile işaretlendiği CDP-kolin molekülünün kullanılması ile aynı aynda her iki metabolitin izlenmesi mümkün olmuştur. Oral yolla alınan ^{14}C ile işaretlenmiş CDP-kolin biyoyararlanımının tama yakın olduğu (% 95) ve intravenöz yolla verilen CDP-kolin biyoyararlanım oranı ile pratik olarak aynı olduğu tespit edilmiştir (53-55). CDP-kolin'in oral yolla uygulanmasından sonra oluşan metabolitlerinin sıçanlarda ve insanlarda farklılık gösterdiği bulunmuştur. Sıçanlarda plazma kolin ve sitidin düzeylerinin arttığı (53), insanlarda ise plazma kolin ve üridin düzeylerinin arttığı saptanmıştır (54).

Kan-beyin bariyeri nedeniyle, periferik yolla verilen CDP-kolin dozunun sadece %0.25'inin beyin dokusuna ulaşabilmektedir (56, 57). Diğer dokularda olduğu gibi, beyin dokusuna da kolin ve sitidin ayrı ayrı alınmakta ve beyinde başlıca endojen CDP-kolin ile fosfolipid, nükleik asit ve proteinlerin sentezinde kullanılmaktadır (57). ^{14}C işaretli CDP-kolin ile fare beyinlerinde gerçekleştirilen otoradyografi çalışmalarında, radyoaktivitenin seçicilik göstermeden hücre membranlarında, kolinerjik nöronlarda ve serebellar Purkinje hücrelerinin subsellüler membranlarında yoğunlaştığı görülmüştür (58). Homojenize edilen sıçan beyinlerinde radyoaktivitenin membran ve mikrozomların fosfolipid fraksiyonunda yoğunlaştığı tespit edilmiştir (58).

2.4.3. CDP-Kolin'in Metabolitleri

2.4.3.1. Kolin

Kolin (2-hidroksimetil-N,N,N-trimetil amonyum) bir kuarterner amindir. Kolin esansiyel bir besin maddesi olup tüm hücrelerin normal fonksiyonu için gereklidir. Özellikle beyin dokusunun gelişmesinde ve hafıza merkezinin (hipokampus) fonksiyonlarında önemli rol oynamaktadır.

Kolin'in vücuttaki işlevleri üç ana başlık altında toplanabilir (59): 1) Kolin, asetilkolin'in sentezinde öncü madde olarak görev görür ve yüksek dozlarda asetilkolin reseptörleri ile doğrudan etkileşir. Böylece kolin kolinerjik nörotransmisyonu uyarıcı etkiler gösterir. 2) Kolin hücre zarının temel yapı taşı niteliğindeki fosfolipidlerin (fosfotidilkolin ve sfingomiyelin) sentezinde de öncü madde olarak görev görür. Bununla bağlantılı olarak hücre zarındaki fosfolipidlerden kaynaklanan bazı ikinci habercilerin (lizofosfotidilkolin, platelet ektive edici faktör gibi) yapısında yer alır. 3) Vücutta genel bir metil verici molekül rolü oynar.

Kolinerjik sinirlerde asetilkolin sentezi serbest kolinin, kolinasetiltransferaz enzimi aracılığıyla asetile edilmesiyle tek basamaklı bir reaksiyonla gerçekleşir. Vücutta asetilkolin sentezinde kullanılan serbest kolinin en önemli kaynağı dolaşımdaki kolindir.

Bunun dışında, hücre zarındaki fosfatidilkolin'in fosfatidilkolin fosfolipaz D ve C enzimleri ile hidrolizi sonucunda ve sinaptik aralığa salınan nörotransmitter asetilkolin'in asetilkolinesteraz tarafından hidrolize edilmesiyle de serbest kolin oluşmaktadır. Ayrıca, fosfatidiletanolamin'in bir enzimatik reaksiyonla üç metil grubu eklenerek fosfatidilkolin'e dönüşmesi ve takiben oluşan fosfatidilkolin'in fosfolipaz enzimleri ile hidrolize olmasıyla da serbest kolin açığa çıkmaktadır.

Plazmadaki kolin özel bir taşıyıcı sistemin varlığı ile kan-beyin bariyerinden geçer (59). Bu taşıyıcı sistem normal plazma kolin konsantrasyonlarında (~10 µM) doyurulmamış durumdadır. Bu nedenle, dolaşımdaki kolin düzeylerinin artırılması beyin kolin düzeylerinin de artması ile sonuçlanır. Kolin, kolinerjik nöronlara başlıca iki farklı taşıyıcı sistemle alınır. Bunlardan ilki, doyurulabilir, sodyum ve enerjiye bağımlı, yüksek afiniteli ve hemikolinyum-3'e (HC-3) duyarlı olan taşıyıcı sistemdir. Bu taşıyıcının koline Km değeri 0.1-10 µM kadardır. Bu taşıyıcı sistem ile kolin taşınması HC-3 tarafından yarışma yoluyla bloke edilir. Periferik motor nöronlarda, parasempatik nöronlarda ve nöron dışı bazı hücrelerde bulunmaktadır (60, 61). İkinci önemli kolin taşıma sistemi sodyumdan bağımsız, enerji gerektirmeyen, yüksek kapasiteli ve düşük afiniteli taşıma sistemidir. Vücutta nöronal ve nöron dışı dokularda yaygın olarak bulunur. Kolin'e afinitesi düşüktür ve Km değeri 30-100 µM kadardır. Bu taşıyıcının HC-3 tarafından bloke edilmesi için daha yüksek HC-3 düzeylerine gereksinim vardır (60, 61).

Nöronlara alınan kolin, asetilkolin sentezinde kullanılır. Bu sentez reaksiyonunu katalizleyen kolinasetiltransferaz enzimi normal beyin kolin konsantrasyonlarında doyurulmamış durumdadır. Dolayısıyla, beyinde serbest kolin düzeyini arttırıcı yaklaşımlar (diyet ile ya da farmakolojik yöntemlerle kolin veya kolin bileşikleriyle tedavi) beyinde kolinerjik nöronlarla zengin innervasyonu olan bölgelerde asetilkolin sentezinin hızlanmasına, düzeyinin yükselmesine ve salınımının artmasına neden olur (62, 63). Kolin yeterince yüksek konsantrasyonlara ulaştığında muskarinik asetilkolin reseptörleri ve nikotinik asetilkolin reseptörleri ile etkileşerek agonistik etkiler oluşturabilmektedir (59). Kolin'in insan mutant M1 muskarinik reseptörlerine agonistik etkileşimi ile fosfatidil inozitol hidrolizine yol açtığı, klonlanmış M1 reseptörlerini 10-1000 µM konsantrasyonlarda uyararak nitrik oksit sentezini ve hücre içi iyonize kalsiyum düzeyini yükselttiği gösterilmiştir (64). Kolin 100-10000 µM konsantrasyonlarında α7 nAChR üzerinde tam agonistik, α3β4 nAChR üzerinde ise kısmi agonistik etki gösterir. Daha düşük konsantrasyonlarında (10-100 µM) α7 reseptörleri duyarsızlaştırır (65).

2.4.3.2. Sitidin ve Üridin

Ekzojen yoldan verilen CDP-kolin sıçanlarda kolin ve sitidine metabolize edilirken, insanlarda üridin ve koline metabolize edilir (66, 67). Sıçanlarda sitidin plazmadaki en önemli primidindir. Gerbil ve insanlarda ise plazmadaki primer primidin üridindir (68, 69). Dolaşımdaki sitidin ve üridin nükleik asitlerin bünyesine katılmanın yanında, sitidin sitidin trifosfata (CTP), üridin ise UDP (üridin difosfat) ve UTP''ye (üridin trifosfat) dönüştürülerek, Kennedy yolağında fosfatidilkolin ve fosfotidiletanolamin sentezi için kullanılırlar (69).

Sitidin ve üridinin dolaşımdan beyine geçişi, kan-beyin bariyerinde bulunan düşük ve yüksek afiniteli nükleozid taşıyıcıları vasıtasıyla gerçekleşir. Sıçanlarda kan-beyin bariyerinde sitidin için yüksek afiniteli bir taşıyıcı olmadığından, dolaşımdaki sitidinin çok az bir miktarı beyinde CTP'ye dönüştürülür. Aksine üridin yüksek afiniteli taşıyıcı ile kolayca beyin dokusuna alınır ve UTP oluşturulur. Takiben UTP, CTP sentaz tarafından CTP'ye dönüştürülür. CTP fosfokolin ile reaksiyona girer ve endojen CDP-kolin meydana gelir. CDP-kolinin diaçilgliserol ile birleşmesiyle fosfotidilkolin oluşur.

2.4.4. Periferik veya merkezi yollarla verilen CDP-kolin'in beyindeki kolin düzeylerine etkisi

Radyoaktif işaretli CDP-kolin kullanılarak yapılan çalışmalarda, periferik olarak verilen CDP-kolin'in nispeten az bir kısmının kolin ve sitidin olarak beyin dokusuna alındığı, ancak bu miktarların tekrar CDP-kolin sentezi, fosfolipid sentezi ve diğer biyosentetik işlemler için çok etkin biçimde kullanıldığı gözlenmiştir. Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Farmakoloji ve Klinik Farmakoloji Laboratuvarlarında yürütülen in vivo mikrodiyaliz çalışmalarında, merkezi veya periferik yolla verilen CDP-kolin sonrası değişik beyin dokularında (yan serebral ventrikül, hipotalamus ve korpus striatum) kolin düzeyleri incelenmiştir (70). Her iki yolla da CDP-kolin enjeksiyonu sonrası 10 dakika içinde, incelenen bölgeye göre değişen oranlarda kolin artışı saptanmıştır. Artışlar ortalama 40 dakika içinde geri dönmüştür. CDP-kolin i.s.v. yolla verildiğinde yan serebral ventrikülde 8, hipotalamusta 6 kat olarak saptanan artışlar, intravenöz yolla verildiğinde aynı dokularda sırasıyla 4 ve 3 kat olarak bulunmuştur. Korpus striatumda görülen artışlar ise i.s.v. yolla verilmiş sonrası yaklaşık 4 kat, periferik enjeksiyon sonrası ise 2 kat olarak saptanmıştır. Sonuç olarak CDP-kolin verilmesi sonrasında beyinde kolin düzeylerinde önemli artışlar olması, CDP-kolin'in bir kolin vericisi gibi davrandığını düşündürmektedir.

2.4.5. CDP-kolin'in Terapötik Potansiyeli

CDP-kolin bir nükleotid olmakla birlikte, metabolizması sonucu oluşan ürünlerden özellikle kolin aracılığı ile çeşitli etkiler oluşturabilmektedir. Bu etkiler kolinin gerek fosfolipid sentezine katılması ve gerekse asetikolin sentezinde kullanılması ile ilişkilendirilmektedir. Çeşitli deneysel sistemlerde CDP-kolin'in hücre ve membran fonksiyonları üzerine olumlu etkileri gösterilmiştir. Özellikle fosfolipidlerin yapımının arttırılması ve yıkımının önlenmesine yönelik olan etkilerinden yola çıkarak klinikte iskemi ve hipoksik koşulların ortaya çıktığı kafa travmaları ve serebrovasküler olaylarda CDP-kolin'in kullanımı oldukça yararlı bulunmuş ve çok sayıda ülkede klinik kullanımı onaylanmıştır. Ayrıca hafıza ve öğrenmeyi güçlendirici etkileri de gösterilmiş, Alzheimer hastalığında yararlı olduğu saptanmıştır.

Bir deneysel hemorajik şok modelinde, merkezi veya periferik yolla verilen CDP-kolin'in kan basıncını arttırdığı ve doza bağımlı olarak hemoraji öncesi değerlere yükselttiği gösterilmiştir. CDP-kolin'in kan basıncını arttıran dozlarda herhangi bir kolinerjik yan etkiye neden olmadığı gözlenmiştir (71).

Hipotalamohipofizer sistem yoğun bir kolinerjik innervasyona sahiptir. Hem hipotalamusta hem de hipofizde kolinerjik reseptörlerin varlığı da gösterilmiştir. Kolinerjik ilaçlar birçok hipofizer hormonun salgılanmasını uyarmaktadır. CDP-kolin metaboliti kolinin endokrin etkileri yoğun bir şekilde çalışılmış ve başta vazopressin, oksitosin ve ACTH olmak üzere birçok hipofizer hormonun plazma düzeylerinde artışlar yarattığı tespit edilmiştir (72-74). Benzer şekilde CDP-kolinin merkezi yolla verilmesi sonrasında plazmada hipofizer hormon düzeyleri incelenmiş ve kolin benzeri sonuçlar elde edilmiştir. Sıçanlara i.s.v. yolla verilen CDP-kolin'in, normal koşullarda plazma vazopressin ve adrenokortikotropik hormon (ACTH) düzeylerini arttırdığı, uyarılmış koşullarda ise tiroid uyarıcı hormon (TSH), luteinizan hormon (LH) ve GH düzeylerinde artışlar sağladığı gösterilmiştir (75). İ.s.v. veya intravenöz verilen CDP-kolin, plazma katekolamin ve vazopressin düzeylerinde artışa yol açmıştır (71, 76, 77).

Santral veya lokal yolla verilen CDP-kolin'in sıçanlarda nöropatik ve inflamatuvar ağrı modellerinde antihiperalezik etki gösterdiği tespit edilmiştir (17, 20). Presinaptik kolinerjik mekanizmaların aktivasyonu aracılığıyla santral $\alpha 7$ nAChR'in uyarılması, CDP-kolin'in antihiperalezik etkisinin oluşumunda muhtemel mekanizma olarak görünmektedir.

2.5. Ağrı ve Kolinergik Sistem

Kolinergik sistemin aktivasyonu ile oluşan analjezik etkide muskarinik ve/veya nikotinik asetilkolin reseptörleri rol oynamaktadır. Asetilkolinin ve kolinomimetik ilaçların analjezik etki oluşturdukları 1960'lı yıllarda anlaşılmıştır. O dönemde gerçekleştirilen hayvan çalışmalarında, oksotremorin, arekolin, pilokarpin, fizostigmin ve diizopropilfosforofloridat gibi muskarinik agonistlerin analjeziye neden oldukları gösterilmiştir. Pedigo ve arkadaşları (78) farelerde i.s.v. yoldan verilen asetilkolinin belirgin analjezik etki oluşturduğunu tespit etmiştir.

Muskarinik reseptörlerin beş alt tipi vardır (M1-M5). Analjezik etkide başlıca M1, M2, M4 ve daha az katkısı olmakla birlikte M3 muskarinik reseptör alt tiplerinin rol oynadığı düşünülmektedir (79-81). Nikotinik asetilkolin reseptörleri (nAChRs) 17 farklı alt ünitenin beşli olarak bir araya gelmesinden oluşan ve bu beşli (pentamerik) yapının ortasında iyon kanalı bırakan reseptörlerdir. Nöronal tip nAChR ise 12 farklı alt ünitenin ($\alpha 2$ - $\alpha 10$, $\beta 2$ - $\beta 4$) homomerik veya heteromerik olarak bir araya gelmesi ile oluşur. Santral sinir sisteminde ağırlıklı olarak bulunan nAChRs homomerik $\alpha 7$ ve heteromerik $\alpha 4/\beta 2$ reseptörleridir. Bunlardan $\alpha 7$ reseptörler α -bungarotoksine (α -BTX) duyarlıdırlar.

Çeşitli akut ve kronik ağrı modellerinde nöronal nACh reseptör aktivasyonunun analjezik etki oluşturduğu gösterilmiştir (18, 19, 82, 83). Nikotinin analjezik etkileri ilk olarak yaklaşık 80 yıl önce gözlenmiştir. Ancak nikotinik reseptörlerin ağrı düzenlenmesinde dikkate alınması, Ekvator zehirli kurbağası *Epipedobates tricolor*'un derisinden elde edilen epibatidin ve analogu ABT-594 'ün, $\alpha 7$ ve $\alpha 4/\beta 2$ nöronal nAChRs üzerindeki agonistik etkilerine bağlı olarak güçlü analjezik etki göstermeleri ile hız kazanmıştır (84). Deney hayvanlarında spinal veya i.s.v. yoldan uygulanan $\alpha 7$ reseptör agonisti kolin'in akut ağrı modellerinde güçlü analjezik etki sergilediği ve bu etkinin $\alpha 7$ reseptör antagonistleri metilkakonitin (MLA) ve α -BTX tarafından bloke edildiği gözlenmiştir (82, 83).

nAChRs'in aktive edilmesi ile meydana gelen analjezide salgılanan çeşitli nörotransmitterlerin rol oynadığı öne sürülmektedir (85). Bu nörotransmitterlerin asetilkolin, noradrenalin, serotonin, GABA ve opioid peptidlerin olduğu düşünülmektedir (85). Ayrıca nAChR agonistleri ağrı sinyallerinin iletiminde rol alan glutamat, P maddesi ve kalsitonin gen ilişkili peptit'in salgılanmasını düzenlemektedir (85).

Konuyu aydınlayabilecek bir diğer önemli çalışmada, Hamurtekin ve arkadaşları (19), i.s.v. yoldan CDP-kolin verilmesiyle meydana gelen analjezide, supraspinal opioidergik, GABAerjik, alfa-adrenerjik ve serotonerjik reseptörlerin rolünü araştırmıştır. Naloksonun

ve GABA_B reseptör antagonisti CGP-35348'in CDP-kolin'in etkisini inhibe ettiği; alfa-1 adrenerjik reseptör antagonisti pazosin'in, alfa-2 adrenerjik reseptör antagonisti yohimbin'in ve serotonerjik reseptör antagonisti metiserjid'in ise CDP-kolin'in analjezik etkisi üzerinde bir etkisinin olmadığı gözlenmiştir. Dolayısıyla, bu önemli veriye dayanarak nAChR aktivasyonu ile meydana gelen analjezinin oluşmasında özellikle opioid ve GABA gibi nörotransmitterlerin rol oynadığı söylenebilir.

Ağrının düzenlenmesinde kolinerjik sistem ve opioidderjik sistem arasında oldukça ve karmaşık bir ilişki vardır ve kolinerjik aktivasyon sonucu oluşan analjezide opioidlerin katkısının ne olduğu henüz tam olarak bilinmemektedir. Sıçanlarda, kronik nikotin tedavisinin beynin striatal bölgesinde bulunan mu-opioid reseptörlerinin sayısını arttırdığı ve met-enkefalin düzeyini azalttığı tespit edilmiştir (86, 87). Düşük dozlarda (0.0001 mg/kg) nikotinin, morfinin analjezik etkisini potansiyelize ettiği ve bu etkinin nalokson ile geri döndüğü bildirilmiştir (88, 89). Bununla birlikte, epibatidin, ABT-594 ve RJR-2403 gibi nAChR agonistlerinin oluşturduğu analjezik etkinin, opioid reseptör antagonistleri tarafından bloke edilmediği gözlenmiştir (90, 91). Santral uygulanan opioidlerin beyin omurilik sıvısında asetilkolin konsantrasyonunu arttırdığı saptanmıştır (92). Ayrıca, ağrı kontrolünde kolinerjik sistem ve opioidderjik sistem arasındaki potansiyel bir ilişkiye işaret eden bir bulgu olarak, beynin bazı bölgelerinde nAChRs ile mu-opioid reseptörlerinin bir arada olması gösterilmiştir (93).

GABA en önemli inhibitör nörotransmitterdir ve GABAerjik nöronlar tüm santral sinir sistemi boyunca yaygın bir yerleşim göstermektedir. GABA reseptörleri ile nAChR reseptörlerinin özellikle hipokampusda önemli bir etkileşim içinde olduğu ve hem $\alpha 7$ hem de $\alpha 4/\beta 2$ nikotinic reseptör agonistlerinin, GABA salgılanmasını arttırdığı ve GABA reseptörlerini aktive ettiği tespit edilmiştir (94, 95). Kolin ve asetilkolinin nAChRs aracılığı ile piramidal nöronlar arasındaki sinaptik aktiviteyi GABAerjik inhibisyonu aktive ederek düzenlediği, $\alpha 7$ nAChR aracılığıyla gerçekleşen GABAerjik inhibisyonun stratum lakunozum molekülarede, $\alpha 4/\beta 2$ nAChR aracılığıyla gerçekleşen GABAerjik inhibisyonun ise piramidal bölgede daha ön planda olduğu saptanmıştır (96, 97).

2.5.1. Nöropatik Ağrı ve Kolinerjik Sistem İlişkisi

Nöropatik ağrı, periferik veya santral sinir sisteminin bir lezyonu veya disfonksiyonu sonucu ortaya çıkan kronik ve kompleks bir ağrı sendromudur. Nöropatik ağrının başlıca nedenleri travma, kompresyon, tümör invazyonu, iskemi, inflamasyon, nutrisyonel

eksiklikler, kemoterapi ilaçları, dejeneratif ve metabolik hastalıklardır. Allodini, hiperaljezi ve spontan ağrı nöropatik ağrının en sık rastlanan semptomlarıdır.

Nöropatik ağrıda nikotinic kolinerjik reseptörlerin bir rolü olduğunu gösteren önemli kanıtlar gen ekspresyon profili çalışmalarında elde edilmiştir. Siyatik sinir hasarı oluşturulan sıçanların spinal kord dorsal boynuzlarında nöronal nikotinic reseptörlerin $\beta 2$ subunitinin upregüle olduğu tespit edilmiştir (98). Upregülasyon sinir hasarından 14-28 sonra en belirgin hale gelmiştir. Diğer bir çalışmada, siyatik sinir kesisi yapılan sıçanlarda L4 ve L5 dorsal kök ganglionlarında $\alpha 7$ nAChR upregülasyonunun olduğu saptanmıştır (99).

Nikotinin ve nikotinic kolinerjik reseptör agonistlerinin nöropatik ağrı modellerinde antihiperalezik etkiye sahip oldukları gözlenmiştir. $\alpha 4/\beta 2$ nikotinic reseptör agonisti ABT-594'ün hayvan nöropatik ağrı modellerinde morfin ile eşdeğer bir analjezik etkiye sahip olduğu saptanmıştır (100). Lynch ve arkadaşları (101), sıçanlarda vinkristinin neden olduğu nöropatik ağrı modelinde ABT-594'ün mekanik allodiniyi azalttığını ve selektif olmayan nAChR antagonistleri mekamilamin ve klorisondamin'in anti-allodinik etkiyi tamamen bloke ettiğini gözlemlemiştir.

Normal fizyolojik şartlarda, inhibitör GABAerjik nöronlar tonik olarak aktiftir. Ancak periferik sinir hasarı gerçekleştiğinde spinal GABAerjik tonik inhibisyonun ortadan kalktığı ve böylece allodini ve hiperalezinin geliştiği, nikotinic reseptörler aktive edildiğinde tonik inhibisyonun yeniden düzenlendiği düşünülmektedir. Rashid ve Ueda (102) siyatik sinir ligasyonu ile nöropatik ağrı oluşturulan farelerde, intratekal uygulanan epibatidin ve nikotinin analjezik etki gösterdiğini tespit etmiştir. Çalışmada, GABA_A antagonistleri bikukulin ve pikrotoksin'in bu analjezik etkiyi belirgin şekilde bloke ettiği gözlenmiş, kolinerjik intratekal nikotinic agonistlerin analjezik etkisinin hem kolinerjik hem de GABAerjik mekanizmalar aracılığı ile gerçekleştiği ve nikotinic asetilkolin reseptörlerinin GABA salgılanmasını harekete geçirdiği öne sürülmüştür.

Şu ana kadar, nöropatik ağrının tedavisinde klinik olarak araştırılmış nAChR agonistleri ABT-594 ve yine bir $\alpha 4/\beta 2$ nAChR agonisti olan ABT-894'tür. Her iki ajanda diyabete bağlı nöropatik ağrısı olan hastalarda etkinlik ve tolerabilite açısından değerlendirilmiştir (103, 104). ABT-594 plasebo ile karşılaştırıldığında, nöropatik ağrıda anlamlı iyileşme sağlamıştır. Ancak bulantı, kusma, baş dönmesi, kötü rüya görme ve asteni gibi önemli yan etkilere neden olmuştur (103). ABT-894 ise hastalar tarafından daha iyi tolere edilmesine rağmen, plaseboya üstün olmadığı görülmüştür (104).

$\alpha 7$ nAChR agonistlerinin nöropatik ağrı modellerindeki analjezik-antihiperalezik etkilerine dair bilgiler oldukça sınırlı olmakla birlikte, laboratuvarımızda i.s.v. yolla verilen

CDP-Kolin'in, siyatik sinir ligasyonu ile oluşturulan n6ropatik ağrı modelinde antihiperalezik etkisinin olduğu g6sterilmiştir. Bu tez çalışmasının amacı, yukarıda verilen bilgilere dayanarak, OXA'nın neden olduğu n6ropatik ağrı modelinde santral yolla uygulanan CDP-Kolin'in antihiperalezik etkisini ve bu etkinin mekanizmasını araştırmaktır.

.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1.Çalışmada kullanılan hayvanlar

Çalışmada Sprague-Dawley türü, 250-350 g canlı ağırlıkta, 3-5 aylık yaşta, erkek sıçanlar (Deney Hayvanları Yetiştirme ve Araştırma Merkezi, Uludağ Üniversitesi, Bursa) kullanıldı. Sıçanlar çalışmadan on gün önce deney hayvanları merkezinden alınıp, dört tanesi bir kafese konularak bakıldı. 22-24° C oda sıcaklığında ve 12 saat aydınlık/12 saat karanlık döngüsünün uygulandığı ortamda barındırıldı ve yem-su alımları serbest bırakıldı. Tüm deneyler Uluslararası Ağrı Çalışma Birliği'nin (IASP) belirlediği etik kurallara uygun bir şekilde yapıldı. Uludağ Üniversitesi Hayvan Bakımı ve Kullanımı Etik Komitesi, çalışmadaki tüm cerrahi ve deneysel işlemlere onay verdi (Onay no: 13.09.2011, 2011-10/03 nolu karar).

3.2.Çalışmada kullanılan ajanlar

OXA, Sanofi-Aventis (İstanbul, Türkiye) firması tarafından verildi. Kolin klorür, atropin sülfat, mekamilamin hidroklorür, hemikolinyum-3 (HC-3), α -BgTx ve CGP-35348 Sigma Kimyasal Şirketi'nden (St. Louis, Missouri, A.B.D); CDP-kolin ve nalokson, Fluka Biochemical Inc. (Buchs, İsviçre)'ten; sitidin Acros Organics'ten (Geel, Belçika) temin edildi.

3.3. İntraserebroventriküler (i.s.v.) kanülasyon işlemi

İ.s.v. kanülasyon, eter anestezisi altında sıçanların sağ serebral yan ventriküllerine [Bregmaya göre A -1.0 mm; L 1.5 mm; V -4.2 mm) enjeksiyon kanülü yerleştirilerek yapıldı. Serebroventriküler kanül yerleştirmek amacıyla Hamurtekin ve Gürün tarafından (18, 19) tarif edildiği şekilde, cerrahi işlem yapılacak bölgede sıçanların kafasına insizyon yapıldı. Orta hattın cilt ve cilt altı dokular geçilerek yapılan bu insizyonla, kanama kontrol altına alınarak, fasyalar uzaklaştırılıp bregma görünür hale getirildi. Kafatası bölgesinin steril gazlı bezle kurutulmasından sonra kafatasına bir delik açıldı. Bu deliğin yerinin tespitinde bregma referans noktası kabul edilerek sıçan beyin atlasından yardım alındı. Orta hattın 1.5 mm laterali ile bregmanın 1 mm arkasında kesişen nokta delindi. Bu delikten sağ serebral lateral ventriküle 21-gauge'luk (21G) hipodermik paslanmaz çelik iğneden kesilerek hazırlanmış el yapımı kılavuz kanül, alt ucu kafatası yüzeyinden 4.2 mm kadar derinliğe inecek şekilde dik olarak yerleştirildi. Kafatası yüzeyinde kalan üst kısım

dişçi akriliği (Zinc polycarboxylate cement, *Adhesor Carbofine*, *SpofaDental a.s., Praha*) ile kafatasına sabitlendi. Kanülün deney gününe kadar tıkanmaması için ucu hazırlanan bir tıpa ile kapatıldı. Cerrahi işlemin bitiminde sıçanlar tek başlarına kafeslere yerleştirilerek anesteziden çıkmaları için 3 saat kadar bekletildi. Ardından yine her kafeste bir sıçan olacak şekilde deney gününe kadar kafeslerinde, bakım odasında tutuldu. Kanülasyon sonrasında ertesi gün deney yapıldı. Deney sonrasında sağ serebral ventriküle yerleştirilen kanül yerinin doğrulanması için bazı sıçanlara i.s.v. yolla 10 µl çini mürekkebi enjeksiyonu yapıldı. Takiben bu sıçanlar dekapite edilerek beyin dokusu çıkarıldı ve -80°C sıcaklık kontrollü dondurucuda 2 saat bekletildikten sonra beyin kesitleri alınarak makroskopik olarak kanülün ventriküle ulaşip ulaşmadığı incelendi. İ.s.v. enjeksiyonlar kılavuz kanül içine yerleştirilen ve kılavuz kanülün ucundan 0.3 mm kadar çıkan 25G enjeksiyon kanülü aracılığı ile yapıldı. Enjeksiyon kanülü 25 µl'lik Hamilton mikroenjektörüne 10 µl hacimde ilaç veya tuzlu su içeren PE-50 katater aracılığı ile takıldı. Daha sonra 10 µl hacmindeki ilaç veya tuzlu su, 1 dakika içinde yavaşça enjekte edildi. Enjeksiyon kanülü 30 saniye kadar daha yerinde bırakılarak ilacın geri gelmesi önlenmiş oldu.

3.4.Davranış testleri-Mekanik hiperaljezi

Sıçanlarda mekanik ağrı eşiğinin ölçülmesinde, 1957 yılında Randall ve Selitto tarafından geliştirilmiş olan pençe çekme testi kullanıldı (105). Deney gününden önce iki gün süreyle sıçanların ölçüm cihazına (Ugo Basile analjezimetre [Resim 1]) ve el ile tutulmaya adaptasyonları sağlandı. Bunun için sıçanlar üstü açık, altlıksız bir kafeste dördü bir arada olarak bırakılıp, 45 dakika boyunca ortama uyum sağlamaları için beklendi. Ardından önce sol, daha sonra sağ arka pençeleri cihazın konik uçlu sıkıştırıcısına sıkıştırılarak pedala basılmak suretiyle pençeye sabit hızda artan bir mekanik bası uygulandı. Sıçanın ağrı duyup pençesini çektiği ağırlık, cihaz üzerinde bulunan skala üzerinden okunarak gram cinsinden kaydedildi. Doku hasarı olmaması için cut-off değeri 250 gr olarak sabit tutuldu. On dakika ara ile ardışık olarak alınan üç ölçümün ortalaması kontrol değeri olarak kaydedildi.



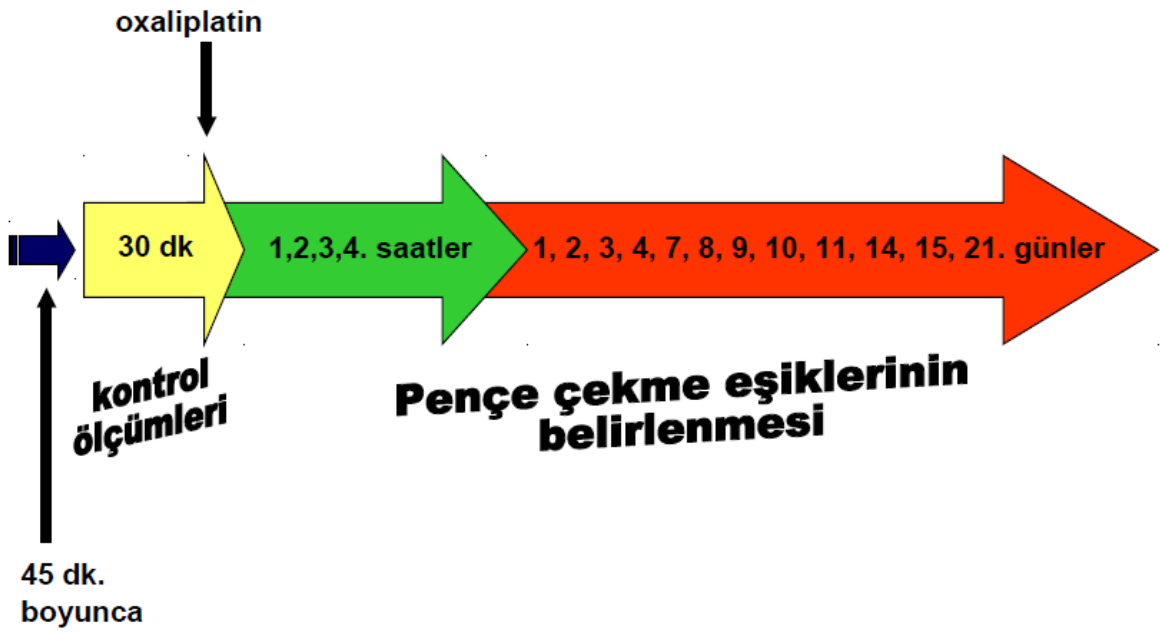
Resim-1: Mekanik pençe çekme testi cihazı: Ugo Basile Analgezimetre

3.5. Deney Planı

Birinci seri çalışmada, OXA'ya bağlı akut nöropatik ağrı modeli oluşturuldu. Bu amaçla, Ling ve arkadaşları (8, 9, 11) tarafından geliştirilen model kullanıldı. OXA %5 glukoz solüsyonu içinde çözülerek i.p. tek doz (6 mg/kg) şeklinde uygulandı (Resim 2). Mekanik pençe çekme testi, OXA enjeksiyonundan hemen önce ve enjeksiyonu takiben 60, 120, 180 ve 240. dakikalarda yapılarak ilk gün ölçümleri tamamlandı. Takiben, OXA uygulamasından 1-4, 7-11, 14, 15 ve 21 gün sonraki pençe çekme eşik değerleri belirlendi (Şekil 9).



Resim-2: Bir sıçanda Oxaliplatin'in intraperitoneal uygulanması



Şekil-9: Oxaliplatin (6 mg/kg, i.p.) enjeksiyonu ile akut nöropatik ağrının oluşturulması

İkinci seri çalışmada, CDP-kolin'in OXA ile oluşturulmuş nöropatik ağrıdaki antihiperaljezik etkisi araştırıldı. Bunun için, OXA tedavisine bağlı nöropatik ağrı gelişmiş sıçanlara, OXA uygulamasından 48 saat sonra (pençe çekme eşik değerinin en düşük olduğu an) değişen dozlarda CDP-kolin (0.5, 1 ve 2 $\mu\text{mol}/10 \mu\text{l}$) veya tuzlu su (10 μl) i.s.v.

yolla enjekte edildi (Şekil 10). Bu enjeksiyonlardan 15, 30, 45, 60, 90 ve 120 dakika sonra pençe çekme eşik değerleri kaydedildi.

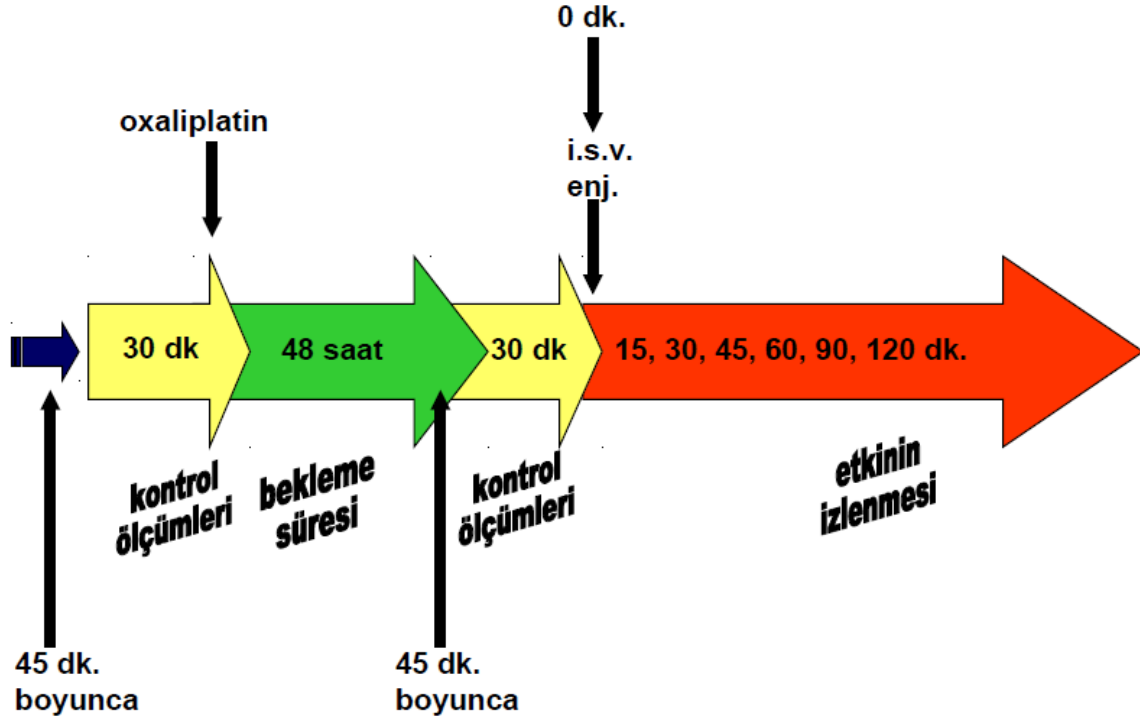
Üçüncü seri çalışmada, CDP-kolin'in metabolitleri olan kolin ve sitidin'in OXA ile oluşturulmuş akut nöropatik ağrıdaki antihiperalezik etkileri araştırıldı. Bu amaçla, OXA enjeksiyonundan 48 saat sonra, eşmolar dozlarda (1 µmol/10 µl) CDP-kolin, kolin ve sitidin veya tuzlu su (10 µl) i.s.v. yolla verildi. İlaçların uygulanmasından 15, 30, 45, 60, 90 ve 120 dakika sonra pençe çekme eşik değerleri kaydedildi.

Dördüncü seri çalışmada, çeşitli antagonistler kullanılarak, CDP-kolin'in OXA ile oluşturulan akut nöropatik ağrıdaki antihiperalezik etkisine aracılık eden olası mekanizmalar araştırıldı. Bunun için sıçanlara CDP-kolin (1 µmol; i.s.v) enjeksiyonundan 15 dakika önce;

- *Atropin sülfat* (selektif olmayan muskarinik kolinerjik reseptör antagonisti; 10 µg/10 µl)
- *Mekamilamin* (selektif olmayan nikotinic kolinerjik reseptör antagonisti; 50 µg/10 µl)
- *HC-3* (yüksek affiniteli nöronal kolin geri alım inhibitörü; 1 µg/10 µl)
- *α-BgTx* (selektif α7nACh reseptör antagonisti; 2 µg/10 µl)
- *Nalokson* (selektif olmayan opioid reseptör antagonisti; 10 µg/10 µl)
- *CGP-35348* (spesifik GABA_B reseptör antagonisti; 20 µg/10 µl) veya tuzlu su (10 µl) i.s.v. yolla enjekte edildi.

Antagonistlerin uygulanmasından 15 dakika sonra CDP-kolin (1 µmol/10 µl) veya tuzlu su (10 µl) i.s.v. yolla enjekte edildi. CDP-kolin veya tuzlu enjeksiyonundan 15, 30, 45 ve 60 dakika sonra sıçanların pençe çekme eşik değerleri kaydedildi.

Antagonistlerin dozları daha önce yapılan çalışmalara dayanılarak seçildi. Buna göre; atropin ve mekamilaminin dozları, CDP-kolin'in muskarinik ve nikotinic etkilerini önlediği gösterilen dozlardır (106, 107). Alfa-bungarotoksin, HC-3, nalokson ve CGP-35348 dozları, ağrı ve analjezi ile ilgili çalışmalarda kullanılan ve santral yolla kullanıldıklarında ilgili agonistlerin analjezik etkilerini geri döndürmeye yeterli olduğu gösterilen dozlardır (82, 108, 109). Deneyde kullanılan antagonistler ve CDP-kolin serum fizyolojik (%0.9 NaCl) içinde hazırlandı.



Şekil-10: Oxaliplatin (6 mg/kg, i.p.) ile oluşturulan akut nöropatik ağrı modelinde CDP-kolin ve antagonist ajanların uygulama şeması

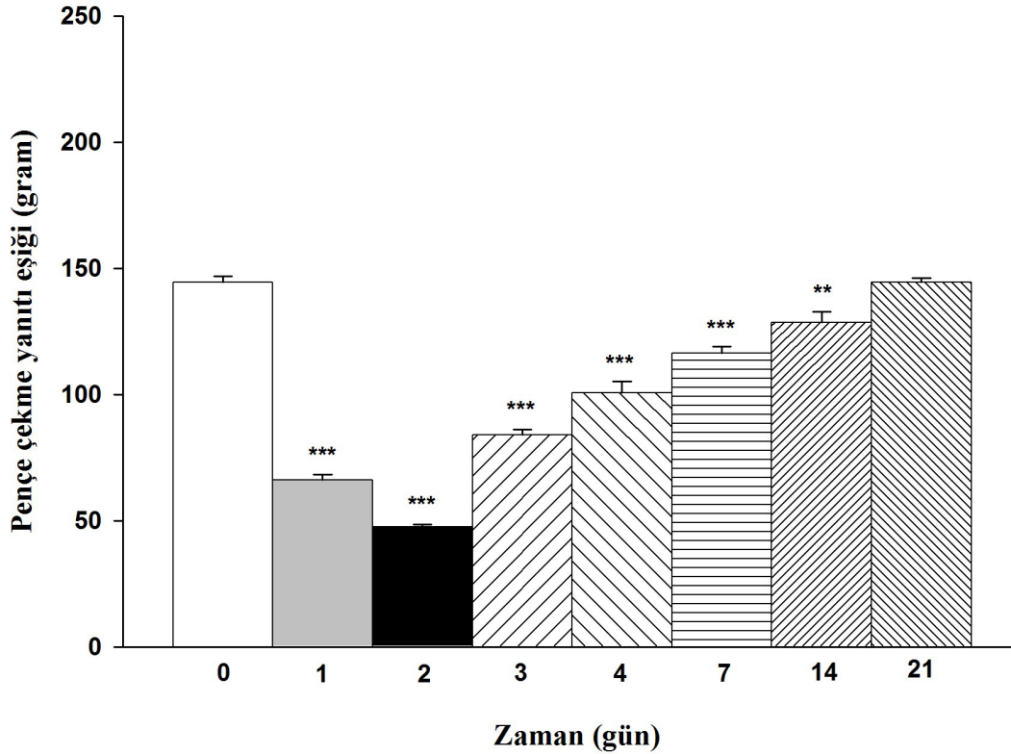
3.6. İstatistiksel değerlendirmeler ve veri analizi

Çalışmada istatistiksel işlemlerde SigmaStat® (versiyon 2.03) bilgisayar programı kullanıldı. İstatistiksel değerlendirmeler için tek veya iki yönlü ANOVA'yı takiben Student-Newman-Keuls test kullanıldı. Elde edilen veriler "ortalama \pm standart hata" şeklinde verildi. *P* değerinin <0.05 olması anlamlı olarak kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1.Sıçanlarda OXA'nın pençe çekme yanıtı eşığı üzerine olan etkileri

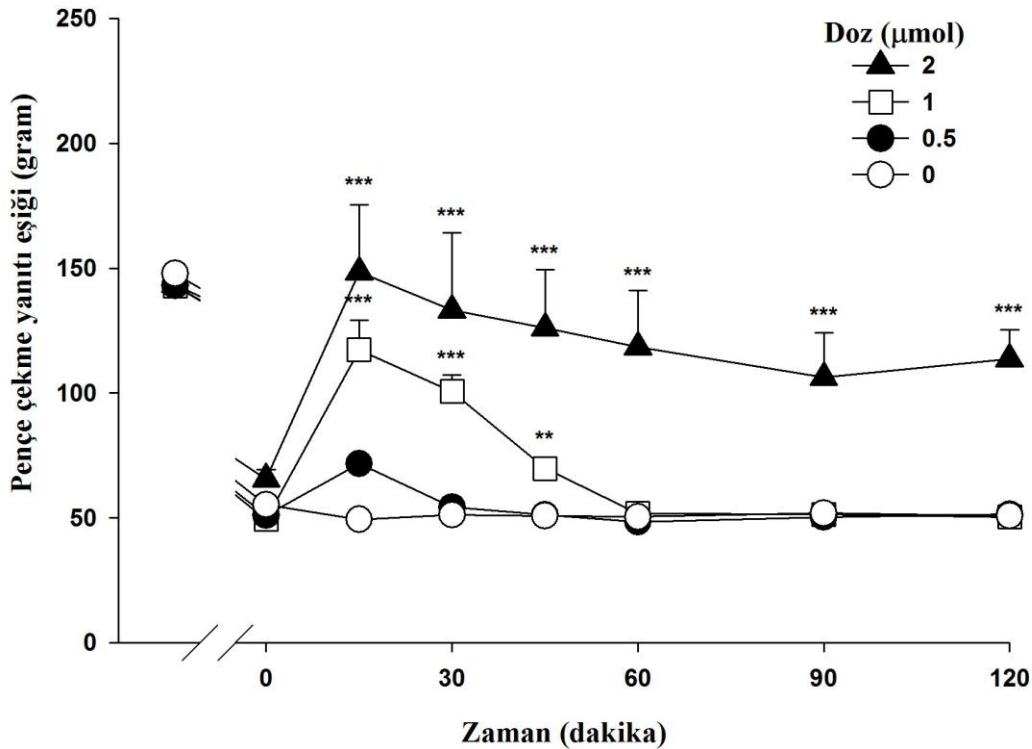
OXA enjeksiyonundan (i.p.) hemen önce, sıçanlarda pençe çekme yanıtı eşik değeri ortalaması 144.3 ± 2.5 gr olarak belirlendi. OXA'nın uygulanmasını takiben ilk 240 dakikalık gözlem periyodunda pençe çekme yanıtı eşik değerinde anlamlı bir değişimin olmadığı tespit edildi. Pençe çekme eşik değerinin, OXA enjeksiyonundan 1 gün sonra anlamlı olarak azaldığı (66 ± 2 gr; $p<0.001$), bu azalmanın ikinci gününde maksimuma seviyeye ulaştığı (47.5 ± 1 gr; $p<0.001$), 14. güne kadar bazal değerinin altında kaldığı (128 ± 4 gr; $p=0.006$) ve 21. günde OXA enjeksiyonu öncesindeki değere ulaştığı gözlemlendi (144.4 ± 1.7 gr; $p=0.98$) (Şekil 11). Bunun üzerine CDP-kolin ve antagonistlerin, OXA enjeksiyonu sonrası 48. saatte test edilmelerine karar verildi.



Şekil- 11: Oxaliplatin (6 mg/kg, i.p.) enjeksiyonu ile oluşan akut nöropatik ağrıda mekanik pençe çekme eşik testinde gözlenen hiperaljezik yanıtın seyri. Oxaliplatin uygulamasını takiben 1. günde pençe çekme eşik değeri anlamlı düzeyde azalmış, 2. günde en alt seviyeye ulaşmış ve 14. günde de bazal değerinin altında kalmıştır. Yirmi birinci günde bazal seviyeye dönmüştür (** $P<0.01$, *** $P<0.001$).

4.2. Santral yoldan verilen CDP-kolin'in pençe çekme yanıtı eşiği üzerine olan etkileri

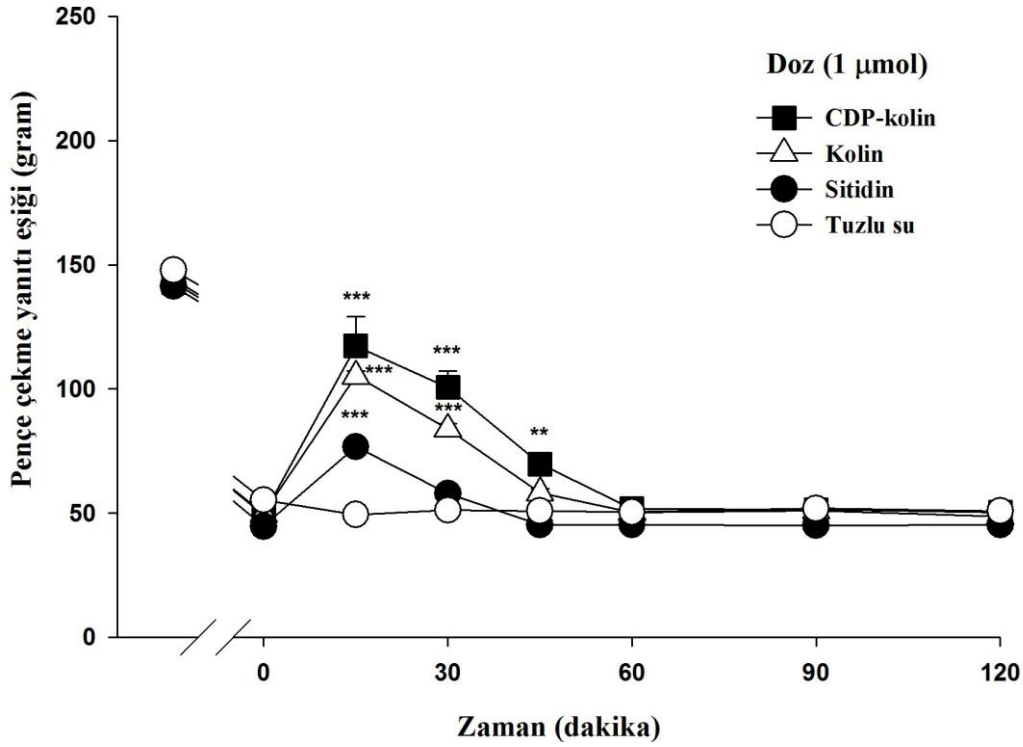
CDP-kolin (0.5, 1 ve 2 μmol ; i.s.v.) enjeksiyonunun, OXA uygulaması sonrası azalan pençe çekme eşik değerini, doza ve zamana bağlı olarak anlamlı bir şekilde arttırdığı tespit edildi (Şekil 12). CDP-kolinin antihiperaljezik etkisinin 15 dakika içinde maksimuma ulaştığı izlendi. CDP-kolin'in 0.5 μmol dozu, pençe çekme yanıtı eşiğini 51 ± 2 gr'dan 72 ± 3 gr'a; 2 μmol dozu ise 49 ± 2 gr'dan 117 ± 12 gr'a yükseltti. Bu iki dozun antihiperaljezik etkisinin 60 dakika içinde kaybolduğu görüldü. CDP-kolin'in 2 μmol dozunun antihiperaljezik etkisinin daha fazla ve daha uzun süreli olduğu izlendi. Bu dozda uygulanan CDP-kolin pençe çekme yanıtı eşiğini 66 ± 4 gr'dan 148 ± 27 gr'a yükseltti ve etkisi 120 dakikadan daha uzun sürdü. Bununla birlikte, daha sonraki deneylerde CDP-kolinin 1 μmol dozu tercih edildi.



Şekil-12: İntraserebroventriküler yol ile enjekte edilen CDP-kolin'in (0.5, 1 ve 2 μmol) veya salinin (10 μl) oxaliplatin ile oluşturulmuş nöropatik ağrı modelinde, mekanik pençe çekme testindeki etkisi. Değerler 6-9 sıçanın ortalama \pm standart hatası olarak verildi. ** $P < 0.01$ ve *** $P < 0.001$; tuzlu su grubuna (şekilde 0 doz olarak gösterilmiştir) göre anlamlı farkı göstermektedir.

4.3.Santral yoldan verilen eşmolar dozlardaki kolin ve sitidin'in pençe çekme yanıtı eşiği üzerine olan etkileri

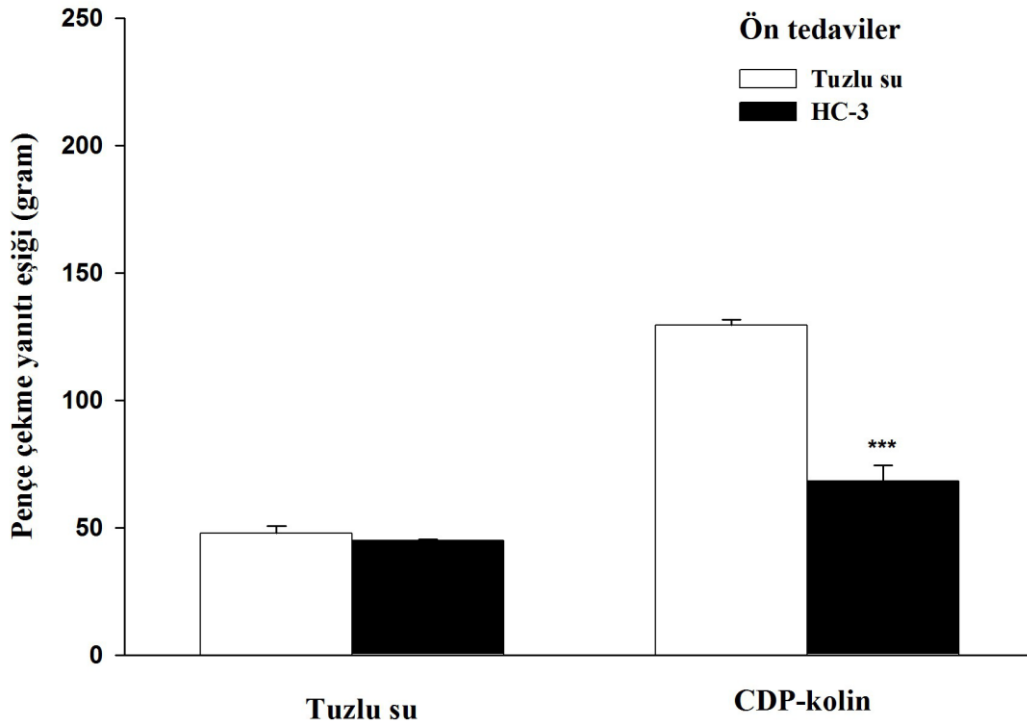
CDP-kolin'in hidroliz ürünleri olan kolin ve sitidinin, OXA ile oluşturulan akut nöropatik ağrı modelindeki antihiperaljezik etkilerini araştırmak amacıyla sıçanlara 10 µl tuzlu su içinde hazırlanan CDP-kolin (1 µmol), kolin (1 µmol), sitidin (1 µmol) veya tuzlu su (10 µl) i.s.v. yolla enjekte edildi. Kolin ve sitidinin, CDP-kolin'e benzer şekilde, uygulanmalarını takiben 15 dakika içinde, OXA sonrası azalmış olan pençe çekme eşik değerini anlamlı bir şekilde arttırdıkları gözlemlendi ($p<0.001$; Şekil 13). Bununla birlikte, sitidinin antihiperaljezik etkisinin daha kısa süreli olduğu ve 30. dakikada kaybolduğu; kolinin antihiperaljezik etkisinin ise daha yüksek ve uzun süreli olduğu ve 45. dakikaya kadar devam ettiği gözlemlendi.



Şekil-13: İntraserebroventriküler yol ile verilen eşmolar dozlardaki CDP-kolin (1 µmol), kolin (1 µmol) ve sitidinin (1 µmol) oxaliplatin ile oluşturulan nöropatik ağrıda mekanik pençe çekme testlerindeki antihiperaljezik etkisi. Değerler 6–10 sıçanın ortalama ± standart hatası olarak verildi. ** $p<0.01$ ve *** $p<0.001$; tuzlu su grubuna (şekilde 0 doz olarak gösterilmiştir) göre anlamlı farkı göstermektedir

4.4 . CDP-kolin'in antihiperalezik aktivitesinde HC-3 ön tedavisinin etkisi

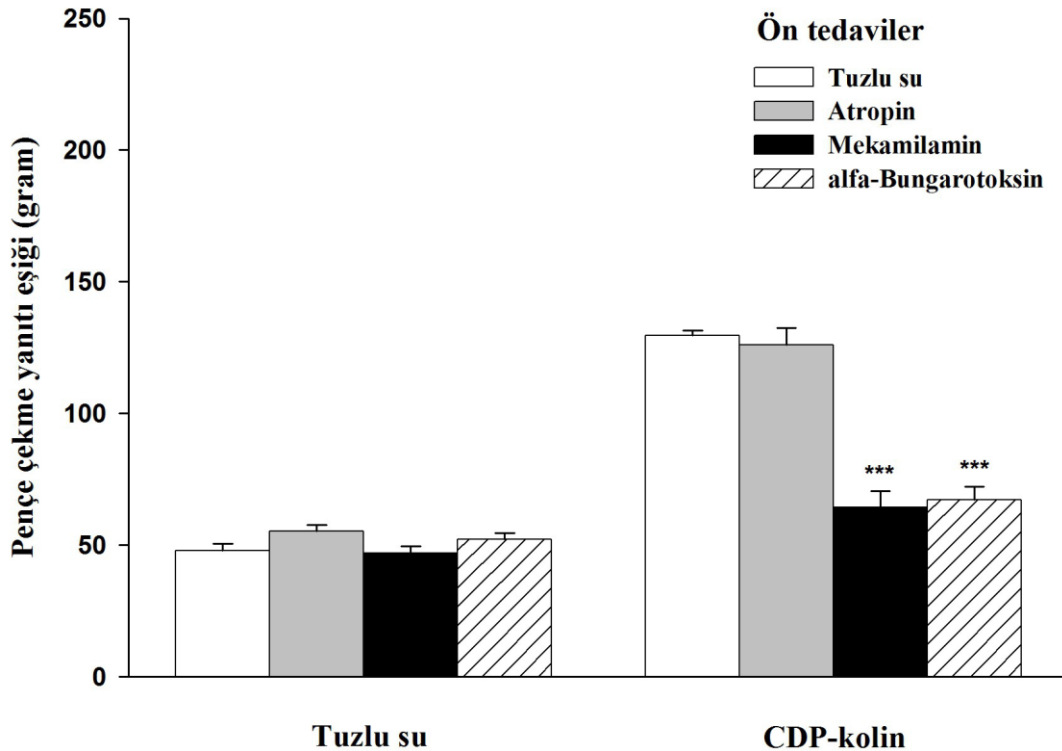
OXA ile oluşturulan akut nöropatik ağrı modelinde CDP-kolin'in oluşturduğu antihiperalezik etkide presinaptik kolinerjik mekanizmaların rolünü araştırmak için, kolinin sinir ucuna geri alımını bloke eden bir ilaç olan HC-3 (1 µg / 10 µl) veya tuzlu su (10 µl) i.s.v. yolla enjekte edildi. Takiben 15 dakika sonra sıçanlara CDP-kolin (1 µmol / 10 µl; i.s.v.) veya tuzlu su (10 µl; i.s.v.) uygulandı. HC-3 ön tedavisi verilen sıçanlarda 15. dakikada ölçülen pençe çekme eşik değerinin 68.3 ± 6 gr, kontrol grubunda ise 129.5 ± 2 gr olduğu ve HC-3'ün CDP-kolin'in etkisini anlamlı bir şekilde ($P<0.001$) bloke ettiği tespit edildi (Şekil 14). HC-3 ön tedavisi ise tek başına pençe çekme yanıtı eşik değerini değiştirmedi.



Şekil-14: Oxaliplatin ile oluşturulan nöropatik ağrıda, intraserebroventriküler yolla verilen CDP-kolin'in mekanik pençe çekme testlerindeki antihiperalezik etkisinin HC-3 (1 µg / 10 µl) ön tedavisi ile bloke edilmesi. Değerler 5-7 sıçanın ortalama ± standart hatası olarak verildi. *** $p<0.001$; kontrol grubuna göre anlamlı farkı göstermektedir.

4.5.CDP-kolin'in antihiperaljezik aktivitesinde kolinerjik reseptör antagonistleri ile yapılan ön tedavilerin etkisi

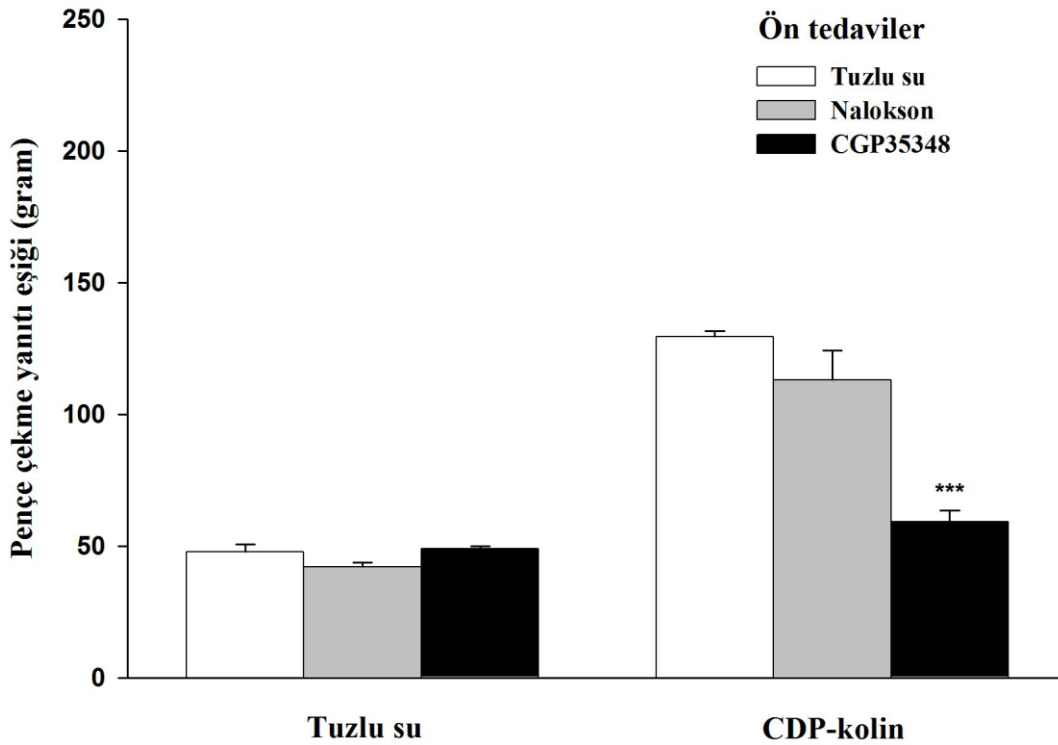
CDP-kolin'in OXA ile oluşturulan akut nöropatik ağrıdaki antihiperaljezik aktivitesine aracılık ettiği düşünülen santral kolinerjik reseptör tiplerinin araştırılması amacıyla, sıçanlara i.s.v. yolla CDP-kolin (1 μ mol) veya tuzlu su (10 μ l) enjeksiyonundan 15 dakika önce, kolinerjik muskarinik reseptör antagonisti atropin sülfat (10 μ g), kolinerjik nikotinik reseptör antagonisti mekamilamin (50 μ g), α 7 nöronal nikotinik asetilkolin reseptör antagonisti α -BgTx (2 μ g) veya tuzlu su (10 μ l) i.s.v. yolla enjekte edildi. Mekamilamin ve α -BgTx CDP-kolin'in antihiperaljezik etkisini anlamlı bir şekilde bloke ettiği ($p<0.001$), buna karşın atropinin anlamlı düzeyde bir antagonizma göstermediği tespit edildi ($p=0.61$) (Şekil 15). Atropin, mekamilamin veya alfa-bungarotoksin ön tedavilerinin, tek başlarına termal pençe çekme yanıtı eşik değerlerinde anlamlı bir değişikliğe neden olmadığı gözlemlendi.



Şekil-15: Oxaliplatin ile oluşturulan nöropatik ağrıda, atropin sülfat, mekamilamin ve alfa-bungarotoksin ön tedavilerinin CDP-kolin'in pençe çekme testlerindeki antihiperaljezik aktivitesi üzerine etkisi. Sıçanlara, CDP-kolinden (1 μ mol) 15 dakika önce, atropin sülfat (10 μ g; i.s.v.), mekamilamin (50 μ g; i.s.v.), alfa-bungarotoksin (2 μ g; i.s.v.) veya tuzlu su (10 μ l) uygulandı. Değerler 5–7 sıçanın ortalama \pm standart hatası olarak verildi. *** $p<0.001$; kontrol grubuna göre anlamlı farkı göstermektedir.

4.6. CDP-kolin'in antihiperalezik aktivitesinde nalokson ve CGP-35348 ön tedavilerinin etkisi

OXA ile oluşturulan akut nöropatik ağrı modelinde, CDP-kolin'in antihiperalezik aktivitesinde santral opioidlerjik ve GABA_Berjik sistemin rolünü araştırmak amacıyla, seçici olmayan opioid reseptör antagonisti nalokson (10 µg), GABA_B reseptör antagonisti CGP-35348 (20 µg) veya tuzlu su (10 µl) i.s.v. yolla enjekte edildi. Takiben 15 dakika sonra sıçanlara CDP-kolin (1 µmol; i.s.v.) veya tuzlu su (10 µl; i.s.v.) uygulandı. Naloksonun CDP-kolin'in antihiperalezik etkisinde anlamlı bir değişikliğe neden olmadığı (P=0.18; Şekil 16), bununla birlikte CGP-35348'in, CDP-kolin ile ortaya çıkan antihiperalezik etkiyi anlamlı bir şekilde bloke ettiği tespit edildi (p<0.001; Şekil 16). Nalokson ve CGP-35348'in ön tedavilerinin tek başlarına uygulandıklarında pençe çekme yanıtı eşik değerlerini değiştirmedikleri görüldü.



Şekil-16: Oxaliptatin ile oluşturulan nöropatik ağrıda, nalokson, CGP-35348 ve tuzlu su ön tedavilerinin CDP-kolin'in pençe çekme testlerindeki antihiperalezik aktivitesi üzerine etkisi. Sıçanlara, CDP-kolinden (1 µmol) 15 dakika önce nalokson (10 µg; i.s.v.) veya CGP-35348 (20 µg; i.s.v.) verilmiştir. Değerler ortalama ± standart hata olarak verildi. ***p<0.001; kontrol grubuna göre anlamlı farkı göstermektedir.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Çalışmamızda, sıçanlara i.p. yoldan bir kez uygulanan OXA'nın (6 mg/kg), uygulamadan bir gün sonra başlayan ve ikinci günde maksimum seviyeye ulaşan mekanik hiperaljeziye neden olduğu gözlenmiştir (Şekil 11). Sıçanların pençe çekme eşik değeri 14. günde de bazal değer altında kalmış ($p < 0.01$) ve 21. günde bazal seviyeye dönmüştür. İ.s.v. yolla uygulanan CDP-kolin'in mekanik pençe çekme testinde doza ve zaman bağlı olacak şekilde antihiperalezik etki meydana getirdiği izlenmiştir (Şekil 12). Eş molar dozda uygulanan kolin ve sitidin (i.s.v.), CDP-kolin'e benzer bir etki oluşturmuştur (Şekil 13). CDP-kolin'in meydana getirdiği antihiperalezik etki, i.s.v. yolla uygulanan HC-3, mekamilamin, α -BgTx ve CGP-35348 ön tedavileri ile ortadan kaldırılırken, atropin ve nalokson ön tedavileri CDP-kolin'in etkisini değiştirmemiştir (Şekil 14, Şekil 15, Şekil 16).

Tek doz OXA verilmesi ile meydana getirilen akut nöropatik ağrı modeli ilk olarak Ling ve arkadaşları (8, 9, 11) tarafından tanımlanmıştır. Araştırmacılar, sıçanlarda i.p. yoldan 3, 6 veya 12 mg/kg dozunda uygulanan OXA'nın, uygulama sonrası ikinci günde başlayan, üçüncü günde maksimuma ulaşan ve sekizinci günde geri dönen mekanik allodiniye (von Frey testi) neden olduğunu gözlemlemiştir. Ayrıca, yine ikinci günde belirginleşen ve sekizinci güne kadar devam eden soğuk allodini ve hiperaljezi (kuyruk batırma testi) meydana gelmiştir. Bununla birlikte, OXA'nın mekanik hiperaljezi (Randall ve Selitto), sıcak allodoni veya sıcak hiperaljezi oluşturmadığı tespit edilmiştir (8).

Çalışmamızda, nöropatik ağrı modelinin oluşturulması amacıyla, Ling ve arkadaşlarının (8) elde ettiği veriler dikkate alınarak OXA 6 mg/kg (i.p.) dozunda bir kez uygulanmıştır. Bu doz, OXA'nın klinik kullanımda standart olan 85 mg/m² dozuna karşılık gelmektedir. Ayrıca, Ling ve arkadaşlarının çalışmasında, 12 mg/kg dozunda OXA verilen sıçanların tamamında sekiz saat kadar süren sedasyon hali gözlenmiş ve bu doz sonraki çalışmalar için önerilmemiştir (8). Ling ve arkadaşları (8, 11) bizden farklı olarak, OXA'nın mekanik hiperaljeziye neden olmadığını gözlemiştir. Araştırmacıların, mekanik ağrı eşiği değerlerini belirlerken "vokalizasyonu" (bağırma, inleme) kullanmış olmaları bu farklılığın bir nedeni olabilir. Nitekim mekanik hiperaljezinin pençe çekme eşiği ile değerlendirildiği diğer bir çalışmada, Joseph ve Levine (110), sıçanlara i.v. yoldan 2 mg/kg dozunda verilen OXA'nın, 20 dakika içinde meydana gelen ve birkaç hafta süren mekanik hiperaljeziye neden olduğu tespit etmiştir.

Bu çalışmada elde ettiğimiz veriler, santral yoldan verilen CDP-kolin'in, OXA'nın neden olduğu mekanik hiperaljeziyi azalttığını ilk kez ortaya koyması bakımından önemlidir. CDP-kolin'in antihiperaljezik etkisinin doza ve zamana bağlı olarak gerçekleştiği gözlenmiştir. İki önemli metaboliti olan kolin (1 µmol; i.s.v.) and sitidin'in (1 µmol; i.s.v.) de antihiperaljezik etki gösterdiği izlenmiştir (Şekil 13). Son zamanlarda yapılan çalışmalarda, $\alpha 7$ nAChR'in selektif agonisti olan kolin'in intratekal veya i.s.v. yolla verildiğinde analjezik etki yaptığı ve analjezik etkisinin seçici olmayan muskarinik antagonist atropin ve $\alpha 7$ nAChR antagonistleri metilikonitin ve α -BTX tarafından önlediği gözlenmiştir (82, 83). Hamurtekin ve Gürün (18), sıçanlarda i.s.v. yoldan verilen kolin'in (1 µmol) üç farklı akut ağrı modelinde (termal pençe çekme testi, pençe mekanik baskı testi, asetik asit kıvrınma testi) anlamlı analjezik etki yaptığını tespit etmiştir. Diğer yandan, sitidin'in analjezik etkisi ve mekanizması hakkında henüz yeterli bilgi mevcut değildir. Bağdaş ve arkadaşları da (17), sıçanlarda akut inflamatuvar ve nöropatik ağrı modellerinde sitidin'in (1 µmol, i.s.v.) anlamlı antihiperaljezik etki gösterdiğini gözlemiş ve pürinerjik reseptörlerin bu etkide rol oynayabileceğini öne sürmüşlerdir. Santral yolla verilen pürinerjik reseptör agonistlerinin analjezik etki yaptığını gösteren deneysel çalışmalar bu düşüncüyü desteklemektedir (111, 112). Dolayısıyla, sitidin'in analjezik özelliklerinin ve mekanizmasının daha iyi anlaşılabilmesi için daha ileri deneysel çalışmalara gereksinim vardır.

Çalışmamızda, CDP-kolin'in antihiperaljezik etkisinin HC-3 ön tedavisi ile anlamlı bir şekilde azaldığı görülmüştür (Şekil – 14). Santral yolla verilen CDP-kolin, beyin dokusundaki kolin konsantrasyonunu ve eş zamanlı olarak ACh sentez ve salınımını arttırmaktadır. HC-3 kolinerjik nöronlarda yüksek afiniteli transport sistemi inhibe ederek kolinin presinaptik uçtan geri alınımını önlemektedir. HC-3'ün bu etkisi, kolin ile indüklenen ACh sentezindeki artışı engellenmektedir. Böylece, CDP-kolin'le elde edilen antihiperaljezik etkide, beyinde kolin ve ACh seviyelerinin artması ile sonuçlanan santral presinaptik kolinerjik mekanizmaların aktivasyonunun rol oynadığı söylenebilir. Bu düşüncemiz, daha önce yapılmış ve dışarıdan verilen CDP-kolin'in beyinde asetilkolin ve kolin sentezini ve/veya salgılanmasını arttırdığını gösteren çalışmalar tarafından desteklenmektedir.

CDP-kolin'in ve eş molar dozdaki kolin'in antihiperaljezik etki göstermesi göz önüne alınarak, çalışmamızın bir diğer basamağında, CDP-kolin'in antihiperaljezik etkisinde rol oynayan kolinerjik reseptör tiplerini belirlemek amacıyla, seçici olmayan muskarinik reseptör antagonisti atropin ve seçici olmayan nikotinik reseptör antagonisti mekamilamin

ön tedavileri uygulanmıştır. Atropin CDP-kolin'in antihiperalezik etkisinde bir değişikliğe yol açmazken, mekamilamin bu etkiyi bloke etmiştir (Şekil – 15). Bu bulgu, CDP-kolin'in antihiperalezik etkisinde santral nikotidik reseptörlerin rol oynadığını düşündürmektedir.

Nikotidik reseptör agonistleri ile oluşturulan analjezik etkide özellikle $\alpha 4\beta 2$ ve $\alpha 7$ nikotidik reseptör alt tipleri rol oynamaktadır. CDP-kolin'in hidroliz ürünü kolin $\alpha 7$ nAChR alt tipine agonistik etki göstermektedir ve daha önce de belirttimiz gibi spesifik $\alpha 7$ nACh reseptör antagonistlerinden metilikalakonitin ve α -BTX, kolinin analjezik etkisini engellemektedir. Bu çalışmada, α -BTX'in CDP-kolin'in neden olduğu antihiperalezik etkiyi bloke etmiştir. Bu bulgu, CDP-kolin'in metabolitlerinden biri olan kolinin, $\alpha 7$ nACh reseptör agonisti olarak CDP-kolin'in antihiperalezik etkisinde rol oynadığını düşündürmektedir.

İ.s.v. yoldan verilen kolinin analjezik etkisinde santral nikotidik kolinerjik reseptörlerin yanında, santral muskarinik reseptörlerin de rol aldığı tespit edilmiştir (82, 83). Santral uygulanan CDP-kolin'in nikotidik etkilerine ek olarak muskarinik etkileri de gösterilmiştir (113). Bununla birlikte, bu çalışmada ve CDP-kolin'in akut ağrı modellerindeki antihiperalezik etkisini araştıran diğer çalışmalarda (17-19), atropin CDP-kolin'in antihiperalezik etkisini değiştirmemiştir. Bu sonuç, söz konusu etkide santral muskarinik reseptörlerin aracı olmadığını ortaya koymaktadır.

Çalışmamızda, nikotidik kolinerjik sisteme ilave olarak, CDP-kolin'in antihiperalezik etkisinde rol oyanayabilecek diğer supraspinal nörotransmitter sistemler de araştırılmıştır. Bu amaçla santral opioid reseptörlerin ve GABA_B reseptörlerinin aracılığı değerlendirilmiştir. Opioid reseptör sistemi ve kolinerjik sistem çeşitli yönlerden birbiri ile ilişkili olarak ağrı modülasyonunda görev alır (114). Nikotidik kolinerjik reseptörler ile μ -opioid reseptörleri, beynin çeşitli bölgelerinde birlikte yerleşim göstermekte ve ağrı iletiminin kontrolünde beraber rol oynamaktadırlar (93). Nikotinin analjezik etkisinde, santral kolinerjik ve opioid reseptörlerin aracı olduğu ve nikotinin kolinerjik aktivasyon yaratarak morfinin analjezik etkisini artırdığı belirlenmiştir (88, 89). GABA_A reseptör sistemi de opioid reseptör sistemi gibi, spinal ve supraspinal düzeyde ağrı inhibisyonuna aracılık eder (115). GABA_A reseptör nöronları üzerinde $\alpha 7$ nACh reseptörlerinin varlığı gösterilmiş ve bu reseptörlerin aktivasyonunun GABA salıverilmesini artırdığını ortaya konmuştur (95, 116). Asetilkolin ve kolinin, $\alpha 7$ nACh reseptörleri üzerinden GABA_A reseptör iletimi artırdığı gösterilmiştir (117). Daha önce yapılan çalışmalarda, akut ağrı modellerinde CDP-kolin'in meydana getirdiği analjezik/antihiperalezik etkinin spesifik olmayan opioid reseptör antagonisti nalokson ve GABA_B reseptör antagonisti CGP-35348

tarafından ortadan kaldırıldığı gözlenmiştir (17-19). Bu çalışmada ise nalokson ön tedavisinin CDP-kolin'in antihiperalezik etkisini değiştirmediği görölmüş ve OXA sonrası gelişen mekanik hiperalezide, CDP-kolin'in antihiperalezik etkisine opioid reseptörlerin aracılık etmediği sonucuna varılmıştır. Wang ve arkadaşları (83), farelerde akut ve inflamatuvar ağrıda kolinin meydana getirdiği analjezik etkide de supraspinal opioid reseptörlerin rol oynamadığını göstermişlerdir. Nikotik agonistlerin oluşturduğu analjezik etkide opioid reseptörlerin aracı olmadığını gösteren başka veriler de mevcuttur (17, 83, 118). Bununla birlikte, Hamurtekin ve arkadaşları (19), sıçanlarda akut ağrı modellerinde, CDP-kolin'in analjezik/antihiperalezik etkisinin meydana gelmesinde bu reseptörlerin de rolünün olduğunu tespit etmiştir. Çalışmalarda farklı deneysel ağrı modellerinin ve ağrı eşiği ölçme yöntemlerinin kullanılmış olması farklı sonuçların ortaya çıkmasına neden olmuş olabilir.

Diğer yandan, literatürde yer alan çalışmalarla (17, 19) uyumlu olarak CDP-kolin'in antihiperalezik etkisinin CGP-35348 tarafından bloke edildiği tespit edilmiştir. Bu bulgu, CDP-kolin ile elde edilen antihiperalezik etkide supraspinal GABA_A reseptörlerinin rolü bulunduğunu düşündürmektedir. Yakın zamanda yayınlanan bir çalışmada, sıçanlarda bir kez uygulanan OXA (6 mg/kg, i.p.) sonrası gelişen soğuk allodininin pregabalin (2 mg/kg, i.v.) ile anlamlı bir şekilde azaldığı gösterilmiştir (9).

Sonuç olarak, bu çalışmada merkezi yolla uygulanan CDP-kolin'in OXA tedavisine bağlı olarak gelişen hiperaleziyi azaltabildiği ve bu etkisine supraspinal $\alpha 7$ nAChR ve GABA_B reseptörlerinin aracılık ettiği ilk defa gösterilmiştir. Kemoterapötik ajanların neden olduğu nöropatik ağrının tedavisinde CDP-kolin kullanımının bir seçenek olarak gündeme gelebilmesi için, bu konuda yapılacak kapsamlı klinik çalışmalara gereksinim bulunmaktadır ve çalışmamızdan elde edilen veriler bu araştırmalara yol gösterecektir.

6. KAYNAKLAR

1. GROTHEY A, GOLDBERG RM. A review of oxaliplatin and its clinical use in colorectal cancer. *Expert Opin Pharmacother*, 5:2159-2170, 2004.
2. GRAHAM MA, LOCKWOOD GF, GREENSLADE D, BRIENZA S, BAYSSAS M, GAMELIN E. Clinical pharmacokinetics of oxaliplatin: a critical review. *Clin Cancer Res*, 6:1205-1218, 2000.
3. HOFF PM, SAAD ED, COSTA F, COUTINHO AK, CAPONERO R, PROLLA G, GANSL RC. Literature review and practical aspects on the management of oxaliplatin-associated toxicity. *Clin Colorectal Cancer*, 11:93-100, 2012.
4. GROTHEY A. Clinical management of oxaliplatin-associated neurotoxicity. *Clin Colorectal Cancer*, 5 Suppl: S38-461, 2005.
5. PASETTO LM, D'ANDREA MR, ROSSI E, MONFARDINI S. Oxaliplatin-related neurotoxicity: how and why? *Crit Rev Oncol Hematol*, 59:159-168, 2006.
6. ARGYRIOU AA, POLYCHRONOPOULOS P, ICONOMOU G, CHRONI E, KALOFONOS HP. A review on oxaliplatin-induced peripheral nerve damage. *Cancer Treat Rev*, 34:368-377, 2008.
7. WEICKHARDT A, WELLS K, MESSERSMITH W. Oxaliplatin-induced neuropathy in colorectal cancer. *J Oncol*, 2011:201593, 2011
8. LING B, COUDORÉ-CIVIALE MA, BALAYSSAC D, ESCHALIER A, COUDORÉ F, AUTHIER N. Behavioral and immunohistological assessment of painful neuropathy induced by a single oxaliplatin injection in the rat. *Toxicology*, 234:176-184, 2007.
9. LING B, COUDORÉ F, DECALONNE L, ESCHALIER A, AUTHIER N. Comparative antiallodynic activity of morphine, pregabalin and lidocaine in a rat model of neuropathic pain produced by one oxaliplatin injection. *Neuropharmacology*, 55:724-728, 2008.
10. SAKURAI M, EGASHIRA N, KAWASHIRI T, YANO T, IKESUE H, OISHI R. Oxaliplatin-induced neuropathy in the rat: involvement of oxalate in cold hyperalgesia but not mechanical allodynia. *Pain*, 147:165-174, 2009
11. LING B, AUTHIER N, BALAYSSAC D, ESCHALIER A, COUDORE F. Behavioral and pharmacological description of oxaliplatin-induced painful neuropathy in rat. *Pain*, 128:225-34, 2007.
12. XIAO WH, ZHENG H, BENNETT GJ. Characterization of oxaliplatin-induced chronic painful peripheral neuropathy in the rat and comparison with the neuropathy induced by paclitaxel. *Neuroscience*, 203:194-206, 2012.
13. JOSEPH EK, LEVINE JD. Comparison of oxaliplatin- and cisplatin-induced painful peripheral neuropathy in the rat. *J Pain*, 10:534-541, 2009.
14. CAVALETTI G, TREDICI G, PETRUCCIOLI MG, DONDÈ E, TREDICI P, MARMIROLI P, MINOIA C, RONCHI A, BAYSSAS M, ETIENNE GG. Effects of different schedules of oxaliplatin treatment on the peripheral nervous system of the rat. *Eur J Cancer*, 37:2457-2463, 2001.
15. JOSEPH EK, CHEN X, BOGEN O, LEVINE JD. Oxaliplatin acts on IB4-positive nociceptors to induce an oxidative stress-dependent acute painful peripheral neuropathy. *J Pain*, 9:463-472, 2008.
16. SECADES JJ, LORENZO JL. Citicoline: pharmacological and clinical review, 2006 update *Methods Find Exp Clin Pharmacol*, 28 Suppl B:1-56, 2006.

17. 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):589-598, 2011.
18. 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(1):92-100, 2006.
19. 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. *Neurosci Lett*, 420:116-121, 2007.
20. 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(5):1680-1687, 2009.
21. ARGYRIOU AA, BRUNA J, MARMIROLI P, CAVALETTI G. Chemotherapy-induced peripheral neurotoxicity (CIPN): an update. *Crit Rev Oncol Hematol*, 82:51-77, 2012.
22. JAGGI AS, SINGH N. Mechanisms in cancer-chemotherapeutic drugs-induced peripheral neuropathy. *Toxicology*, 291(1-3): 1-9, 2012.
23. KALEY TJ, DEANGELIS LM. Therapy of chemotherapy-induced peripheral neuropathy. *Br J Haematol*, 145:3-14, 2009.
24. CUNNINGHAM D, OKINES AF, ASHLEY S. Capecitabine and oxaliplatin for advanced esophagogastric cancer. *N Engl J Med*, 362:858-859, 2010.
25. CUNNINGHAM D, STARLING N, RAO S, IVESON T, NICOLSON M, COXON F, MIDDLETON G, DANIEL F, OATES J, NORMAN AR; Upper Gastrointestinal Clinical Studies Group of the National Cancer Research Institute of the United Kingdom. Capecitabine and oxaliplatin for advanced esophagogastric cancer. *N Engl J Med*, 358:36-46, 2008.
26. RUBBIA-BRANDT L, AUDARD V, SARTORETTI P, ROTH AD, BREZAULT C, LE CHARPENTIER M, DOUSSET B, MOREL P, SOUBRANE O, CHAUSSADE S, MENTHA G, TERRIS B. Severe hepatic sinusoidal obstruction associated with oxaliplatin-based chemotherapy in patients with metastatic colorectal cancer. *Ann Oncol*, 15(3):460-466, 2004.
27. MEHTA NN, RAVIKUMAR R, COLDHAM CA, BUCKELS JA, HUBSCHER SG, BRAMHALL SR, WIGMORE SJ, MAYER AD, MIRZA DF. Effect of preoperative chemotherapy on liver resection for colorectal liver metastases. *Eur J Surg Oncol*, 34(7):782-786, 2008.
28. ZORZI D, LAURENT A, PAWLIK TM, LAUWERS GY, VAUTHEY JN, ABDALLA EK. Chemotherapy-associated hepatotoxicity and surgery for colorectal liver metastases. *Br J Surg*, 94(3):274-286, 2007.
29. BAYRAKTAR UD, SEREN S, BAYRAKTAR Y. Hepatic venous outflow obstruction: three similar syndromes. *World J Gastroenterol*, 13(13):1912-1927, 2007.
30. CURTIS BR, KALISZEWSKI J, MARQUES MB, SAIF MW, NABELLE L, BLANK J, MCFARLAND JG, ASTER RH. Immune-mediated thrombocytopenia resulting from sensitivity to oxaliplatin. *Am J Hematol* 81(3):193-198, 2006.
31. BRANDI G, PANTALEO MA, GALLI C, FALCONE A, ANTONUZZO A, MORDENTI P, DI MARCO MC, BIASCO G. Hypersensitivity reactions related to oxaliplatin (OHP). *Br J Cancer*, 89:477-481, 2003.

32. EGASHIRA N, HIRAKAWA S, KAWASHIRI T, YANO T, IKESUE H, OISHI R. Mexiletine reverses oxaliplatin-induced neuropathic pain in rats. *J Pharmacol Sci*, 112(4):473-476, 2010.
33. ADELSBERGER H, QUASTHOFF S, GROSSKREUTZ J, LEPIER A, ECKEL F, LERSCH C. The chemotherapeutic oxaliplatin alters voltage-gated Na(+) channel kinetics on rat sensory neurons. *Eur J Pharmacol*, 406(1):25-32, 2000.
34. GROLLEAU F, GAMELIN L, BOISDRON-CELLE M, LAPIED B, PELHATE M, GAMELIN E. A possible explanation for a neurotoxic effect of the anticancer agent oxaliplatin on neuronal voltage-gated sodium channels. *J Neurophysiol*, 85(5):2293-2297, 2001.
35. BENOIT E, BRIENZA S, DUBOIS JM. Oxaliplatin, an anticancer agent that affects both Na+ and K+ channels in frog peripheral myelinated axons. *Gen Physiol Biophys*, 25(3):263-76, 2006.
36. RUTKOVE SB. Effects of temperature on neuromuscular electrophysiology. *Muscle Nerve*, 24:867-882, 2001.
37. GHELARDINI C, DESAPHY JF, MURAGLIA M, CORBO F, MATUCCI R, DIPALMA A, BERTUCCI C, PISTOLOZZI M, NESI M, NORCINI M, FRANCHINI C, CAMERINO DC. Effects of a new potent analog of tocainide on hNav1.7 sodium channels and in vivo neuropathic pain models. *Neuroscience*, 169:863-873, 2010.
38. KAGIAVA A, TSINGOTJIDOU A, EMMANOUILIDES C, THEOPHILIDIS G. The effects of oxaliplatin, an anticancer drug, on potassium channels of the peripheral myelinated nerve fibres of the adult rat. *Neurotoxicology*, 29(6):1100-1106, 2008.
39. DESCOEUR J, PEREIRA V, PIZZOCCARO A, FRANCOIS A, LING B, MAFFRE V, COUETTE B, BUSSEROLLES J, COURTEIX C, NOEL J, LAZDUNSKI M, ESCHALIER A, AUTHIER N, BOURINET E. Oxaliplatin-induced cold hypersensitivity is due to remodelling of ion channel expression in nociceptors. *EMBO Mol Med*, 3:266-278, 2011.
40. TA LE, ESPESET L, PODRATZ J, WINDEBANK AJ. Neurotoxicity of oxaliplatin and cisplatin for dorsal root ganglion neurons correlates with platinum-DNA binding. *Neurotoxicology*, 27(6):992-1002, 2006.
41. GAUCHAN P, ANDOH T, KATO A, KURAIISHI Y. Involvement of increased expression of transient receptor potential melastatin 8 in oxaliplatin-induced cold allodynia in mice. *Neurosci Lett*, 458(2):93-95, 2009.
42. ANAND U, OTTO WR, ANAND P. Sensitization of capsaicin and icilin responses in oxaliplatin treated adult rat DRG neurons. *Mol Pain*, 6:82, 2010.
43. MIHARA Y, EGASHIRA N, SADA H, KAWASHIRI T, USHIO S, YANO T, IKESUE H, OISHI R. Involvement of spinal NR2B-containing NMDA receptors in oxaliplatin-induced mechanical allodynia in rats. *Mol Pain*, 7:8, 2011.
44. NORCINI M, VIVOLI E, GALEOTTI N, BIANCHI E, BARTOLINI A, GHELARDINI C. Supraspinal role of protein kinase C in oxaliplatin-induced neuropathy in rat. *Pain*, 146(1-2):141-147, 2009.
45. GALEOTTI N, VIVOLI E, BILIA AR, VINCIERI FF, GHELARDINI C. St. John's Wort reduces neuropathic pain through a hypericin-mediated inhibition of the protein kinase Cgamma and epsilon activity. *Biochem Pharmacol*, 79(9):1327-1336, 2010.
46. XIAO WH, BENNETT GJ. Effects of mitochondrial poisons on the neuropathic pain produced by the chemotherapeutic agents, paclitaxel and oxaliplatin. *Pain*, 153(3):704-709, 2012.

47. RENN CL, CAROZZI VA, RHEE P, GALLOP D, DORSEY SG, CAVALETTI G. Multimodal assessment of painful peripheral neuropathy induced by chronic oxaliplatin-based chemotherapy in mice. *Mol Pain*, 7:29, 2011
48. BINDER A, STENGEL M, MAAG R, WASNER G, SCHOCH R, MOOSIG F, SCHOMMER B, BARON R. Pain in oxaliplatin-induced neuropathy--sensitisation in the peripheral and central nociceptive system. *Eur J Cancer*, 43(18):2658-2663, 2007.
49. AUTHIER N, BALAYSSAC D, MARCHAND F, LING B, ZANGARELLI A, DESCOEUR J, COUDORE F, BOURINET E, ESCHALIER A. Animal models of chemotherapy-evoked painful peripheral neuropathies. *Neurotherapeutics*, 6(4):620-629, 2009.
50. GAUCHAN P, ANDOH T, IKEDA K, FUJITA M, SASAKI A, KATO A, KURAIISHI Y. Mechanical allodynia induced by paclitaxel, oxaliplatin and vincristine: different effectiveness of gabapentin and different expression of voltage-dependent calcium channel alpha(2)delta-1 subunit. *Biol Pharm Bull*, 32(4):732-734, 2009.
51. KENNEDY EP, WEISS SB. The function of cytidine coenzymes in the biosynthesis of phospholipides. *J Biol Chem*, 222(1): 193-214, 1956.
52. LOPEZ-COVIELLA I, AGUT J, SAVCI V, ORTIZ JA, WURTMAN RJ. Evidence that 5'-cytidinediphosphocholine can affect brain phospholipid composition by increasing choline and cytidine plasma levels. *J Neurochem*, 65: 889-894, 1995.
53. PARONI R, CIGHETTI G, DEL PUPPO M, KIENLE MG. Evidence for a different metabolic behaviour of cytidine diphosphate choline after oral and intravenous administration to rats. *Pharmacol Res Commun*, 17(9): 805-829, 1985.
54. WURTMAN RJ, REGAN M, ULUS IH, YU L. Effect of oral CDP-choline on plasma choline and uridine levels in humans. *Biochem. Pharmacol*, 60: 989-992, 2000.
55. LOPEZ-COVIELLA I, AGUT J, VON BORSTEL R, WURTMAN RJ. Metabolism of cytidine (5')-diphosphocholine (cdp-choline) following oral and intravenous administration to the human and the rat. *Neurochem Int*, 11:293-297, 1987.
56. FRESTA M, WEHRLI E, PUGLISI 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): 1769-1774, 1995.
57. GALLETTI P, DE ROSA M, COTTICELLI MG, MORANA A, VACCARO R, ZAPPIA V. Biochemical rationale for the use of CDPcholine in traumatic brain injury: pharmacokinetics of the orally administered drug. *J Neurol Sci*, 103:19-25, 1991.
58. ROMERO A, SERRATOSA J, SACRISTAN A, ORTIZ JA. High-resolution autoradiography in mouse brain and cerebellum 10 days after radiolabelled CDP-choline administration. *Arzneimittelforschung*, 33(7A): 1058-1060, 1983.
59. ULUS IH, CANSEV M. Kolin'in merkezi ve periferik kolinerjik nöronlarda ve kolinerjik iletimdeki işlevi. *ACU Sağlık Bil Derg*, 1:68-80,2010.
60. OKUDA T, HAGA T, KANAİ Y, ENDOU H, ISHİHARA T, KATSURA I. Identification and characterization of the high-affinity choline transporter. *Nat Neurosci*, 3:120-125, 2000
61. OKUDA T, HAGA T. High-affinity choline transporter. *Neurochem Res*, 28:483-488, 2003.
62. COHEN EL, WURTMAN RJ. Brain acetylcholine: increase after systemic choline administration. *Life Sci*, 16(7): 1095-1102, 1975.

63. COHEN EL, WURTMAN RJ. Brain acetylcholine: control by dietary choline. *Science*, 191(4227): 561-562, 1976.
64. CARRIERE JL, EL-FAKANAY EE. Choline is a full agonist in inducing activation of neuronal nitric oxide synthase via the muscarinic M1 receptor. *Pharmacology*, 60:82-89, 2000.
65. ALKONDON M, PEREIRA EF, CORTES WS, MAELICKE A, ALBUQUERQUE EX. Choline is a selective agonist of alpha7 nicotinic acetylcholine receptors in the rat brain neurons. *Eur J Neurosci*, 9:2734-2742, 1997.
66. WEISS GB. Metabolism and actions of CDP-choline as an endogenous compound and administered exogenously as citicoline. *Life Sci*. 56: 637-660, 1995.
67. 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.
68. CANSEV M, WATKINS CJ, VAN DER BEEK EM, WURTMAN RJ. Oral uridine 5' monophosphate (UMP) increases brain CDP-choline levels in gerbils. *Brain Res*, 1058: 101-108, 2005.
69. CANSEV M. Uridine and cytidine in the brain: their transport and utilization. *Brain Res Rev*, 52:389-397, 2006.
70. SAVCI V. CDP-Kolin: Nükleotid mi, yoksa bir kolinerjik ilaç mı? *Türk Farmakoloji Derneği Bülteni*, 67:8-13, 2001.
71. 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.
72. SAVCI V, GURUN MS, ULUS IH, KIRAN BK. Effect of intracerebroventricularly injected choline on plasma ACTH and beta-endorphin levels in conscious rats. *Eur J Pharmacol*, 309(3):275-80, 1996.
73. SAVCI V, GURUN MS, ULUS IH, KIRAN BK. Intracerebroventricular injection of choline increases plasma oxytocin levels in conscious rats. *Brain Res*, 709(1):97-102, 1996.
74. GURUN MS, SAVCI V, ULUS IH, KIRAN BK Centrally administered choline increases plasma prolactin levels in conscious rats. *Neurosci Lett*, 232(2):79-82, 1997.
75. 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): 513-523, 2004.
76. SAVCI V, GOKTALAY G, CANSEV M, CAVUN S, YILMAZ MS, ULUS IH. Intravenously injected CDP-choline increases blood pressure and reverses hypotension in haemorrhagic shock: effect is mediated by central cholinergic activation. *Eur J Pharmacol*, 468(2): 129-139, 2003
77. CAVUN S, SAVCI V, ULUS IH. Centrally injected CDP-choline increases plasma vasopressin levels by central cholinergic activation. *Fundam Clin Pharmacol*, 18(1): 71-77, 2004.
78. PEDIGO NW, DEWEY WL, HARRIS LS. Determination and characterization of the antinociceptive activity of intraventricularly administered acetylcholine in mice. *J Pharmacol Exp Ther*, 193(3): 845-852, 1975.
79. EISENACH JC. Muscarinic-mediated analgesia. *Life Sci*, 64(6-7): 549-554, 1999
80. NAGUIB M, YAKSH TL. Characterization of muscarinic receptor subtypes that mediate antinociception in the rat spinal cord. *Anesth Analg*, 85(4): 847-853, 1997

81. WESS J, DUTTARROY A, GOMEZA J, ZHANG W, YAMADA M, FELDER CC, BERNARDINI N, REEH PW. Muscarinic receptor subtypes mediating central and peripheral antinociception studied with muscarinic receptor knockout mice: a review. *Life Sci*, 72(18-19): 2047-2054, 2003.
82. DAMAJ MI, MEYER EM, MARTIN BR. The antinociceptive effects of alpha7 nicotinic agonists in an acute pain model. *Neuropharmacology*, 39(13): 2785-2791, 2000.
83. WANG Y, SU DM, WANG RH, LIU Y, WANG H. Antinociceptive effects of choline against acute and inflammatory pain. *Neuroscience*, 132(1): 49-56, 2005.
84. DECKER MW, BANNON AW, BUCKLEY MJ, KIM DJ, HOLLADAY MW, RYTHYER KB, LIN NH, WASICAK JT, WILLIAMS M, ARNERIC SP. Antinociceptive effects of the novel neuronal nicotinic acetylcholine receptor agonist, ABT-594, in mice. *Eur J Pharmacol*, 346(1):23-33, 1998.
85. JONES PG, DUNLOP J. Targeting the cholinergic system as a therapeutic strategy for the treatment of pain. *Neuropharmacology*, 53(2):197-206, 2007.
86. HADJICONSTANTINO M, NEFF NH. Nicotine and endogenous opioids: neurochemical and pharmacological evidence. *Neuropharmacology*, 60(7-8):1209-1220, 2011.
87. MARCO EM, GRANSTREM O, MORENO E, LLORENTE R, ADRIANI W, LAVIOLA G, VIVEROS MP. Subchronic nicotine exposure in adolescence induces long-term effects on hippocampal and striatal cannabinoid-CB1 and mu-opioid receptors in rats. *Eur J Pharmacol*, 557(1):37-43, 2007.
88. ZARRINDAST MR, NAMI AB, FARZIN D. Nicotine potentiates morphine antinociception: a possible cholinergic mechanism. *Eur Neuropsychopharmacol*, 6(2): 127-133, 1996.
89. ZARRINDAST MR, PAZOUKI M, NASSIRI-RAD S. Involvement of cholinergic and opioid receptor mechanisms in nicotine-induced antinociception. *Pharmacol Toxicol*, 81(5): 209-213, 1997.
90. DECKER MW, BANNON AW, BUCKLEY MJ, KIM DJ, HOLLADAY MW, RYTHYER KB, LIN NH, WASICAK JT, WILLIAMS M, ARNERIC SP. Antinociceptive effects of the novel neuronal nicotinic acetylcholine receptor agonist, ABT-594, in mice. *Eur J Pharmacol*, 346(1):23-33, 1998.
91. DAMAJ MI, GLASSCO W, ACETO MD, MARTIN BR. Antinociceptive and pharmacological effects of metanicotine, a selective nicotinic agonist. *J Pharmacol Exp Ther*, 291(1):390-398, 1999.
92. BOUAZIZ H, TONG C, YOON Y, HOOD DD, EISENACH JC. Intravenous opioids stimulate norepinephrine and acetylcholine release in spinal cord dorsal horn. Systematic studies in sheep and an observation in a human. *Anesthesiology*, 84(1): 143-154, 1996.
93. MANSOUR A, WATSON SJ, AKIL H. Opioid receptors: past, present and future. *Trends Neurosci*, 18(2): 69-70, 1995.
94. ALKONDON 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): 2693-2705, 1999.
95. MAGGI L, SHER E, CHERUBINI E. Regulation of GABA release by nicotinic acetylcholine receptors in the neonatal rat hippocampus. *J Physiol.*, 536(Pt 1): 89-100, 2001.
96. MCCLURE-BEGLEY TD, KING NM, COLLINS AC, STITZEL JA, WEHNER JM, BUTT CM. Acetylcholine-stimulated [3H]GABA release from mouse brain

- synaptosomes is modulated by $\alpha 4\beta 2$ and $\alpha 4\alpha 5\beta 2$ nicotinic receptor subtypes. *Mol Pharmacol*, 75(4):918-926, 2009.
97. SON JH, WINZER-SERHAN UH. Expression of neuronal nicotinic acetylcholine receptor subunit mRNAs in rat hippocampal GABAergic interneurons. *J Comp Neurol*, 511(2):286-299, 2008.
 98. YANG L, ZHANG FX, HUANG F, LU YJ, LIGD, BAO L, XIAO HS, ZHANG X. Peripheral nerve injury induces trans-synaptic modification of channels, receptors and signal pathways in rat dorsal spinal cord. *Eur J Neurosci*, 19(4):871-883, 2004.
 99. XIAO HS, HUANG QH, ZHANG FX, BAO L, LU YJ, GUO C, YANG L, HUANG WJ, FU G, XU SH, CHENG XP, YAN Q, ZHU ZD, ZHANG X, CHEN Z, HAN ZG, ZHANG X. Identification of gene expression profile of dorsal root ganglion in the rat peripheral axotomy model of neuropathic pain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(12):8360-8365, 2002.
 100. BANNON AW, DECKER MW, KIM DJ, CAMPBELL JE, ARNERIC SP. ABT-594, a novel cholinergic channel modulator, is efficacious in nerve ligation and diabetic neuropathy models of neuropathic pain. *Brain Res*, 801(1-2):158-163, 1998.
 101. LYNCH JJ 3RD, WADE CL, MIKUSA JP, DECKER MW, HONORE P. ABT-594 (a nicotinic acetylcholine agonist): anti-allodynia in a rat chemotherapy-induced pain model. *Eur J Pharmacol*, 509(1):43-48, 2005.
 102. RASHID MH, UEDA H. Neuropathy-specific analgesic action of intrathecal nicotinic agonists and its spinal GABA-mediated mechanism. *Brain Res*, 953(1-2):53-56, 2002.
 103. 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):245-252, 2009.
 104. ROWBOTHAM MC, ARSLANIAN A, NOTHAFT W, DUAN WR, BEST AE, PRITCHETT Y, ZHOU Q, STACEY BR. Efficacy and safety of the $\alpha 4\beta 2$ neuronal nicotinic receptor agonist ABT-894 in patients with diabetic peripheral neuropathic pain. *Pain*, 153(4):862-868, 2012.
 105. RANDALL LO, SELITTO JJ. A method for measurement of analgesic activity on inflamed tissue. *Arch Int Pharmacodyn Ther*, 111(4):409-419, 1957.
 106. 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): 513-523, 2004.
 107. CAVUN S, SAVCI V, ULUS IH. Centrally injected CDP-choline increases plasma vasopressin levels by central cholinergic activation. *Fundam Clin Pharmacol.*, 18(1): 71-77, 2004.
 108. MAHMOUDI M, ZARRINDAST MR. Effect of intracerebroventricular injection of GABA receptor agents on morphine-induced antinociception in the formalin test. *J Psychopharmacol*, 16(1): 85-91, 2002.
 109. MALCANGIO M, GHELARDINI C, GIOTTI A, MALMBERG-AIELLO P, BARTOLINI A. CGP 35348, a new GABAB antagonist, prevents antinociception and muscle-relaxant effect induced by baclofen. *Br J Pharmacol*, 103(2): 1303-1308, 1991.
 110. JOSEPH EK, LEVINE JD. Comparison of oxaliplatin- and cisplatin-induced painful peripheral neuropathy in the rat. *J Pain*, 10(5):534-541, 2009.
 111. FUKUI M, NAKAGAWA T, MINAMI M, SATOH M. Antinociceptive effects of intracerebroventricularly administered P2 purinoceptor agonists in the rat. *Eur J Pharmacol*, 419(1):25-31, 2001.

- 112.OKADA M, NAKAGAWA T, MINAMI M, SATOH M. Analgesic effects of intrathecal administration of P2Y nucleotide receptor agonists UTP and UDP in normal and neuropathic pain model rats. *J Pharmacol Exp Ther*, 303(1):66-73, 2002.
- 113.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): 388-398, 2002.
- 114.LEITE-PANISSI CR, BRENTGANI MR, MENESCAL-DE-OLIVEIRA L. Cholinergic-opioidergic interaction in the central amygdala induces antinociception in the guinea pig. *Braz J Med Biol Res*, 37(10): 1571-1579, 2004
- 115.SAWYNOK J, LABELLA FS. On the involvement of GABA in the analgesia produced by baclofen, muscimol and morphine. *Neuropharmacology*, 21(5): 397-403, 1982.
- 116.ALKONDON 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): 2693-2705, 1999.
- 117.ALKONDON M, BRAGA MF, PEREIRA EF, MAELICKE A, ALBUQUERQUE EX. Alpha7 nicotinic acetylcholine receptors and modulation of gabaergic synaptic transmission in the hippocampus. *Eur J Pharmacol*, 393(1-3): 59-67, 2000.
- 118.CUCCHIARO G, XIAO Y, GONZALEZ-SULSER A, KELLAR KJ. Analgesic effects of Sazetidine-A, a new nicotinic cholinergic drug. *Anesthesiology*, 109(3):512-519, 2008.

7. TEŞEKKÜR

Doktora eğitimimi tamamlamamda ve bu tezi hazırlamamda bilgi ve deneyimlerini benden esirgemeyen, tez danışmanım sayın Prof. Dr. M. Sibel GÜRÜN'e; başta Anabilim Dalı Başkanı sayın Prof. Dr. Levent BÜYÜKUYSAL olmak üzere, bilimsel ve lojistik anlamda desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen ve bilimsel bakış açıma yön veren tüm Farmakoloji ve Klinik Farmakoloji öğretim üyelerine; tez izleme komite üyeleri sayın Prof. Dr. Osman MANAVOĞLU ve sayın Doç. Dr. Gökhan GÖKTALAY'a; doktora tez çalışmalarım sırasında yardımlarını esirgemeyen, birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum değerli arkadaşlarım sayın Veteriner Hekim Deniz BAĞDAŞ ve Araştırma Görevlisi Doktor Hasret YÜCEL ÖZBÖLÜK'e, teknik konulardaki desteği ile her zaman yanımda olan sayın Kimyager Sami AYDIN'a; yardımseverliklerini ve hoşgörülerini esirgemeyen Uludağ Üniversitesi Deneysel Hayvanları Yetiştirme ve Araştırma Merkezi çalışanlarına teşekkürlerimi sunarım.

8. ÖZGEÇMİŞ

20 Nisan 1972 tarihinde Samsun'da doğdum. İlk, orta ve lise eğitimimi Samsun'da tamamladıktan sonra, 1989 – 1995 tarihleri arasında On dokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi'nde tıp eğitimi aldım ve 1995 yılında tıp doktoru ünvanını kazandım. Takiben, Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi (UÜTF) İç Hastalıkları Anabilim Dalı'nda, sırasıyla İç Hastalıkları (1995 – 2000) ve Tıbbi Onkoloji (2000 – 2005) ihtisasımı tamamladım. Halen UÜTF İç Hastalıkları Anabilim Dalı'nda öğretim üyesi olarak görev yapmaktayım. 2007 tarihinden beri UÜTF Farmakoloji ve Klinik Farmakoloji Anabilim Dalı'nda doktora eğitimimi almaktayım.