



T.C.
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
FARMAKOLOJİ ve KLİNİK FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI

**CDP-KOLİN'İN ANALJEZİK ETKİSİ VE ETKİYE ARACILIK
EDEN MEKANİZMALAR**

Dr. Emre HAMURTEKİN

UZMANLIK TEZİ

BURSA - 2007



T.C.
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
FARMAKOLOJİ ve KLİNİK FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI

**CDP-KOLİN'İN ANALJEZİK ETKİSİ VE ETKİYE ARACILIK
EDEN MEKANİZMALAR**

Dr. Emre HAMURTEKİN

UZMANLIK TEZİ

DANIŞMAN: Prof. Dr. M. Sibel GÜRÜN

BURSA - 2007

İÇİNDEKİLER

KONU BAŞLIĞI	SAYFA
<u>İçindekiler</u>	<u>i</u>
<u>Türkçe Özet</u>	<u>ii</u>
<u>İngilizce Özet</u>	<u>iv</u>
<u>Giriş ve Amac</u>	<u>1</u>
<u>Genel Bilgiler</u>	<u>4</u>
<u>Gereç ve Yöntem</u>	<u>22</u>
<u>Bulgular</u>	<u>29</u>
<u>Tartışma ve Sonuç</u>	<u>47</u>
<u>Kaynaklar</u>	<u>55</u>
<u>Tesekkür</u>	<u>81</u>
<u>Özgeçmiş</u>	<u>82</u>

ÖZET

Bu çalışmada, sıçanlarda akut ağrı modellerinde intraserebroventriküler (i.s.v.) yolla uygulanan CDP-kolin'in analjezik etkisi araştırıldı.

Deneylerde 300-350 g ağırlığında Sprague-Dawley erkek sıçanlar kullanıldı. İlaçlar, sıçanların sağ serebral yan ventriküllerine yerleştirilen kılavuz kanül aracılığı ile i.s.v. yolla uygulandı. Sıçanların akut ağrı duyarlılığı termal ve mekanik pençe çekme testi kullanılarak değerlendirildi. İ.s.v. yolla uygulanan CDP-kolin'in motor performans üzerine olan etkilerini değerlendirmek için rota-rod testi kullanıldı.

CDP-kolin (0.5, 1 ve 2 µmol; i.s.v.) termal ve mekanik akut ağrı modellerinde doza ve zamana bağlı olacak şekilde analjezik etki meydana getirdi. Eşmolar dozlardaki kolin (1 µmol; i.s.v.) ve CDP-kolin (1 µmol; i.s.v.) birbirine benzer şekilde bir analjezik etki meydana getirirken, sitidin (1 µmol; i.s.v.) analjezik etki meydana getirmedir. CDP-kolin'in analjezik etkisi her iki testte de, i.s.v. yolla uygulanan yüksek afiniteli kolin geri alım blokleri HC-3 (1 µg), seçici olmayan nikotinik reseptör antagonisti mekamilamin (50 µg), α7 nöronal nikotinik reseptör antagonisti MLA (25 µg), seçici olmayan opioid reseptör antagonisti nalokson (10 µg) ve GABA_B reseptör antagonisti CGP-35348 (20 µg) ön tedavileri ile bloke oldu. Seçici olmayan muskarinik reseptör antagonisti atropin (10 µg), α-1 adrenerjik reseptör antagonisti prazosin (20 µg) ve α-2 adrenerjik reseptör antagonisti yohimbin (30 µg) ile seçici olmayan serotonin reseptör antagonisti metiserjid (20 µg) ön tedavileri ise CDP-kolin'in analjezik etkisini değıştirmemi.

Bulgularımız, sıçanlardaki akut ağrı modellerinde CDP-kolin'in motor inkoordinasyona neden olmadan analjezik etki yaptığını göstermektedir. Presinaptik kolinerjik mekanizmaların aktivasyonu aracılığı ile santral α7-nikotinik kolinerjik reseptörlerin uyarılması CDP-kolin'in analjezik etkisindeki

muhtemel mekanizma olarak görünmektedir. Aynı zamanda santral GABA_B ve opioid reseptörler, CDP-kolin'in analjezik etkisinde rol oynamaktadırlar.

Anahtar kelimeler: CDP-kolin, akut ağrı, analjezi, nikotinik reseptörler

SUMMARY

The Analgesic Effect of CDP-Choline and the Mechanisms Involved in the Effect

In the present study, the analgesic effect of intracerebroventricularly (i.c.v.) injected CDP-choline on acute pain models of rats was investigated.

Experiments were performed on male Sprague-Dawley rats weighing 300-350 g. All drugs were administered i.c.v. by a guide cannula which was implanted to the right lateral ventricle of the rats. The pain sensitivity of rats was determined using thermal paw withdrawal test and mechanical paw pressure test. Rats were also tested on a rota-rod test to evaluate the effects of i.c.v. injected CDP-choline on motor performance.

CDP-choline (0.5, 1 and 2 μmol ; i.c.v.) produced dose and time-dependent analgesia on both thermal and mechanical acute pain models. Equimolar dose of choline (1 μmol ; i.c.v.) produced an analgesic effect similar to the one observed in CDP-choline (1 μmol ; i.c.v.) given animals. However, cytidine (1 μmol ; i.c.v.) failed to produce an analgesic effect. The analgesic effect of CDP-choline was prevented by i.c.v. administered high affinity choline uptake inhibitor HC-3 (1 μg), nonselective nicotinic receptor antagonist mecamylamine (50 μg), $\alpha 7$ neuronal nicotinic receptor antagonist MLA (25 μg), non-specific opioid receptor antagonist naloxone (10 μg) and GABA_B receptor antagonist CGP-35348 (20 μg) pretreatments in both tests. Nonselective muscarinic receptor antagonist atropine (10 μg), α -1 adrenergic receptor antagonist prazosin (20 μg), α -2 adrenergic receptor antagonist yohimbine (30 μg) and non-specific serotonin receptor antagonist methysergide (20 μg) pretreatments did not change the analgesic effect of CDP-choline.

Our results show that CDP-choline exerts an analgesic effect without producing any motor incoordination on acute pain models in rats. Activation of central $\alpha 7$ -nicotinic cholinergic receptors through the activation of presynaptic cholinergic mechanisms appears to be the possible mechanism in the analgesic effect of CDP-choline. Also central GABA_B and opioid receptors seem to be involved in the analgesic effect of this drug.

Key words: CDP-choline, acute pain, analgesia, nicotinic receptors

GİRİŞ ve AMAÇ

CDP-kolin (Sitidin-5'-difosfat kolin, sitikolin), vücudumuzda doğal olarak meydana gelen nükleotid yapısında bir bileşiktir (1). Membran fosfolipidlerinden fosfatidilkolin sentezinde bir ara ürün olarak ortaya çıkan CDP-kolin'in Alzheimer hastalığı (1-6), serebrovasküler patolojiler (7-16) ve kafa travmaları (17-20) ile öğrenme ve bellek fonksiyonlarının iyileştirilmesinde (21-25) yararlı etkileri gösterilmiştir. Uzun süredir dünya üzerindeki çeşitli ülkelerde birçok ticari isim altında çalışılmakta olan sitikolinin, bazı Avrupa ülkeleri ve Japonya'da stroke ve kafa travmalı hastalarda kullanımı onaylanmıştır.

Dışarıdan oral ya da parenteral yolla uygulanan CDP-kolin, hücre duvarındaki fosfodiesterazlar tarafından hızla sitidin ve koline hidrolize edilmektedir (1). CDP-kolin verilmesini takiben sıçanlarda plazma kolin ve sitidin (26,27), insanlarda ise kolin ve üridin düzeylerinde artış olduğu gösterilmiştir (28). Kolin ve sitidin bütün vücut dokularına dağılabilmekte, kan-beyin bariyerini geçebilmekte ve kendilerine ait metabolik yollara girerek CDP-kolin'in birçok fizyolojik ve farmakolojik etkilerine aracılık etmektedirler (1).

Kolin, nörotransmitter asetilkolin'in ön maddesidir (29) ve dolaşımda kolin düzeylerini artıran tedaviler, buna paralel olarak beyin kolin düzeylerini (30-33) ve takiben asetilkolin sentez ve salıverilmesini artırmakta (31,32,34-39), dolayısı ile kolinerjik nörotransmisyonda artışa yol açmaktadır (40,41). Kolin ve CDP-kolin'in sıçanlara periferik (intravenöz, intraperitoneal) veya merkezi (intraserebroventriküler) yollarla uygulanmasını takiben oluşturdukları nöroendokrin, metabolik ve kardiyovasküler etkileri laboratuvarımızda daha önce yapılan çalışmalarda ayrıntılı olarak incelenmiştir (27,42-59).

Kolinerjik sistemin ağrı modülasyonundaki rolü uzun zamandan beri bilinmektedir. Kolinerjik agonistlerin ve antikolinesteraz etkili ilaçların merkezi, spinal ve periferik yollarla uygulanmasını takiben laboratuvar hayvanlarında belirgin analjezik etki meydana getirdiği yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (60-67). Ayrıca, bir kolinesteraz inhibitörü olan neostigmin, klinikte postoperatif ağrı olgularında diğer analjeziklerle kombine edilerek kullanılmaktadır (67). Bununla birlikte yan etkilerinin fazla olması nedeniyle hiçbir kolinomimetik ajan ideal bir analjezik olarak tanımlanmamaktadır.

Nikotinic asetilkolin reseptörleri, kolinerjik sistemin aracılık ettiği analjezik etkide önemli bir role sahiptir (68,69). Farklı ağrı modelleri kullanılarak yapılan çalışmalarda spinal ve supraspinal nikotinic reseptör aktivasyonunun analjezik etki meydana getirebildiği gösterilmiştir ve bu nedenle son zamanlarda nikotinic reseptörleri hedef alan bileşikler yeni analjezik ajanlar olarak ilgi uyandırmıştır (70-75). Memeli santral sinir sisteminde farklı nikotinic asetilkolin reseptör (nAChR) alt tiplerinin sentez edildiği gösterilmekle birlikte nikotinic ajanların neden olduğu analjezik etkiye nöronal yollardaki dağılımları nedeniyle muhtemelen $\alpha 4\beta 2$ ve $\alpha 7$ nAChR alt tiplerinin aracılık ettiği öne sürülmüştür (76-80). Nörotransmitter asetilkolinin ön maddesi ve dışarıdan verilen CDP-kolin'in önemli hidroliz ürünü olan kolin, $\alpha 7$ nAChR alt tipine seçici agonistik etki göstermektedir (81-83). Son yıllarda yapılan iki çalışmada deney hayvanlarına merkezi (intraserebroventriküler veya intratekal) veya periferik (intravenöz) yollarla kolin verilmesini takiben belirgin analjezik etki ortaya çıktığı gösterilmiştir (68,69).

Ağrı, insanların yaşam kalitesini etkileyen ve yoğun bir şekilde tedavi arayışına götüren en önemli sağlık sorunlarından birisidir ve günümüzde ideal özelliklere sahip ağrı kesici ilaç arayışı artarak devam etmektedir. Biz, yukarıda verilen bulguların ışığında, bir kolin vericisi olan CDP-kolin'in analjezik etkisi olabileceğini düşündük. CDP-kolin'in toksisite ve yan etki profilinin oldukça düşük olması, diğer kolinomimetik ajanlarda ortaya çıkan

yan etkilerin olmayışı ve günümüzde bazı hastalıklarda kullanımının onaylanmış olması da bu moleküle karşı olan ilgimizi artırmıştır.

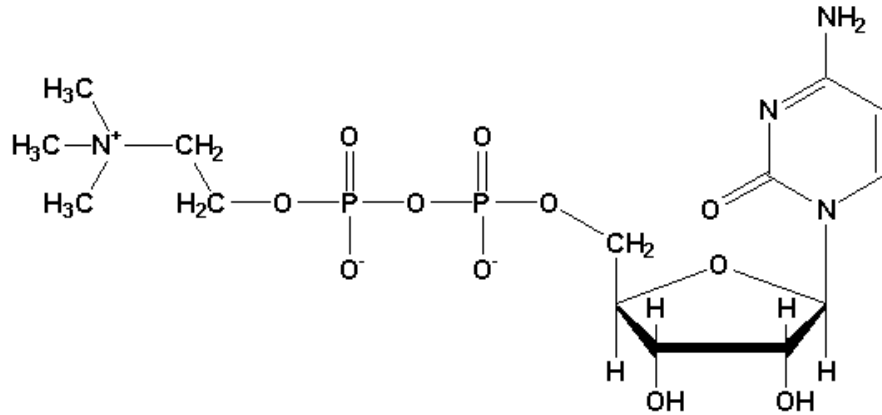
Bu amaçla çalışmamızda, intraserebroventriküler yolla verilen CDP-kolin'in, sıçanlarda akut ağrı modellerindeki (termal ve mekanik pençe çekme testi) analjezik etkisi ve bu etkide rol oynayan mekanizmalar araştırılmıştır.

GENEL BİLGİLER

1. CDP-kolin'in Genel Özellikleri

1.1. CDP-kolin'in Yapısı ve Sentezi

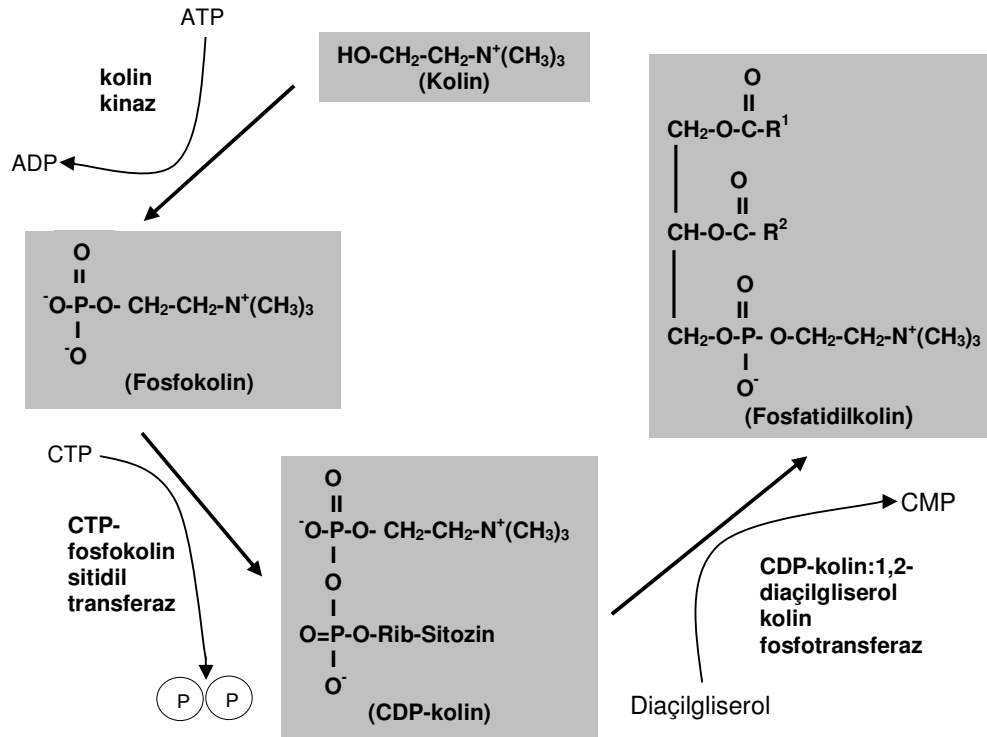
CDP-kolin (Sitidin-5'-difosfat kolin, sitikolin), vücudumuzda doğal olarak meydana gelen endojen bir bileşiktir. Yapısal olarak bir nükleotid olan ve hücre metabolizmasında önemli rol oynayan bu molekülün molekül ağırlığı 488.33 g'dır (Şekil 1). CDP-kolin'in monosodyum tuzu, beyaz, kristalize ve suda oldukça yüksek çözünürlüğe sahip bir moleküldür (1). Sitikolin, CDP-kolin'in uluslararası alanda önerilen tescil edilmemiş ismidir ve çeşitli ülkelerde 50'den fazla ticari isim altında yıllardır çalışılmaktadır.



Şekil-1: CDP-kolin'in molekül yapısı

CDP-kolin, membran fosfolipidlerinden fosfatidilkolinin büyük bölümünün sentezinden sorumlu olan "Kennedy yolağı" nda bir ara ürün olarak sentezlenir (1,84). Bu yolak 1956 yılında Kennedy ve Weiss tarafından tanımlanmıştır (85). Kolinden fosfatidilkolin yapımına uzanan bu sentez yolu üç temel basamaktan meydana gelir (Şekil 2). Yolağın ilk basamağında; kolin, kolin kinaz enziminin katalizlediği geri dönüşlü bir reaksiyonla fosforile edilerek fosfokoline dönüşür. İkinci basamakta; fosfokolin ile sitidin-5'-trifosfat (CTP), CTP:fosfokolin sitidil transferaz (CCT) enzimi aracılığı ile reaksiyona

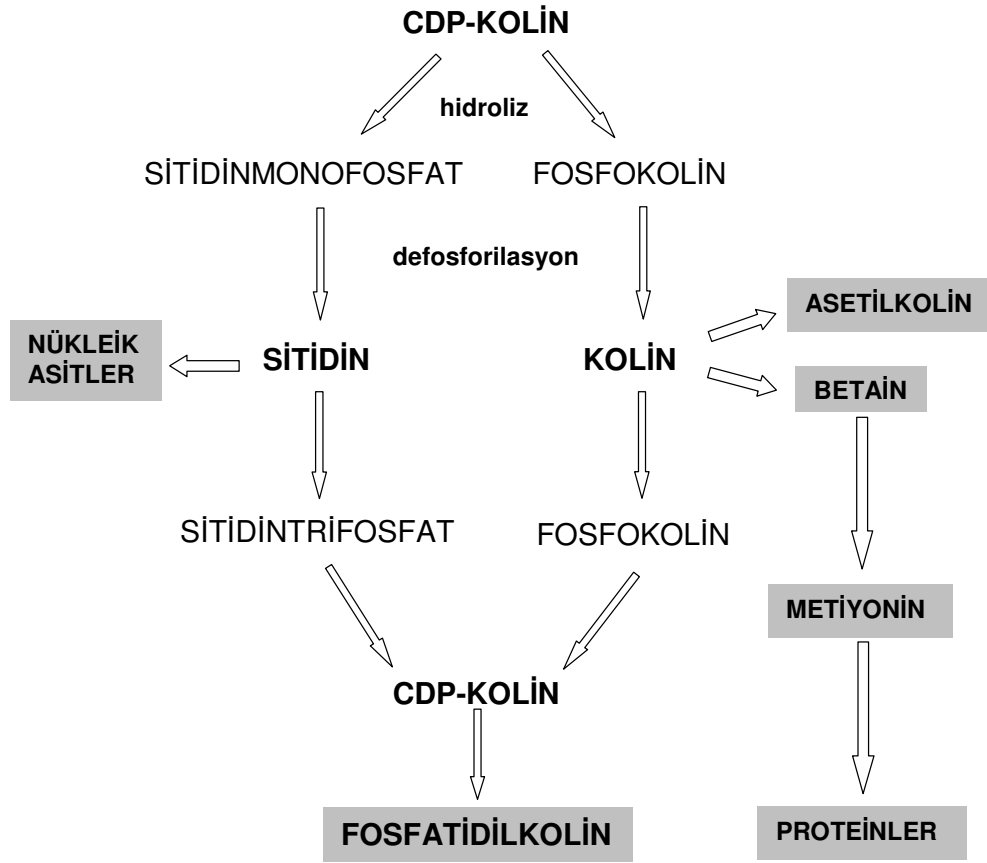
girerek CDP-kolin'i oluşturur. Bu basamak aynı zamanda Kennedy yolağının hız kısıtlayıcı basamağıdır. Üçüncü ve son basamakta ise CDP-kolin'in fosfokolin grubu, sitidindifosfokolin: 1,2-diaçilgliserol kolin fosfotransferaz enziminin katalizlediği bir reaksiyonla, diaçilgliserole aktararak fosfatidilkolin sentezi gerçekleşir (86-91). Çeşitli tedavilerle, örneğin kolin, sitidin, ortik asit gibi ön maddelerin verilmesi ile CDP-kolin miktarının artırılabilirdiği durumlarda veya doğrudan CDP-kolin'in verilmesi ile fosfatidilkolin sentezinde artış olabilmektedir (26,92,93). Bu da CDP-kolin verilerek hücre membranlarının onarılmasının veya yenilenmesinin mümkün olabileceği anlamına gelmektedir.



Şekil-2: Kennedy yolağı aracılığı ile CDP-kolin sentezi; CMP: Sitidinmonofosfat, ATP: Adenozin trifosfat, ADP: Adenozin difosfat, Rib: Riboz, P: Fosfat grubu

1.2. CDP-kolin'in Metabolizması

İn vivo koşullarda, CDP-kolin hücre membranında yerleşik fosfodiesterazlar tarafından hızla sitidinmonofosfat ve fosfokoline hidroliz edilir. Ardından bu iki molekülün defosforilasyonu sonucu sitidin ve kolin açığa çıkar. Bu iki molekül hücre içine alınarak, hücre içinde CDP-kolin'in yeniden sentezlenmesini sağlarken aynı zamanda kendilerine ait etkilere de aracılık ederler (Şekil 3). Bir pirimidin nükleozidi olan sitidin, hücre içinde nükleik asitler ve proteinlerin yapısına katılır. Ayrıca hücre içinde sitidin, sitidintrifosfata dönüşür ve membran fosfatidilkolin yapısına kolin katılımını artırır (94). Kolin, hücre membranlarında fosfatidilkolin, sfingomyelin ve plazmalojenlerin polar subünitini oluşturur. Ayrıca betain üzerinden metiyonin sentezine katkıda bulunurken asetilasyon yolağına da girerek, nörotransmitter asetilkolin sentezinde de kullanılır.



Şekil-3: CDP-kolin'in metabolizması

1.3. Dışarıdan Verilen CDP-kolin'in Periferik Dokularda ve Beyin Dokusundaki Dağılımı

Molekül yapısı nedeniyle oral yolla verilen CDP-kolin'in değişikliğe uğramadan absorbe edilmesi güçtür. Bu nedenle oral yolla verilmesini takiben emilim öncesi ya da emilim sırasında parçalanarak hızla aktif metabolitleri olan kolin ve sitidine dönüşür. Radyoizotop işaretli CDP-kolin'in oral yolla verilmesini takiben 30 dakika sonra midede ölçülen radyoaktivitenin büyük çoğunluğunun CDP-kolin'e ait olduğu gösterilirken, bağırsaktaki radyoaktivitenin ise daha çok kolin ve sitidin fraksiyonuna ait olduğu bulunmuştur. Bu bulgu sitikolinin, hızlı bir şekilde intestinal mukozada kolin ve sitidin fraksiyonlarına ayrıldığını göstermektedir (95). Yapılan bir başka çalışmada sıçanlara oral yoldan uygulanan ¹⁴C ile işaretli CDP-kolin'in biyoyararlanımının neredeyse tama yakın (%95) olduğu gösterilmiştir (89). Oral ya da intravenöz yolla verilen CDP-kolin'in hızla metabolize edildiği ve dağılım ve metabolizma açısından her iki yolla veriliş arasındaki farkın daha çok kantitatif yönde olduğu belirtilmiştir. Oral verilen CDP-kolin sonrası, metabolitlerinin plazmadaki konsantrasyonları daha yavaş yükselmekte, idrarla atılımı ise daha yüksek miktarlarda olmaktadır (96). Sağlıklı insanlarda yapılan bir çalışmada da oral yoldan tek doz 300 mg ¹⁴C işaretli sitikolin verilmesini takiben verilen dozun %1'inden daha azı toplanan gaytada saptanabilmiştir. Bu bulgu, CDP-kolin'in gastrointestinal kanalda emiliminin tama yakın olduğunu göstermektedir (97). Ayrıca yapılan çalışmalarda, oral yolla CDP-kolin uygulanmasını takiben, sıçanlarda plazma kolin ve sitidin düzeylerinin anlamlı düzeyde arttığı gösterilirken (26,96), insanlarda ise plazma kolin ve üridin düzeylerinin arttığı tespit edilmiştir (28).

CDP-kolin, büyük ve polar bir bileşik olduğu için beyine geçişi oldukça zordur ve normal şartlarda verilen total dozun yaklaşık olarak %0.25'inin beyin dokusuna geçebildiği gösterilmiştir (98,99). Molekülün bir bütün olarak beyine geçişini artırmak amacıyla lipozomlara entegre edilmiş formları in vivo serebral iskemi modeli uygulanan sıçanlarda kullanılmış ve terapötik etkinliğinin arttığı gösterilmiştir (99,100).

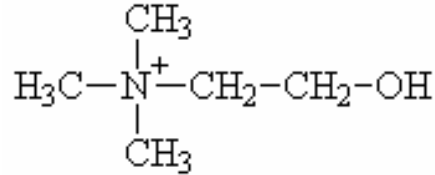
Dışarıdan verilen CDP-kolin, kolin ve sitidin olarak beyin dokusu tarafından alınmakta ve beyinde endojen CDP-kolin sentezi ve takiben fosfolipidler, nükleik asitler ve proteinlerin sentezinde çok etkin bir biçimde kullanılmaktadır (98). Farelere ¹⁴C işaretli CDP- kolin uygulaması sonrası, beyinlerinin otoradyografik ve elektron mikroskobik yöntemlerle incelenmesi, radyoaktivitenin belirgin bir seçicilik göstermeksizin hücre membranlarında (101), kolinerjik nöronlarda ve Purkinje hücrelerinin subsellüler membranlarında yoğun bir şekilde toplandığını göstermiştir (102).

İntraserebroventriküler yolla uygulanan CDP-kolin'in hipotalamusta ve lateral serebral ventrikülde kolin düzeyini arttırdığı laboratuvarımızda yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (51). Çalışmalardan elde edilen bulgular, CDP-kolin'in diğer hücre tiplerinde olduğu gibi, sinir hücrelerinde de sitidin ve kolin olarak ayrı ayrı alındığını, hücre içinde benzer havuzlarda karıştığını, CDP-kolin ve diğer moleküllerin sentezinde kullanıldığını düşündürmektedir.

1.4. CDP-kolin'in Metabolitleri

1.4.1. Kolin

Kolinerjik nörotransmitter asetilkolinin ön maddesi olan kolin, molekül ağırlığı 105 g olan hidrofilik bir moleküldür (Şekil 4). Kolin, bütün hücre membranlarında mevcuttur ve buralarda fosfatidilkolin ve sfingomyelinin polar subünitini oluşturur. Kolin, diyetle bulunması gereken temel gıdalardan olup beyin gelişimi ve fonksiyonu açısından kritik role sahiptir (103-105). Vücudun ihtiyacı olan kolin, diyetle alınabildiği gibi, hücre membranında bulunan fosfatidilkolinden de birkaç yol ile sentezlenebilir.



Şekil-4: Kolin'in moleküler yapısı

Fosfatidilkolinin vücuttaki kolin molekülünün ana deposu ve kaynağı olduğu söylenebilir. Fosfatidilkolinden olan sentez, başlıca karaciğer ve böbrekte olurken, çok sınırlı bir şekilde beyin nöronlarında da olabilir (106,107).

Sentezlenen veya dışarıdan diyetle alınan kolin dolaşıma geçerek bütün vücuda dağılır. Kolinin kan-beyin bariyerinden geçişi son derece hızlı olmaktadır. Bu geçiş, kapiller endotelde yerleşik olan bir taşıyıcı sistem ile gerçekleşmektedir. Bu taşıyıcı sistem iki yönlü çalışmaktadır ve normal koşullarda kolin ile doyurulmamış durumdadır. Metabolik enerjiye ihtiyaç duymadan çalışan bu sistem bir konsantrasyon gradiyenti oluşturmaz. Bu nedenle, dolaşımdaki kolin konsantrasyonu dışarıdan kolin verilerek artırılmadıkça net kolin akışının yönü beyinden kana doğrudur (106). Ancak dolaşımdaki kolin konsantrasyonu artırılırsa beyindeki kolin konsantrasyonunda da artış meydana gelmektedir (30-33).

Dolaşımdan, beyinde ekstrasellüler aralığa geçen kolinin nöron içine alınması başlıca iki sistem aracılığı ile olmaktadır:

a) Yüksek afiniteli transport sistemi: Sodyum iyonuna bağımlı olarak çalışan ve hemikolinium-3 (HC-3) tarafından bloke edilen bir transport sistemidir. Fizyolojik plazma ve beyin kolin konsantrasyonlarında bu sistem doyurulmuş durumdadır (K_m : 0.1-10 μ M). Kolinerjik nöronlarda asetilkolin sentezinde kullanılan kolin, presinaptik terminallerde yerleşik yüksek afiniteli kolin transport sistemi ile geri alınmaktadır ve bunun da asetilkolin sentezinde hız sınırlayıcı basamak olduğu düşünülmektedir (106,108).

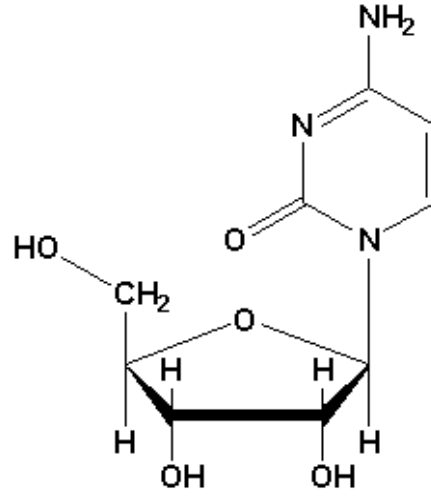
b) Düşük afiniteli transport sistemi: K_m değeri daha yüksek olan (30-100 μ M), sodyum bağımlı olmayan ve normal şartlarda doyurulmamış olan bu transport sistemi kolinerjik nöron gövdelerinde yerleşiktir. Esas olarak fosfatidilkolin ve diğer fosfolipidler için gerekli olan kolin desteğini sağlar. Yüksek afiniteli transport sisteminden farklı olarak insan dokularında yaygın

olarak bulunur. Enterositler, hepatositler, plasental doku, mitokondri ve sinaptozomlarda karakterize edilmiştir (109,110).

Kolin, nörotransmitter asetilkolinin hem ön maddesidir hem de yıkım ürünüdür. Asetilkolin, kolinasetiltransferaz enziminin katalizlediği bir reaksiyon aracılığı ile kolin ve asetil CoA'nın birleşmesi sonucu meydana gelir. Kolinden asetilkolin sentezleyen kolinasetiltransferaz enzimi, fizyolojik koşullarda doyurulmamış durumdadır. Bu koşullarda enzim, kapasitesinin oldukça altında çalışmaktadır (106). Bu nedenle beyin kolin konsantrasyonlarını arttıran tedaviler, nöronların asetilkolin sentez hızını da arttırabilirler. Yapılan çalışmalarla, dolaşımdaki kolin düzeyi artırıldığında, beyindeki kolin (30-33) ve asetilkolin düzeylerinde (31,32,34) artış olduğu gösterilmiştir. Ayrıca beyin dilimlerinde ve in vivo mikrodializ çalışmalarında, kolin düzeylerinin arttırılması, asetilkolin salıverilmesinde de artış yaratmıştır (35-39). Sonuç olarak da kolinerjik iletide artış meydana gelmektedir (40,41). Kolinerjik iletideki artış da buna uyan fonksiyon değişikliklerini beraberinde getirir (42,44-46).

1.4.2. Sitidin

Sitidin, nükleozid yapısında olan bir moleküldür (Şekil 5). Nükleozidlere fosfat grubunun eklenmesi ile nükleotidler oluşur. Nükleotidler enerji metabolizmasının önemli elemanlarıdır, koenzimlerin yapısal kısımlarını oluştururlar, metabolik düzenleyici ve sinyal molekülleri olarak görev yaparlar. Nükleotidlerin kovalent bağlarla birleşerek oluşturdukları zincir de nükleik asit adını alır. Nükleozidler 5 karbonlu bir şeker ile pürin (adenin, guanin) ya da pirimidin (sitozin, timin, urasil) bazlarından birini içerirler. Eğer 5 karbonlu şeker deoksiriboz ise nükleik asit DNA, riboz ise RNA'dır.



Şekil-5: Sitidin'in molekül yapısı

Nükleotidlerin sentezi için iki yolak tarif edilmiştir:

1) De Novo yolak: Organizmaların çoğu nükleotidleri, düşük molekül ağırlıklı prekürsörlerinden, bu yolak üzerinden sentezler. Bu yolak üzerinden pürinlerin sentezi glisin, glutamin, aspartat, tetrahidrofolat ve karbondioksit gibi prekürsörlerin pürin halkasına katılımını içerir. Pürin sentezi; fosforibozil pirofosfattan (PRPP), tam olarak oluşan ilk pürin nükleotidi olan inozin monofosfatın (IMP) sentezlenmesi ve takiben IMP'nin iki ayrı yola girerek adenozin monofosfat (AMP) ve guanozin monofosfatı (GMP) oluşturması ile meydana gelir. Bu sentez yolağı esnasında glutamin, glisin, N¹⁰-formil tetrahidrofolat, aspartat ve CO₂ çeşitli basamaklarda senteze katılırlar. De Novo yolak üzerinden pirimidinlerin sentezinde ise; karbamoil fosfat ve aspartatın birleşmesi ile karbamoil aspartat oluşur. Bu basamak pirimidin sentezine özgüdür. Bunu orotik asit oluşumu ve sonuçta üridinmonofosfat (UMP) sentezi izler. Pirimidin yolağında, pürin yolağından farklı olarak dallanma görülmez.

2) Kurtarma (Salvage) yolakları: Nükleotidlerin, nükleik asitlerin parçalanmaları sonucu ortaya çıkan serbest pürin ve pirimidin bazlarının tekrar kullanılmasıyla sentezlendiği yolaklardır. Nükleik asitlerin yıkımı, hücre

içi olabilir, hücre ölümünün sonucu olabilir ya da hayvanlarda, diyetle alınan nükleik asitlerin sindirilmesi sonucu olabilir. Bazlar ya da nükleotidler kurtarma yolları üzerinden nükleik asit sentezi için tekrar kullanılamazsa pürin ve pirimidin bazları sırasıyla ürik asit ve β -üredopropionata yıkılır.

Sitidin, CDP-kolin'in hem yıkım ürünlerinden biri hem de sentezine katılan bir ön maddedir. Ayrıca sitidinin membran fosfatidilkolinine kolin eklenmesini artırarak membran fosfolipid sentezini artırdığı hücre kültürlerinde ve sıçan beyin dilimlerinde gösterilmiştir (92,94). Son zamanlarda yapılan çalışmalarda üridinin de, sitidin trifosfata dönüşerek CDP-kolin sentezine katılabildiği ve dolaylı yoldan membran fosfolipid sentezine katkıda bulunabildiği gösterilmiştir (28,111).

Yapılan in vivo çalışmalarda dışarıdan verilen sitidinin, deney hayvanlarında bazı etkiler oluşturabildiği gösterilmiştir. Laboratuvarımızda yapılan ve merkezi yolla uygulanan CDP-kolin'in sıçanlarda kan basıncı üzerine olan etkilerinin araştırıldığı çalışmada intraserebroventriküler yolla uygulanan sitidin, hemorajik şok oluşturulmuş sıçanlarda kan basıncında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde artış meydana getirmiştir (51). CDP-kolin'in antidepresan etkisinin araştırıldığı bir başka çalışmada ise intraperitoneal yolla enjekte edilen CDP-kolin sıçanlarda zorlu yüzmeye testinde anlamlı bir etkiye neden olmazken; metabolitleri olan sitidin ve kolinin intraperitoneal yolla uygulanması zıt etkilere neden olmuştur. Söz konusu çalışmada sitidin sıçanlarda antidepresan etki gösterirken, kolin ise sitidinin aksine prodepresan etki göstermiştir (112).

1.5. CDP-kolin'in Etkileri

1.5.1. CDP-kolin'in Asetilkolin Sentezi ve Kolinerjik Sistem Üzerine Olan Etkileri

Daha önce de belirtildiği gibi, dışarıdan verilen CDP-kolin hızla sitidin ve koline metabolize olarak plazma kolin düzeylerinde artışa yol açmaktadır (26,113). Kolini beyine taşıyan transport sistemleri normal şartlarda

doğurulmamış olduğu için, dolaşımdaki kolin düzeylerindeki artış beyin kolin düzeylerinde de artışa neden olmaktadır (30-33). Bizim laboratuvarımızda yapılan çalışmalarda da intravenöz olarak verilen CDP-kolin, plazma ve beyin kolin düzeylerini arttırmıştır (27). Ayrıca intraserebroventriküler yolla uygulanan CDP-kolin de beyin kolin düzeylerinde artış yaratmıştır (51). Bir diğer çalışmada da intraperitoneal yolla CDP-kolin uygulamasının, beyinde dorsal hipokampus ve neokortekste ekstrasellüler asetilkolin düzeylerinde artışa neden olduğu gösterilmiştir (17). Sonuç olarak bir kolin vericisi olan CDP-kolin, dışarıdan verildiğinde plazma ve beyindeki kolin düzeylerinde artışa yol açmakta ve bununla birlikte asetilkolin sentezini de arttırmaktadır. Bu artışları takiben kolinerjik iletide artma ve buna uyan fonksiyon değişiklikleri ortaya çıkmaktadır (27,51,57,58).

1.5.2. CDP-kolin'in Membran Fosfolipidleri Üzerine Olan Etkileri

Dışarıdan verilen CDP-kolin plazma sitidin ve kolin düzeylerinde artışa neden olmaktadır. Kolin, membran fosfolipidlerinden fosfatidilkolinin yapısına katılır. Plazmada düzeyi yükselen sitidin de hücre içinde sitidintrifosfata dönüşür ve membran fosfatidilkolin yapısına kolin katılımını artırır (94). Yapılan çalışmalar, dışarıdan CDP-kolin verildiğinde beyinde fosfatidilkolin ile birlikte fosfatidilserin ve fosfatidiletanolamin seviyelerinde de artış olduğunu göstermiştir (26). Ayrıca oral yolla verilen CDP-kolin'in fosfolipaz A₂ enziminin aktivasyonunu inhibe ederek fosfatidilkolin yıkımını azalttığı, böylece membran yapısını koruduğu da gösterilmiştir (114).

1.5.3. CDP-kolin'in Kardiyovasküler Sistem Üzerine Olan Etkileri

Kolinerjik sistem, kardiyovasküler düzenlemede önemli rol oynamaktadır. Beyindeki kolinerjik aktivitenin artışı kan basıncı artışı üzerine etkilidir (42,43,115). CDP-kolin'in kardiyovasküler sistem üzerine olan etkileri laboratuvarımızda incelenmiş ve merkezi veya periferik yolla CDP-kolin uygulanmasının normal ve hipotansif koşullarda kan basıncını arttırdığı gösterilmiştir (27,51). Ayrıca CDP-kolin'in, hemorajik şok oluşturulmuş anestezi altındaki hayvanlarda, süperior mezenterik arter ve renal arter kan

akımını artırdığı ve bu hayvanlarda yaşam oranlarını yükselttiği gösterilmiştir (59). Laboratuvarımızda CDP-kolin'in miyokardiyal iskemi-reperfüzyon hasarı üzerine olan etkileri de araştırılmış, yapılan çalışmalarda intravenöz yolla uygulanan CDP-kolin miyokardiyal iskemi-reperfüzyon hasarında kardiyoprotektif etki ortaya çıkarmıştır (116).

1.5.4. CDP-kolin'in Endokrin Sistem Üzerine Olan Etkileri:

Hipotalamohipofizer sistem yoğun kolinerjik innervasyona sahiptir. Hem insanlarda hem de hayvanlarda yapılan çalışmalarda CDP-kolin'in endokrin sistem üzerine etkileri olduğu gösterilmiştir. İnsanlarda intravenöz yolla CDP-kolin uygulaması serum büyüme hormonu (GH) seviyelerini yükseltmiş, prolaktin (PRL) seviyelerini ise azaltmıştır (117,118). Laboratuvarımızda yapılan çalışmalarda sıçanlara intraserebroventriküler yolla verilen CDP-kolin, normal koşullarda plazma ACTH düzeylerini artırmış, uyarılmış koşullarda ise tiroid uyarıcı hormon (TSH), luteinizan hormon (LH) ve büyüme hormonu (GH) düzeylerinde ek artışlar meydana getirmiştir (58). Buna ek olarak intraserebroventriküler ve intravenöz yolla uygulanan CDP-kolin, plazma katekolamin ve vazopresin düzeylerinde de artışa yol açmıştır (27,51,57). Ayrıca sıçanlara intraperitoneal yolla CDP-kolin uygulaması serum insülin, plazma glukagon ve katekolamin düzeylerinde anlamlı artışlara neden olmuştur (119).

1.6. CDP-kolin'in Kullanım Alanları

CDP-kolin yan etkisi az, güvenlik aralığı geniş olan güvenli bir ilaçtır. Hayvanlarda ve insanlarda yapılan çalışmalarda toksisite ve yan etki profili oldukça düşük bulunmuştur (120-123). Aşağıda CDP-kolin'in günümüzde ilaç olarak kullanıldığı veya kullanılma potansiyelinin bulunduğu alanlar verilmiştir.

a) *Serebral İskemi ve Hipoksi* : İskemik veya hipoksik koşullarda, membran fosfolipidlerinden fosfatidilkolin yıkımı ortaya çıkar. Hücre membranında fosfatidilkolin içeriği azalırken serbest yağ asidi salınımı artar

(124,125). Çeşitli serebral iskemi modellerinde, dışarıdan CDP-kolin verildiğinde, fosfatidilkolin sentezini arttırdığı, başta araşidonik asit olmak üzere serbest yağ asitlerinin salınımının önlendiği gösterilmiştir (126,127). Ayrıca CDP-kolin'in iskemik koşullarda ortaya çıkan kardiyolipin ve sfingomyelin kayıplarını koruduğu, glutasyon sentezi ile glutasyon redüktaz aktivitesini stimüle ettiği, lipid peroksidasyonunu azalttığı, Na⁺/ K⁺ ATPaz aktivitesini yenilediği de gösterilmiştir (128). Bu nöroprotektif etkilerin oluşmasında fosfolipaz A₂ aktivasyonunun engellenmesi önemli bir rol oynamaktadır (114,128). CDP-kolin, beyin fosfatidilkolin düzeylerini serebral iskemi sonrası artmış fosfolipaz A₂ aktivitesini azaltarak korumayı başarmıştır (129,130). Bununla birlikte CDP-kolin uygulaması fosfatidilkolin sentezinde hız kısıtlayıcı basamakta rol alan CTP:fosfokolin sitidil transferaz (CCT) enziminin aktivitesindeki kaybı azaltarak iskeminin neden olduğu fosfatidilkolin düzeylerindeki azalmayı önlemiştir (131). Dolayısıyla dışarıdan verilen CDP-kolin'in gerek deneysel serebral iskemi ve hipoksi modellerinde gerekse klinikte iskemik ve hipoksik beyin hasarına neden olan akut ve kronik serebrovasküler hastalıklarda ödem ve infarkt miktarını azalttığı, nörolojik defisitleri geri döndürdüğü gösterilmiştir. (7-16).

b) *Kafa Travmaları* : CDP-kolin uygulamasının bazı deneysel modellerde kafa travmalarına bağlı oluşan beyin ödemi azalttığı ve semptomlarda düzelme yarattığı bildirilmiştir (17,18). Klinik çalışmalarda da kafa travmalı hastalarda CDP-kolin verilen grubun motor, bilişsel ve psikolojik fonksiyonlarının çok daha hızlı düzeldiği ve hastanede yatış sürelerinin kısaldığı rapor edilmiştir (19,20).

c) *Öğrenme ve Hafızanın Geliştirilmesinde* : CDP-kolin'in öğrenme ve bellek fonksiyonları üzerinde de olumlu etkileri olduğu hem hayvan modellerinde hem de insanlarda yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (21-25).

d) *Nörodejeneratif Hastalıklar* : Membran fosfolipidlerinden fosfatidilkolin sentezinde bir ara ürün olan CDP-kolin'in nöron koruyucu etkisi

nedeniyle Alzheimer ve multiinfarkt demans gibi nörodejeneratif hastalıklarda kullanımının yararlı olacağına dair bulgular da mevcuttur (2-6,132).

e) *Diğer durumlar* : CDP-kolin uygulamasının Parkinson hastalarında (133-135), ayrıca ambliyopi (136-138) ve glokom (139,140) gibi bazı göz bozukluklarında yararlı olabileceğine dair çalışmalar mevcuttur.

2. Ağrı ve Analjezi

2.1. Ağrının Tanımı ve Santral Sinir Sistemine İletilmesi

Uluslararası Ağrı Araştırmaları Derneği'nin (International Association for the Study of Pain-IASP) standart tanımlamasına göre ağrı; vücudun herhangi bir yerinden kaynaklanan, var olan veya olası doku hasarına eşlik eden ya da bu hasar ile tanımlanabilen, hoş gitmeyen duyuşsal ve emosyonel bir deneyimdir. Ağrının nörofizyolojik, biyokimyasal, psikolojik ve bilişsel boyutları bulunmaktadır. Ağrılı uyaran dört aşamada üst merkezlere iletilir (141,142) (Şekil 6):

1) Transdüksiyon: Sensoryal sinir uçlarında bulunan nosiseptörler tarafından algılanan ağrılı uyaranın elektriksel aktiviteye dönüştürülmesidir. Nosiseptörler, myelinli A-delta ve myelinsiz C liflerinin uçlarında bulunurlar ve kimyasal, mekanik ve termal uyarıyla aktive olurlar.

2) Transmisyon: Ağrı bilgisinin santral sinir sistemine iletilmesidir. Bu aşama üç bileşenden oluşur:

a) Spinal kordun dorsal boynuzuna ulaşan primer afferent sensoryal nöronlar (I. sıra nöronlar): Myelinli A-delta liflerinin uçları genellikle mekanik veya termal uyarılar ile aktive olurken, myelinsiz C liflerinin uçları olan polimodal nosiseptörler ise şiddetli mekanik, kimyasal, aşırı sıcak ve soğuk uyarılarla aktive olur. A-delta lifleri akut, keskin, batıcı karakterde ve iyi lokalize edilen ağrıyı, C lifleri ise kronik, yaygın ve daha az lokalize edilebilen ağrıyı iletirler.

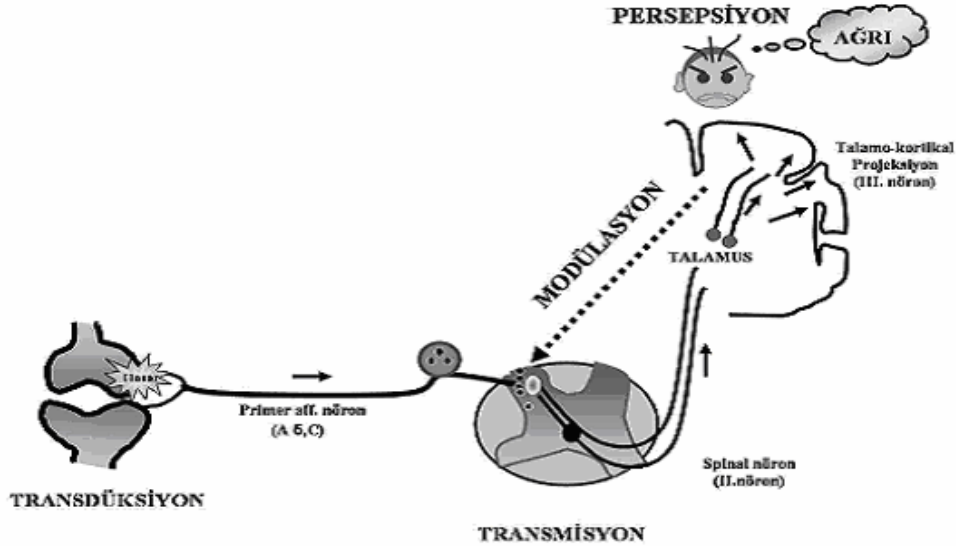
b) Spinal korddan beyin sapı ve talamusa uzanan çıkan (assendan) projeksiyon nöronları (II. sıra nöronlar): Bu grup nöronlar içerisinde

en önemli yolak spinotalamik yolaktır (STT) ve retiküler formasyon, periakvaduktal gri madde (PAG) ve hipotalamus ile yakın ilişki içerisindedir.

c) Talamo-kortikal projeksiyon nöronları (III. sıra nöronlar): Medial talamustan projekte olan lifler, limbik sisteme uğrayarak anterior singulat korteks ve prefrontal kortekste sonlanırlar. Lateral talamustan projekte olan lifler ise somatosensoryal kortekste (primer ve sekonder korteks) sonlanırlar.

3) Modülasyon: Transmisyon iletisinin inen (dessendan) nöral yollar ile azaltılmasıdır.

4) Persepsiyon: Üst beyin merkezlerine iletilen ağrı bilgisinin değerlendirilerek algılanmasıdır.



Şekil 6: Ağrılı uyarının santral sinir sistemine iletilmesi ve analjezi (Aydın I, Ağrının Fizyopatolojisi, Türk Fiz Tıp Rehab Derg, 2005, 51 (Özel ek B):B8-B13)

2.2. Ağrının İletilmesinde ve Analjezide Rol Oynayan Mediyatörler

Organizmada doku hasarını takiben ağrı iletiminde rol oynayan H^+ , K^+ , ATP, bradikinin, prostaglandinler, lökotrienler, proinflamatuvar sitokinler,

serotonin ve histamin gibi mediyatörler periferik dokulardan ortama salınarak hem primer afferent lifleri uyarırlar hem de nosiseptörlerin diğer uyarılara karşı duyarlılığını arttırmaları. Nosiseptörlerin uyarılmasını takiben aynı zamanda aksonal refleks mekanizması ile primer afferent liflerin ucundan ortama substans-P, kalsitonin geni ile ilişkili peptid (calcitonin gene-related peptid; CGRP) ve nörokinin-A salınır. Bu peptidlerin kendileri de direkt olarak nosiseptörleri uyarır (141-143).

Medulla spinalis dorsal boynuzunda, primer afferent nöronlar ile projeksiyon nöronları arasındaki sinapta iletiyi sağlayan nörotransmitterler de ağrı iletiminde önemli rol oynarlar. Bunlar eksitatör aminoasitler olan glutamat ve aspartat, nöropeptid yapısında olan substans-P, nörokinin-A ve CGRP'dir. Bu nörotransmitterler, primer afferent nöronların santral uçlarından ağırlı uyarın varlığında sinaptik aralığa salınırlar (141-143).

Ağırlı uyarın periferden üst merkezlere taşınırken aynı zamanda sinir sistemi içerisinde çeşitli seviyelerde kontrol edilmeye çalışılır. Vücudun bu endojen analjezi sistemi, hem santral (supraspinal-spinal) hem de periferik düzeyde ağırlı uyarını inhibe etmeye çalışmaktadır. Supraspinal inhibisyonda rol oynayan temel nörotransmitterler; opioid peptidler (β -endorfin, enkefalin, dinorfin), serotonin ve noradrenalin'dir. GABAerjik sistem ve kolinerjik sistemin de supraspinal düzeyde ağrı modülasyonunda rolleri olduğu bilinmektedir (141-143).

Ağırlı uyarının inhibisyonu ile ilişkili sistem temel olarak "inen inhibe edici yollar" dan oluşmaktadır. Bu sistemde periaquaduktal gri cevher (PAG) stratejik bir konuma sahiptir. PAG, korteks, amigdala, talamus ve hipotalamustan inen ve özellikle β -endorfin içeren lifler ile sinaps yapar. PAG, opioidlerjik (enkefalin, dinorfin) ve opioidlerjik olmayan (serotonin ve noradrenalin) nöronlar içermektedir. PAG, beyin sapında serotonerjik nöron gövdeleri içeren rafe magnus çekirdeği (NRM)'ne projeksiyonlar gönderir. Buradan kaynaklanan serotonerjik lifler spinal kord boyunca dorsolateral

fasikül içinde inerek spinal kord arka boynuzunda pre- ve post sinaptik inhibisyona neden olurlar. Ponsta lokus seruleus (LC) kökenli nöronlar ise noradrenerjik lifler içerir ve bu nöronlar da spinal kord boyunca inerek arka boynuzda benzer şekilde inhibisyona neden olurlar (141-143).

Spinal düzeydeki inhibisyon ise, spinal kord arka boynuzunda bulunan kısa aksonlu internöronlar aracılığı ile gerçekleşir. Spinal inhibisyonda rol oynayan nörotransmitterlerin başında GABA, glisin ve opioid peptidler (enkefalin ve dinorfin) gelir. Spinal inhibitör internöronlar, spinal kord dorsal boynuzunda primer afferent nöronun santral ucundan eksitatör nörotransmitterlerin sinaptik aralığa salınımını sınırlarlar. Spinal kord arka boynuzunda bulunan bu inhibitör internöronlar, inen noradrenerjik ve serotonerjik sistemler ile de aktive olabilmektedirler (141-143).

3. Ağrı Kontrolünde Kolinerjik Sistemin Rolü

Kolinerjik sistem aktivasyonunun analjezi meydana getirdiği uzun süreden beri bilinmektedir. İlk olarak Pedigo ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada intraserebroventriküler yolla enjekte edilen asetilkolin deney hayvanlarında belirgin analjezi meydana getirmiştir (60). Takip eden çalışmalarda karbakol, oksotremorin, McN-A-343 ve pilokarpin gibi kolinerjik agonistlerle ve fizostigmin, neostigmin gibi antikolinesteraz ajanlar ile kolinerjik sistem aktive edildiğinde, hem deney hayvanlarında hem de insanlarda analjezik etkiler elde edilmiştir (61-67).

Kolinerjik sistem aktivasyonunun neden olduğu analjezik etkiye hem muskarinik hem de nikotinic kolinerjik reseptörler aracılık etmektedir. Spesifik muskarinik reseptör agonistlerinin santral, spinal veya sistemik yolla uygulanmasını takiben deney hayvanlarında analjezi meydana gelmekte ve analjezik etkide rol oynayan muskarinik reseptör alt tiplerinin başlıca M₁, M₂, M₄ ve daha az katkısı olmakla birlikte M₃ olduğu düşünülmektedir (67,144,145).

Nöronal nikotinic asetilkolin reseptörlerinin (nAChR) santral sinir sisteminde yoğun olarak bulunduğu ve bu bölgelerin medulla, ortabeyin, talamus, pedunkulopontin tegmental nukleus, nukleus rafe magnus ve spinal kord gibi analjezide önemli rolleri olan bölgeler olduğu bilinmektedir (70,146-150). Bununla birlikte nikotinin analjezik etkileri uzun zamandan beri bilinmektedir (151,152). Bu bilgilere dayanılarak yapılan çalışmalarda nöronal nAChR aktivasyonunun analjezi meydana getirdiği çeşitli akut ve kronik ağrı modellerinde gösterilmiştir. Güçlü bir nAChR agonisti olan epibatidinin deney hayvanlarında meydana getirdiği analjezik etkinin morfinden yaklaşık olarak 200 kat daha potent olduğu gösterilmiştir (72). Epibatidinin sentetik türevi olan bir diğer nöronal nAChR agonisti ABT-594, hem akut hem de kronik ağrı modellerinde analjezik etki meydana getirmiştir (153). Benzer analjezik etkiler, diğer nöronal nAChR agonistleri ve farklı ağrı modelleri kullanılarak yapılan çalışmalarla da ortaya konmuştur (70,71,73-75).

Santral sinir sisteminde yer alan nöronal nAChR alt tiplerinden özellikle $\alpha 4\beta 2$ ve $\alpha 7$ alt tiplerinin, nöronal yolaklardaki dağılımları nedeniyle nikotinic agonistlerin analjezik etkisine aracılık ettiği bilinmektedir (76-80). Bu konu ile ilgili yapılan çalışmalarda, spesifik $\alpha 4\beta 2$ nikotinic reseptör antagonisti olan dihidrobetaeritroidin (Dh β E) ön tedavisinin farelerde nikotinin neden olduğu analjezik etkiyi ortadan kaldırdığı görülmüştür (70). Nikotinic reseptör aracılı analjezik etkide üzerinde durulan bir diğer nöronal nAChR alt tipi de $\alpha 7$ alt tipidir ve kolin bu reseptör alt tipine seçici agonistik etki göstermektedir (81-83). Kolinin intratekal, intraserebroventriküler ve intravenöz yolla uygulanması deney hayvanlarında analjezik etki meydana getirmiştir. Kolin ile oluşturulan bu analjezik etki spesifik $\alpha 7$ nAChR antagonistleri olan metillikakonitin (MLA) ve α -bungarotoksin ile ortadan kaldırılırken, spesifik $\alpha 4\beta 2$ nAChR antagonisti olan Dh β E ile değişmemiştir (68,69).

Spesifik $\alpha 7$ nAChR agonisti olan kolin, aynı zamanda nörotransmitter asetilkolinin ön maddesi ve dışarıdan verilen CDP-kolin'in ana hidroliz ürünüdür. Bu bulgulardan yola çıkarak merkezi yolla uygulanan CDP-kolin'in

analjezik etkilerini ve etkiye aracılık eden mekanizmaları deneysel akut ağrı modellerini kullanarak araştırdık.

GEREÇ VE YÖNTEM

Genel

Çalışmada 300-350 g ağırlığında erkek, Sprague-Dawley türü sıçanlar (Deney Hayvanları Yetiştirme ve Araştırma Merkezi, Uludağ Üniversitesi, Bursa) kullanıldı. Sıçanlar, çalışmadan en az bir hafta önce deney hayvanları merkezinden alınarak, sıcaklığı 22-24⁰C olan ve 12 saat aydınlık/karanlık ışıklandırma döngüsü bulunan bir odada beş tanesi bir kafeste olacak şekilde yem ve su alımları serbest bırakılarak bakıldılar.

Çalışmadaki tüm cerrahi ve deneysel işlemler, Uludağ Üniversitesi Hayvan Bakımı ve Kullanımı Etik Komitesi tarafından onaylanmıştır.

Cerrahi ve Deneysel İşlemler

İntraserebroventriküler (i.s.v.) ilaç enjeksiyonu için, sıçanların sağ serebral yan ventriküllerine eter anestezisi altında kılavuz kanül yerleştirildi. Bu amaçla sıçanların kafasına orta hat insizyonu yapılarak bregma görünür hale getirildi. Bregma referans noktası kabul edilerek sıçan beyin atlası (The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates, George Paxinos and Charles Watson, 1986) yardımıyla orta hattın 1.5 mm kadar lateralinde ve bregmanın 1 mm kadar arkasında olacak şekilde bir delik açıldı. Bu delikten sağ yan ventriküle 21-gauge'luk hipodermik paslanmaz çelik iğneden hazırlanmış kılavuz kanül, alt ucu kafatası yüzeyinden 4.2 mm kadar derinliğe inecek şekilde ve dik olarak yerleştirildi. Üstte kalan kısım dişi akriliği ile kafatasına sabitlendi. Cerrahi işlemin bitiminde sıçanlar tek tek kutulara yerleştirilerek anesteziden çıkmaları için 4-5 saat kadar bekletildi. Deney sonrasında ventriküler kanüllerin yerlerinin doğrulanması için rastgele seçilmiş sıçanlara 1:10 oranında sulandırılmış çini mürekkebi i.s.v. yolla uygulandı ve takiben sıçanlar kurban edilerek beyin kesitleri makroskopik olarak incelendi.

Birinci seri çalışmada, CDP-kolin'in analjezik etkisi araştırıldı. Bunun için değişen dozlarda CDP-kolin (0.5, 1 ve 2 µmol/10 µl) veya tuzlu su (10 µl) i.s.v. yolla enjekte edildi. Takiben termal ve mekanik ağrılı uyaranın

uygulandığı iki farklı akut ağrı modeli kullanılarak değişen zaman aralıklarında CDP-kolin'in analjezik etkisi değerlendirildi.

İkinci seri çalışmada, CDP-kolin'in hidroliz ürünleri olan kolin ve sitidinin analjezik etkileri araştırıldı. Bu amaçla CDP-kolin (1 $\mu\text{mol}/10 \mu\text{l}$) ve eşmolar dozlarda kolin (1 $\mu\text{mol}/10 \mu\text{l}$), sitidin (1 $\mu\text{mol}/10 \mu\text{l}$) veya tuzlu su (10 μl) i.s.v. yolla enjekte edildi ve takiben iki farklı akut ağrı modelinde analjezik etkileri değerlendirildi.

nc seri çalışmada, kolinerjik, opioidderjik, GABAerjik, α -adrenerjik ve serotonerjik reseptör antagonistleri kullanılarak CDP-kolin'in analjezik etkisine aracılık eden mekanizmalar araştırıldı. Bu amaçla sıçanlara, seçici olmayan muskarinik kolinerjik reseptör antagonisti atropin sülfat (10 $\mu\text{g}/10 \mu\text{l}$), seçici olmayan nikotinik kolinerjik reseptör antagonisti mekamilamin (50 $\mu\text{g}/10 \mu\text{l}$), yüksek afiniteli nöronal kolin geri alım inhibitörü HC-3 (hemikolinium-3, 1 $\mu\text{g}/10 \mu\text{l}$), $\alpha 7$ nikotinik asetilkolin reseptör antagonisti MLA (metillikakonitin, 25 $\mu\text{g}/10 \mu\text{l}$), seçici olmayan opioid reseptör antagonisti nalokson (10 $\mu\text{g}/10 \mu\text{l}$), GABA_B reseptör antagonisti CGP-35348 (20 $\mu\text{g}/10 \mu\text{l}$), α -1 adrenerjik reseptör antagonisti prazosin (20 $\mu\text{g}/10 \mu\text{l}$), α -2 adrenerjik reseptör antagonisti yohimbin (30 $\mu\text{g}/10 \mu\text{l}$), seçici olmayan serotonin reseptör antagonisti metiserjid (20 $\mu\text{g}/10 \mu\text{l}$) veya tuzlu su (10 μl) i.s.v. yolla enjekte edildi. Takiben 15 dakika sonra CDP-kolin (1 $\mu\text{mol}/10 \mu\text{l}$) veya tuzlu su (10 μl) i.s.v. yolla uygulanarak iki farklı akut ağrı modelinde analjezik etki değerlendirildi.

Çalışmada kullanılan antagonistlerin dozları daha önce yapılan çalışmalara dayanılarak seçilmiştir. Buna göre; atropin ve mekamilaminin dozları, daha önce laboratuvarımızda yapılan ve CDP-kolin'in muskarinik ve nikotinik etkilerini önlediği gösterilen dozlardır (51,57,58). MLA, HC-3, nalokson, CGP-35348, prazosin, yohimbin ve metiserjid dozları, ağrı ve analjezi ile ilgili çalışmalarda kullanılan ve santral yolla kullanıldıklarında ilgili

agonistlerin analjezik etkilerini geri döndürmeye yeterli olduğu gösterilen dozlardır (68,70,154-161).

Analjezik Etkinin ve Motor Performansın Değerlendirilmesi

Sıçanlarda analjezik etki akut ağrı modelleri olan, termal ve mekanik pençe çekme testi ile değerlendirildi. Termal pençe çekme testi için plantar test cihazı (Commat Ltd., Ankara, Türkiye), mekanik pençe çekme testi için Randall-Selitto test cihazı (Ugo-Basile, Comerio, VA, İtalya) kullanıldı. Sıçanların motor performansı ise rota-rod cihazı (Commat Ltd., Ankara, Türkiye) kullanılarak rota-rod performans testi ile değerlendirildi.

Termal Pençe Çekme Testi : Bu testte daha önce tarif edilen metoda (162) benzer şekilde, sıçanların arka pençesine radyan ısı kaynağı ile termal ağırlı uyaran verilmesini takiben sıçanların pençesini çekme süreleri saniye cinsinden kaydedildi (Şekil 1). Bu amaçla sıçanlar, yüzey ısı bir fan yardımıyla sabit tutulan ($30\pm 1^{\circ}\text{C}$) cam yüzey üzerinde bulunan $30\times 15\times 15$ cm boyutlarındaki pleksiglas kafesler içine yerleştirildi. Sıçanların ortama adaptasyonunun sağlanması amacıyla ağırlı uyaran uygulanmadan önce 30-45 dakika beklendi. Adaptasyon periyodunun ardından cam yüzey altından kontrol edilebilen radyan ısı kaynağı ile sıçanların arka pençesinin plantar yüzeyine termal ağırlı uyaran uygulandı. Radyan ısı kaynağının üzerinde bulunan bir fotosel sistemi yardımıyla ağırlı uyaran sıçan pençesini çektiğinde otomatik olarak kesildi ve pençe çekme süresi 0.1 s aralıkla cihaz üzerinden okunarak kaydedildi. Ölçümler her iki arka pençeden de alınarak sağ ve sol pençenin ortalama değeri olarak verildi. Doku hasarının engellenmesi amacıyla cut-off değeri 30 saniye olarak belirlendi. 5 dakika ara ile ardışık olarak alınan ilk üç ölçümün ortalaması kontrol değerleri olarak kaydedildi. Daha sonra ilaç enjeksiyonlarını takiben ölçümler 5, 10, 15, 20, 30 ve 40. dakikalarda alındı.



Şekil-1: Termal Pençe Çekme Test Cihazı

Mekanik Pençe Çekme Testi : Randall ve Selitto tarafından tarif edildiği şekilde (163) sıçanların mekanik ağrı eşikleri, arka pençelerine sabit hızda artan mekanik bası uygulamasına verdikleri pençe çekme yanıtının gram cinsinden kaydedilmesi ile ölçüldü (Şekil 2). Bu amaçla öncelikle sıçanların ölçüm cihazına ve el ile tutulmaya adaptasyonları sağlandı. Daha sonra sağ arka pençeleri cihazın konik uçlu sıkıştırıcısına sıkıştırılarak pedala basılmak suretiyle pençeye sabit hızda (48 g/s) artan bir mekanik bası uygulandı. Sıçanın ağrı duyup pençesini çektiği ağırlık cihaz üzerinde bulunan skala üzerinden okunarak gram cinsinden kaydedildi. Doku hasarının engellenmesi amacıyla cut-off değeri 600 g olarak belirlendi. 5 dakika ara ile ardışık olarak alınan ilk üç ölçümün ortalaması kontrol değerleri olarak kaydedildi. Daha sonra ilaç enjeksiyonlarını takiben 5, 10, 15, 20, 30 ve 40. dakikalarda ölçümler yapıldı.



Şekil 2: Mekanik Pençe Çekme Test Cihazı (Analjezimetre)

Rota-rod Performans Testi: Sıçanların motor performansı, 7 cm çapında, yerden yüksekliği 40 cm olan, kaygan olmayan bir yüzeye sahip dönen bir silindirden oluşan rota-rod test cihazı ile değerlendirildi (Şekil 3). Cihazın dönen silindir bölgesi 3 eşit bölmeye ayrıldığında aynı anda 3 sıçanın motor performansını değerlendirmek mümkün oldu. Sıçanlar dönen silindir üzerine dönüş yönünün aksi istikametinde yerleştirildi. Silindirin dönüş hızı 5 dakika süre içerisinde kademeli olarak ve eşit sürelerle 4 devir/dakika'dan 40 devir/dakika'ya yükselecek şekilde ayarlandı. Sıçan silindir üzerinden düştüğünde platformun alt tarafında bulunan fotosel sistemi otomatik olarak zamanı durdurdu. Sonuç olarak sıçanın dönen silindir üzerinde kaldığı süre cihaz üzerinden okunarak saniye cinsinden kaydedildi. CDP-kolin veya tuzlu su enjeksiyonu öncesinde sıçanların rota-rod test cihazına adaptasyonları sağlandı. Bu amaçla sıçanlar, birbirini takip eden üç gün boyunca deneyde kullanılacak dönüş hızında silindir üzerine konarak cihaza alıştıırıldı. Alıştırma periyodunun ardından deney günü, 5 dakika arayla alınan üç ölçümün ortalaması kontrol değerleri olarak kaydedildi. Takiben i.s.v. yolla CDP-kolin (1 ve 2 $\mu\text{mol}/10 \mu\text{l}$) veya tuzlu su (10 μl) enjekte edilerek sıçanların 10. ve 20. dakikalardaki motor performansı değerlendirildi.



Şekil 3: Rota-rod Cihazı

İlaçlar ve Serebral Ventriküle Enjeksiyon

Çalışmada kullanılan CDP-kolin ve nalokson hidroklorid dihidrat Fluka (Fluka Chemie GmbH, İsviçre); kolin klorür, atropin sülfat, mekamilamin hidroklorid, hemikolinium-3 (HC-3), metillikakonitin sitrat (MLA), CGP-35348, prazosin hidroklorid ve metiserjid maleat Sigma (Sigma Chem. Co., MO, ABD); sitidin ve yohimbin hidroklorid Acros (Acros Organics, Geel, Belçika) firmasından temin edildi. İlaçlar tuzlu su (%0.9 NaCl) içinde hazırlandılar. İ.s.v. enjeksiyonlar kılavuz kanül içine yerleştirilen ve kılavuz kanülün ucundan 0.3 mm kadar çıkan 25 gauge'luk enjeksiyon kanülü aracılığı ile yapıldı. Enjeksiyon kanülü 50 µl'lik Hamilton mikroenjektörüne içerisinde 10 µl hacminde ilaç veya tuzlu su bulunan katater aracılığı ile bağlandı. İlaç enjeksiyonları 30 saniye süresince yavaş bir şekilde uygulandı. Enjeksiyon bitiminde enjeksiyon kanülü 30 saniye kadar daha yerinde bırakılarak ilacın geri gelmesi önlendi.

İstatistiki Değerlendirmeler

Veriler ortalama \pm standart hata olarak verildi. İstatistiki değerlendirmeler tek ve iki yönlü ANOVA'yı takiben Student-Newman-Keuls testi kullanılarak yapıldı. $P<0.05$ olan değerler istatistiki olarak "anlamalı" kabul edildi.

BULGULAR

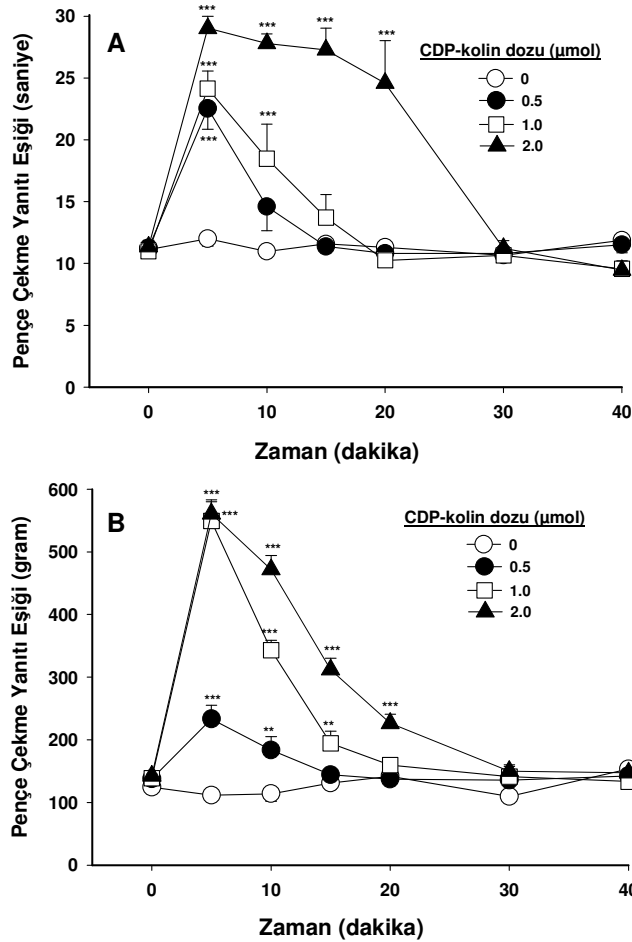
1. İntraserebroventriküler (i.s.v.) Yolla Uygulanan CDP-kolin'in Akut Ağrı Modellerindeki Analjezik Etkisi

İ.s.v. yolla uygulanan CDP-kolin'in analjezik etkisi, sıçanlarda termal ve mekanik pençe çekme testi kullanılarak araştırıldı.

Termal pençe çekme testinde deneye alınan bütün sıçanların kontrol pençe çekme yanıtı eşik değerleri ortalaması 11.2 ± 0.3 saniye ($n=26$) olarak ölçüldü. Takiben CDP-kolin (0.5 , 1 ve $2 \mu\text{mol}/10 \mu\text{l}$) veya tuzlu su ($10 \mu\text{l}$) i.s.v. yolla enjekte edildi. CDP-kolin, termal pençe çekme testinde doza ve zamana bağlı olarak anlamlı analjezik etki meydana getirdi. CDP-kolin'in analjezik etkisi, i.s.v. yolla enjeksiyonu takiben 5 . dakikada en yüksek değerine ulaştı [0.5 , 1 ve $2 \mu\text{mol}/10 \mu\text{l}$ dozlarında pençe çekme yanıtı eşik değerleri sırasıyla; 22.5 ± 1.7 ($n=8$), 24.1 ± 1.4 ($n=8$) ve 29 ± 1 saniye ($n=6$)]. Çalışmada kullanılan en düşük doz olan $0.5 \mu\text{mol}$ dozunda uygulanan CDP-kolin'in analjezik etkisi enjeksiyonu takiben 10 . dakikada geri dönerken; 1 ve $2 \mu\text{mol}$ dozlarında ise sırasıyla 15 . ve 30 . dakikada geri döndü. İki yönlü ANOVA analizine göre CDP-kolin'in termal pençe çekme testindeki analjezik etkisi doz [$F(3,22)=21.9$; $P<0.001$], zaman [$F(6,130)=45.7$; $P<0.001$] ve doz-zaman ilişkisi bakımından [$F(18,130)=11.1$; $P<0.001$] anlamlı bulundu (Şekil 1A).

Mekanik pençe çekme testinde deneye alınan bütün sıçanların kontrol pençe çekme yanıtı eşik değerleri ortalaması 135 ± 3 gram ($n=24$) olarak ölçüldü. Takiben CDP-kolin (0.5 , 1 ve $2 \mu\text{mol}/10 \mu\text{l}$) veya tuzlu su ($10 \mu\text{l}$) i.s.v. yolla enjekte edildi. CDP-kolin, mekanik pençe çekme testinde de doza ve zamana bağlı olarak anlamlı analjezik etki meydana getirdi. CDP-kolin'in analjezik etkisi i.s.v. yolla enjeksiyonu takiben 5 . dakikada en yüksek değerine ulaştı [0.5 , 1 ve $2 \mu\text{mol}/10 \mu\text{l}$ dozlarında pençe çekme yanıtı eşik değerleri sırasıyla; 234 ± 22 ($n=6$), 550 ± 30 ($n=6$) ve 561 ± 22 gram ($n=6$)].

Analjezik etki, 0.5 μmol CDP-kolin uygulamasını takiben 15. dakikada geri dönerken; 1 ve 2 μmol dozlarında ise sırasıyla 20. ve 30. dakikada geri döndü. İki yönlü ANOVA analizine göre CDP-kolin'in mekanik pençe çekme testindeki analjezik etkisi, doz [$F(3,20)=97.7$; $P<0.001$], zaman [$F(6,118)=177.2$; $P<0.001$] ve doz-zaman ilişkisi bakımından [$F(18,118)=46.7$; $P<0.001$] anlamlı bulundu (Şekil 1B).



Şekil-1: İntraserebroventriküler yol ile enjekte edilen CDP-kolin'in termal (A) ve mekanik (B) pençe çekme testindeki analjezik etkisi

Termal ve mekanik pençe çekme testinde, kontrol pençe çekme yanıtı eşik değerleri alındıktan sonra, i.s.v. yolla CDP-kolin (0.5, 1 ve 2 $\mu\text{mol}/10 \mu\text{l}$) ya da tuzlu su (10 μl) enjekte edildi. Takiben 5,10,15,20,30 ve 40. dakikalarda pençe çekme yanıtı eşik değerleri ölçüldü. Değerler 6-8 sıçanın ortalama \pm standart hatası olarak verildi. İstatistikî değerlendirmeler iki yönlü RM-ANOVA'yı takiben Student-Newman-Keuls testi ile yapıldı. $**p<0.01$ ve $***p<0.001$; tuzlu su grubuna (şekilde 0 doz olarak gösterilmiştir) göre anlamlı farkı göstermektedir.

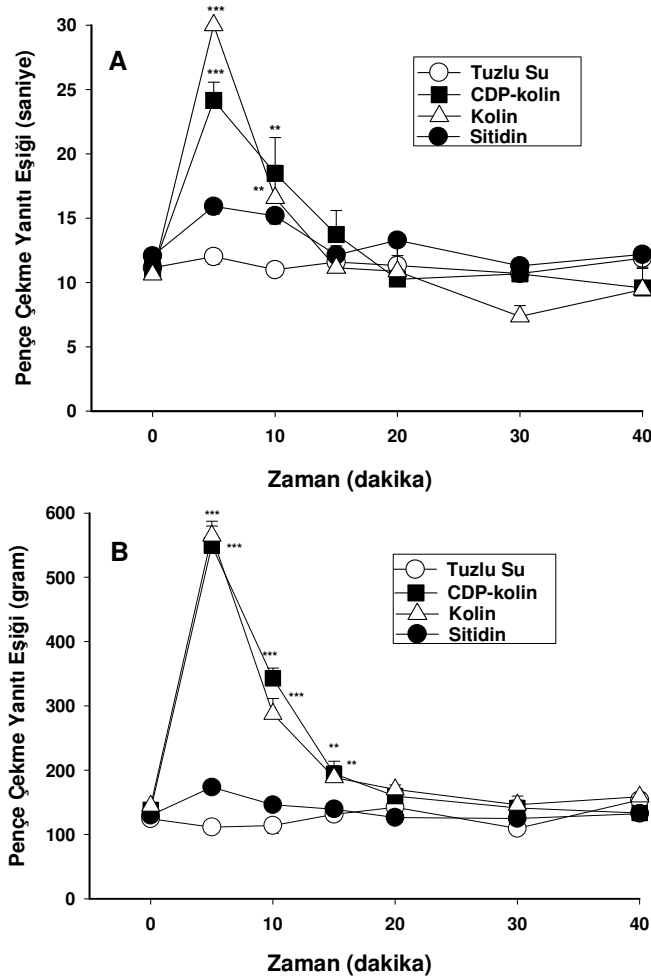
2. İ.s.v. Yolla Uygulanan Eşmolar Dozlardaki Kolin ve Sitidinin Akut Ağrı Modellerindeki Analjezik Etkisi

CDP-kolin'in hidroliz ürünleri olan kolin ve sitidinin, akut ağrı modellerindeki analjezik etkilerini araştırmak amacıyla sıçanlara CDP-kolin (1 µmol), kolin (1 µmol), sitidin (1 µmol) veya tuzlu su (10 µl) i.s.v. yolla enjekte edildi.

Termal pençe çekme testinde, deneye alınan bütün sıçanların kontrol pençe çekme yanıtı eşik değerleri ortalaması 11.1 ± 0.3 saniye ($n=22$) bulundu. Takiben sıçanlara CDP-kolin, kolin, sitidin veya tuzlu su i.s.v. yolla enjekte edildi ve pençe çekme yanıtı eşik değerleri ölçüldü. Kolin (1 µmol) uygulanmasını takiben meydana gelen analjezik etki, aynı dozda CDP-kolin (1 µmol) uygulamasından sonra görülen analjezik etkiye benzer şekildeydi. CDP-kolin uygulamasında olduğu gibi kolinin enjeksiyonunu takiben de pençe çekme yanıtı eşik değeri, 5. dakikada en yüksek değerine ulaştı [30 ± 0 saniye ($n=6$)]. Daha sonra CDP-kolin'e benzer şekilde etkisi azalarak 15. dakikada geri döndü. Sitidin (1 µmol) ise, kolinden farklı olarak pençe çekme yanıtı eşik değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı bir değişikliğe yol açmadı. İki yönlü ANOVA analizine göre, termal pençe çekme testinde CDP-kolin ve kolin, tedavi [$F(3,18)=3,5$; $P<0.05$], zaman [$F(6,105)=35.6$; $P<0.001$] ve tedavi-zaman ilişkisi bakımından [$F(18,105)=8,1$; $P<0.001$] istatistiksel olarak anlamlı analjezik etki oluşturdu (Şekil 2A).

Mekanik pençe çekme testinde deneye alınan bütün sıçanların kontrol pençe çekme yanıtı eşik değerleri ortalaması 134 ± 3 gram ($n=24$) bulundu. Takiben sıçanlara CDP-kolin, kolin, sitidin veya tuzlu su i.s.v. yolla enjekte edildi ve pençe çekme yanıtı eşik değerleri ölçüldü. Termal pençe çekme testinde olduğu gibi, mekanik pençe çekme testinde de kolin (1 µmol) uygulanmasını takiben meydana gelen analjezik etki, aynı dozda CDP-kolin (1 µmol) uygulamasından sonra görülen analjezik etkiye benzerdi. CDP-kolin uygulamasında olduğu gibi kolinin enjeksiyonunu takiben de pençe çekme

yanıtı eşiği, 5. dakikada en üst düzeyine ulaştı [565 ± 23 gram ($n=6$)]. Takiben CDP-kolin'e benzer şekilde etkisi azalarak 20. dakikada geri döndü. Sitidin (1 μ mol) ise, kolinin aksine pençe çekme yanıtı eşik değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik oluşturmadı. İki yönlü ANOVA analizine göre, mekanik pençe çekme testinde CDP-kolin ve kolin tedavi [$F(3,20)=75.8$; $P<0.001$], zaman [$F(6,118)=168.9$; $P<0.001$] ve tedavi-zaman ilişkisi bakımından [$F(18,118)=51.9$; $P<0.001$] istatistiksel olarak anlamlı analjezik etki meydana getirdi (Şekil 2B).



Şekil-2: İntraserebroventriküler yol ile enjekte edilen eşmolar dozlardaki CDP-kolin, kolin ve sitidinin termal (A) ve mekanik (B) pençe çekme testindeki analjezik etkisi

Termal ve mekanik pençe çekme testinde, kontrol pençe çekme yanıtı eşik değerleri alındıktan sonra, i.s.v yolla CDP-kolin (1 μ mol), kolin (1 μ mol), sitidin (1 μ mol) ya da tuzlu su (10 μ l) enjekte edildi. Takiben 5,10,15,20,30 ve 40. dakikalarda pençe çekme yanıtı eşik değerleri ölçüldü. Değerler 6-8 sıçanın ortalama \pm standart hatası olarak verildi. İstatistiksel değerlendirmeler iki yönlü RM-ANOVA'yı takiben Student-Newman-Keuls testi ile yapıldı. ** $p<0.01$ ve *** $p<0.001$; tuzlu su grubuna göre anlamlı farkı göstermektedir.

3. İ.s.v. Yolla Uygulanan CDP-kolin'in Analjezik Etkisinde Kolinerjik Reseptör Antagonistleri ile Yapılan Ön Tedavinin Etkisi

CDP-kolin'in analjezik etkisine aracılık ettiği düşünölen santral kolinerjik reseptör tiplerinin araştırılması amacıyla, sıçanlara i.s.v. yolla CDP-kolin (1 µmol) veya tuzlu su (10 µl) enjeksiyonundan 15 dakika önce, kolinerjik muskarinik reseptör antagonisti atropin sülfat (10 µg), kolinerjik nikotinik reseptör antagonisti mekamilamin (50 µg), α7 nöronal nikotinik asetilkolin reseptör antagonisti metillikakonitin (MLA; 25 µg) veya tuzlu su (10 µl) i.s.v. yolla enjekte edildi. Termal ve mekanik pençe çekme yanıtı eşik değerleri, ikinci enjeksiyondan 10 dakika sonra ölçöldü.

Termal pençe çekme testinde, tuzlu su veya CDP-kolin enjeksiyonu öncesi atropin, mekamilamin, MLA veya tuzlu su ön tedavisi uygulanan sıçanların kontrol pençe çekme yanıtı eşik değerleri ortalaması 11.4 ± 0.1 saniye (n=49) olarak ölçöldü. Tuzlu su ön tedavisi sonrası i.s.v. yolla CDP-kolin enjeksiyonu yapılan sıçanların pençe çekme yanıtı eşik değerleri 26 ± 1.8 saniye (n=6) iken tuzlu su enjeksiyonu yapılan sıçanların termal pençe çekme yanıtı eşik değerleri 11.7 ± 0.4 (n=6) idi. Buna göre tuzlu su sonrası CDP-kolin enjeksiyonu, termal pençe çekme yanıtı eşik değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı [$F(1,10)=58.9$; $P<0.001$] bir artışa yol açtı (Şekil 3A).

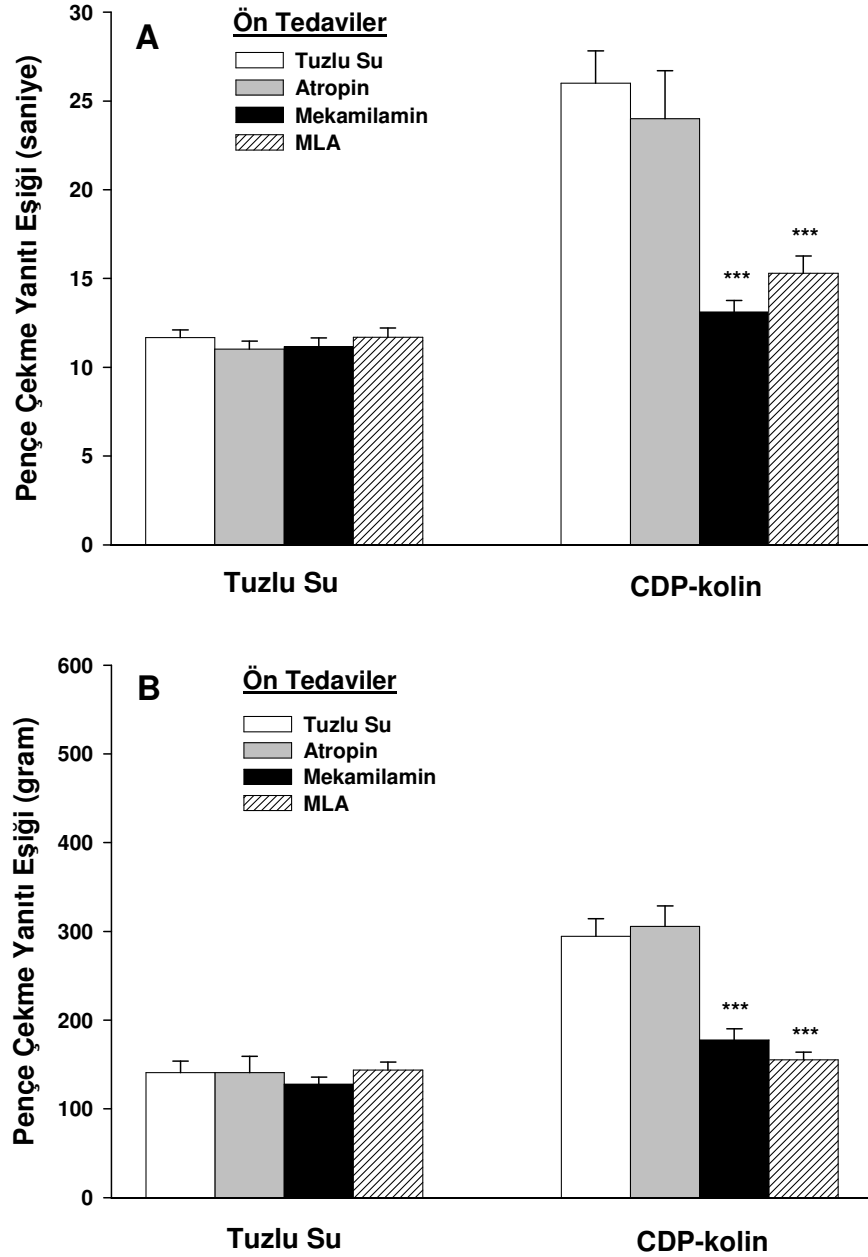
Atropin, mekamilamin ve MLA ön tedavisi sonrası CDP-kolin enjeksiyonu yapılan sıçanlarda ise pençe çekme yanıtı eşik değerleri sırasıyla; 24 ± 2.7 (n=6); 13.1 ± 0.6 (n=9) ve 15.3 ± 0.9 saniye (n=6) olarak ölçöldü. Buna göre termal pençe çekme testinde mekamilamin ve MLA ön tedavileri, CDP-kolin'in analjezik etkisini istatistiksel olarak anlamlı şekilde bloke ederken [sırasıyla $F(1,13)=60.6$; $P<0.001$ ve $F(1,10)=27.1$; $P<0.001$], atropin ön tedavisi ise CDP-kolin'in etkisinde anlamlı bir değişiklik meydana getirmedi [$F(1,10)=0.38$; $P=0.553$] (Şekil 3A).

Atropin, mekamilamin ve MLA ön tedavileri ise tek başlarına termal pençe çekme yanıtı eşik değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı bir değişikliğe neden olmadı (Şekil 3A).

Mekanik pençe çekme testinde, tuzlu su veya CDP-kolin enjeksiyonu öncesi atropin, mekamilamin, MLA veya tuzlu su ön tedavisi uygulanan sıçanların kontrol pençe çekme yanıtı eşik değerleri ortalaması 136 ± 2 gram ($n=46$) olarak ölçüldü. Tuzlu su ön tedavisini takiben kontrol olarak i.s.v. yolla tuzlu su uygulanan sıçanların mekanik pençe çekme yanıtı eşik değerleri 141 ± 13 ($n=5$) iken, CDP-kolin enjeksiyonu yapılan sıçanların pençe çekme yanıtı eşik değerleri 295 ± 20 gram ($n=6$) olarak ölçüldü. Buna göre tuzlu su sonrası CDP-kolin enjeksiyonu mekanik pençe çekme yanıtı eşik değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı [$F(1,9)=38.6$; $P<0.001$] bir artışa yol açtı (Şekil 3B).

Atropin, mekamilamin ve MLA ön tedavileri sonrası CDP-kolin enjeksiyonu yapılan sıçanlarda ise pençe çekme yanıtı eşik değerleri sırasıyla; 306 ± 23 ($n=6$), 178 ± 13 ($n=6$) ve 155 ± 9 gram ($n=8$) olarak ölçüldü. Termal pençe çekme testinde olduğu gibi mekanik pençe çekme testinde de mekamilamin ve MLA ön tedavileri, CDP-kolin'in analjezik etkisini istatistiksel olarak anlamlı şekilde bloke ederken [sırasıyla $F(1,10)=25.0$; $P<0.001$ ve $F(1,12)=51.2$; $P<0.001$], atropin ön tedavisi ise CDP-kolin'in analjezik etkisini değiştirmede [$F(1,10)=0.132$; $P=0.724$] (Şekil 3B).

Atropin, mekamilamin ve MLA ön tedavileri ise tek başlarına mekanik pençe çekme yanıtı eşik değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı bir değişikliğe neden olmadı (Şekil 3B).



Şekil-3: İ.s.v. yolla uygulanan CDP-kolin'in termal (A) ve mekanik (B) pençe çekme testindeki analjezik etkisinde kolinerjik reseptör antagonist ön tedavilerinin etkisi

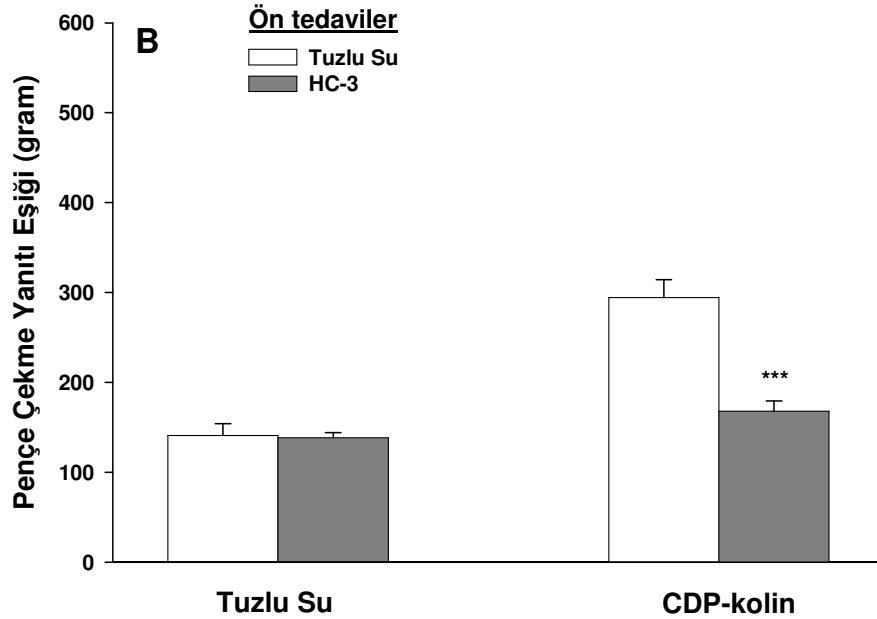
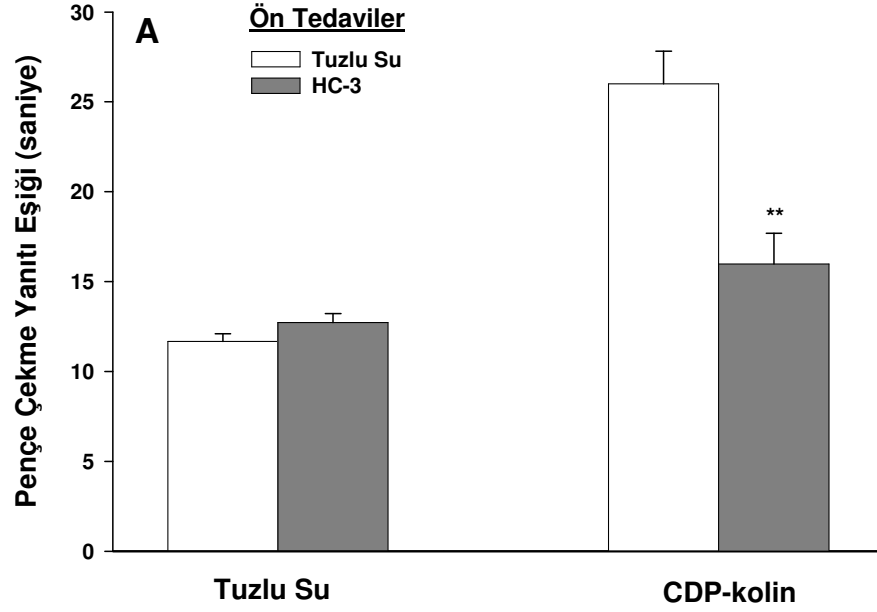
Termal ve mekanik pençe çekme testinde, kontrol pençe çekme yanıtı eşik değerleri alındıktan sonra i.s.v. yolla atropin sülfat (10 µg), mekamilamin (50 µg), MLA (25 µg) veya tuzlu su (10 µl) ön tedavileri uygulandı. 15 dakika sonra i.s.v. yolla CDP-kolin (1 µmol) ya da tuzlu su (10 µl) enjekte edildi. İkinci enjeksiyondan 10 dakika sonra pençe çekme yanıtı eşik değerleri ölçüldü. Değerler 5-9 sıçanın ortalama ± standart hatası olarak verildi. İstatistiksel değerlendirmeler tek yönlü ANOVA'yı takiben Student-Newman-Keuls testi ile yapıldı. *** $p < 0.001$; kontrol grubuna göre anlamlı farkı göstermektedir.

4. İ.s.v. Yolla Uygulanan CDP-kolin'in Analjezik Etkisinde Hemikolinium-3 (HC-3) Ön Tedavisinin Etkisi

CDP-kolin'in oluşturduğu analjezik etkide presinaptik kolinerjik mekanizmaların rolünü test etmek için, kolinin sinir ucuna yüksek afiniteli uptake sistemi ile geri alımını bloke eden bir ilaç olan HC-3 (1 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. Termal ve mekanik pençe çekme yanıtı eşik değerleri, ikinci enjeksiyondan 10 dakika sonra ölçüldü.

Termal pençe çekme testinde deneye alınan bütün sıçanların kontrol pençe çekme yanıtı eşik değerleri ortalaması 11.5 ± 0.2 saniye (n=24) idi. HC-3 ön tedavisini takiben CDP-kolin uygulanan sıçanlarda 10. dakikada alınan pençe çekme yanıtı eşik değeri 16 ± 1.7 saniye (n=6) iken kontrol grubunda ise 26 ± 1.8 (n=6) olarak ölçüldü. Bu sonuca göre termal pençe çekme testinde, HC-3 ön tedavisi CDP-kolin'in neden olduğu analjezik etkiyi istatistiksel olarak anlamlı şekilde [$F(1,10)=16.1$; $P<0.01$] bloke etti. HC-3 ön tedavisi tek başına termal pençe çekme yanıtı eşik değerlerini değiştirmedir (Şekil 4A).

Mekanik pençe çekme testinde deneye alınan bütün sıçanların kontrol pençe çekme yanıtı eşik değerleri ortalaması 138 ± 2 gram (n=23) olarak bulundu. HC-3 ön tedavisini takiben CDP-kolin uygulanan sıçanlarda 10. dakikada alınan pençe çekme yanıtı eşik değeri 168 ± 11 gram (n=7) iken kontrol grubunda ise 295 ± 20 (n=6) oldu. Bu sonuca göre mekanik pençe çekme testinde, HC-3 ön tedavisi CDP-kolin'in analjezik etkisini istatistiksel olarak anlamlı şekilde [$F(1,11)=33.6$; $P<0.001$] bloke etti. HC-3 ön tedavisi ise tek başına mekanik pençe çekme yanıtı eşik değerlerini değiştirmedir (Şekil 4B).



Şekil-4: İ.s.v. yolla uygulanan CDP-kolin'in termal (A) ve mekanik (B) pençe çekme testindeki analjezik etkisinde hemikolinium-3 (HC-3) ön tedavisinin etkisi

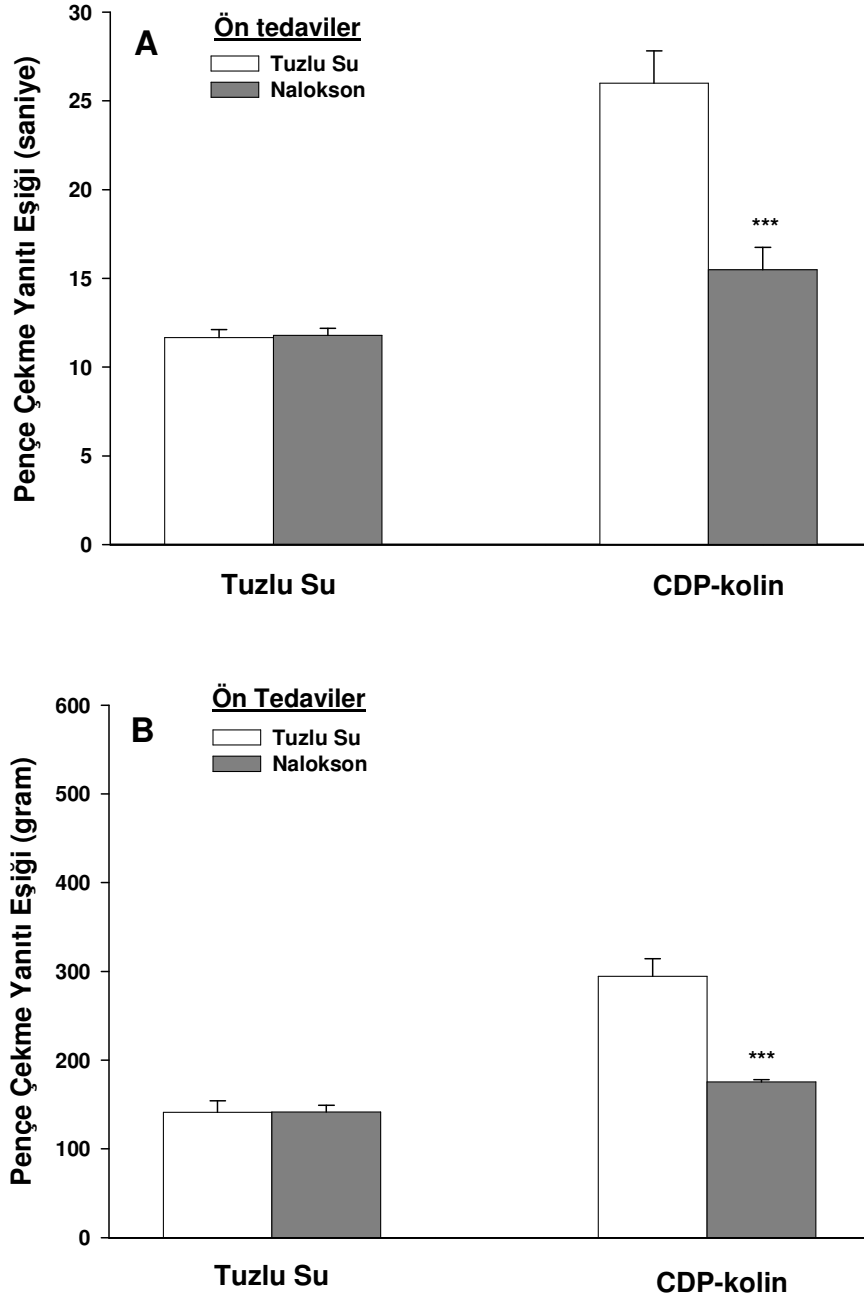
Termal ve mekanik pençe çekme testinde, kontrol pençe çekme yanıtı eşik değerleri alındıktan sonra i.s.v. yolla HC-3 (1 µg) veya tuzlu su (10 µl) ön tedavileri uygulandı. 15 dakika sonra i.s.v. yolla CDP-kolin (1 µmol) ya da tuzlu su (10 µl) enjekte edildi. İkinci enjeksiyondan 10 dakika sonra pençe çekme yanıtı eşik değerleri ölçüldü. Değerler 5-7 sıçanın ortalama ± standart hatası olarak verildi. İstatistiki değerlendirmeler tek yönlü ANOVA'yı takiben Student-Newman-Keuls testi ile yapıldı. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$; kontrol grubuna göre anlamlı farkı göstermektedir.

5. İ.s.v. Yolla Uygulanan CDP-kolin'in Analjezik Etkisinde Nalokson Ön Tedavisinin Etkisi

CDP-kolin ile ortaya çıkan analjezik etkide santral opioid sistem rolünü araştırmak amacıyla, seçici olmayan opioid reseptör antagonisti nalokson (10 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. Termal ve mekanik pençe çekme yanıtı eşik değerleri, ikinci enjeksiyondan 10 dakika sonra ölçüldü.

Termal pençe çekme testinde deneye alınan bütün sıçanların kontrol pençe çekme yanıtı eşik değerleri ortalaması 11.4 ± 0.1 saniye (n=24) olarak bulundu. Nalokson ön tedavisini takiben CDP-kolin uygulanan sıçanlarda pençe çekme yanıtı eşik değerleri 15.5 ± 1.3 saniye (n=6) iken tuzlu su ön tedavisi yapılan grupta ise 26 ± 1.8 (n=6) olarak ölçüldü. Bu sonuca göre termal pençe çekme testinde nalokson ön tedavisi, CDP-kolin ile ortaya çıkan analjezik etkiyi istatistiksel olarak anlamlı şekilde [$F(1,10)=22.5$; $P<0.001$] bloke etti. Nalokson ön tedavisi ise tek başına termal pençe çekme yanıtı eşik değerlerinde değişiklik yapmadı (Şekil 5A).

Mekanik pençe çekme testinde deneye alınan bütün sıçanların kontrol pençe çekme yanıtı eşik değerleri ortalaması 136 ± 3 gram (n=23) olarak bulundu. Nalokson ön tedavisini takiben CDP-kolin uygulanan sıçanlarda pençe çekme yanıtı eşik değerleri 175 ± 3 gram (n=7) iken tuzlu su ön tedavisi yapılan grupta ise 295 ± 20 (n=6) olarak ölçüldü. Elde edilen sonuçlara göre mekanik pençe çekme testinde de, nalokson ön tedavisi CDP-kolin ile ortaya çıkan analjezik etkiyi istatistiksel olarak anlamlı şekilde [$F(1,11)=42.7$; $P<0.001$] bloke etti. Nalokson ön tedavisi tek başına mekanik pençe çekme yanıtı eşik değerlerini değiştirmedi (Şekil 5B).



Şekil-5: İ.s.v. yolla uygulanan CDP-kolin'in termal (A) ve mekanik (B) pençe çekme testindeki analjezik etkisinde nalokson ön tedavisinin etkisi

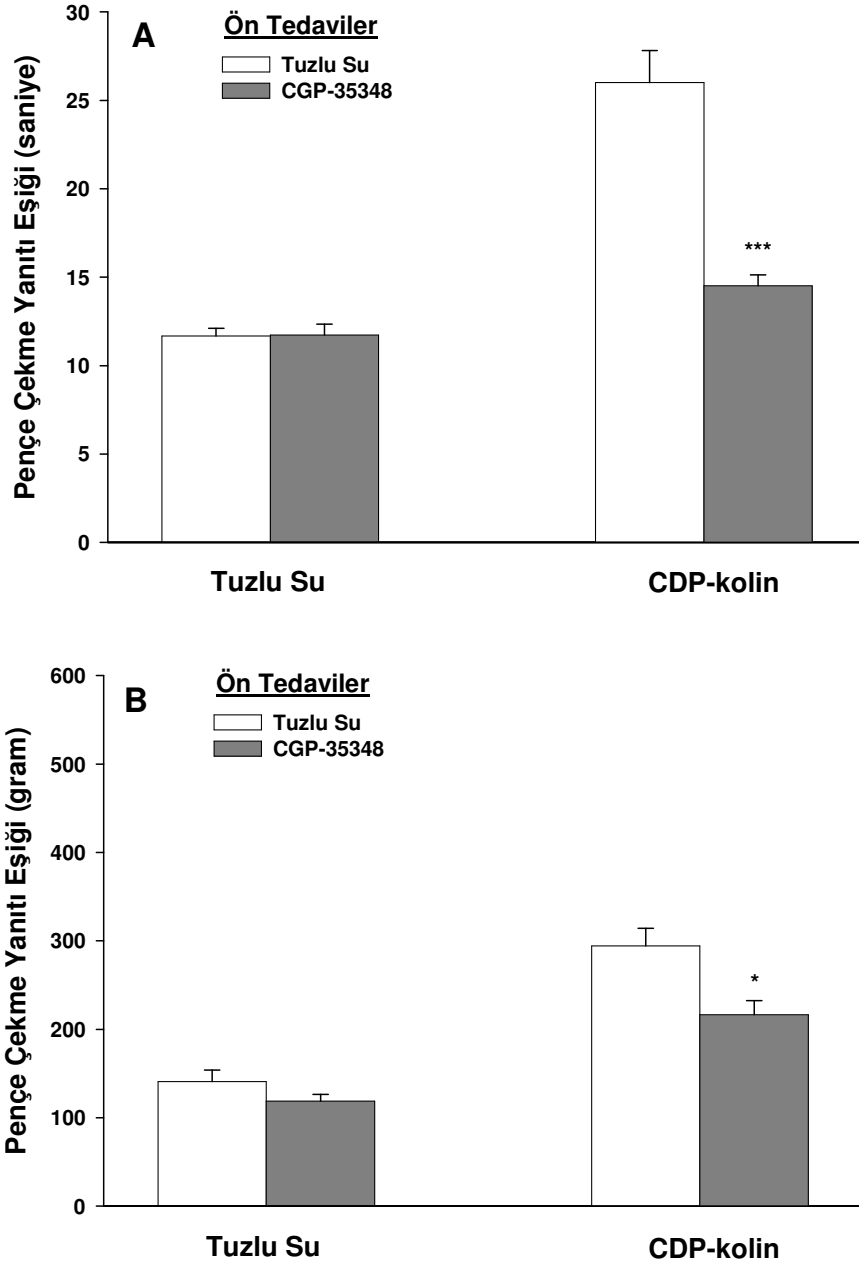
Termal ve mekanik pençe çekme testinde, kontrol pençe çekme yanıtı eşik değerleri alındıktan sonra i.s.v. yolla nalokson (10 µg) veya tuzlu su (10 µl) ön tedavileri uygulandı. 15 dakika sonra i.s.v. yolla CDP-kolin (1 µmol) ya da tuzlu su (10 µl) enjekte edildi. İkinci enjeksiyondan 10 dakika sonra pençe çekme yanıtı eşik değerleri ölçüldü. Değerler 5-7 sıçanın ortalama ± standart hatası olarak verildi. İstatistikî değerlendirmeler tek yönlü ANOVA'yı takiben Student-Newman-Keuls testi ile yapıldı. *** $p < 0.001$; kontrol grubuna göre anlamlı farkı göstermektedir.

6. İ.s.v. Yolla Uygulanan CDP-kolin'in Analjezik Etkisinde CGP-35348 Ön Tedavisinin Etkisi

CDP-kolin'in oluşturduğu analjezik etkide, santral GABA_A reseptör sistemin rolünü araştırmak amacı ile 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. Termal ve mekanik pençe çekme yanıtı eşik değerleri, ikinci enjeksiyondan 10 dakika sonra ölçüldü.

Termal pençe çekme testinde deneye alınan bütün sıçanların kontrol pençe çekme yanıtı eşik değerleri ortalaması 11.1 ± 0.3 saniye (n=22) olarak bulundu. CGP-35348 ön tedavisini takiben CDP-kolin uygulanan sıçanlarda pençe çekme yanıtı eşik değerleri 14.5 ± 0.6 saniye (n=6) iken tuzlu su ön tedavisi yapılan grupta ise 26 ± 1.8 (n=6) olarak ölçüldü. Bu sonuca göre termal pençe çekme testinde CGP-35348 ön tedavisi, CDP-kolin ile ortaya çıkan analjezik etkiyi istatistiksel olarak anlamlı şekilde [$F(1,10)=35.9$; $P<0.001$] bloke etti. CGP-35348 ön tedavisi ise tek başına termal pençe çekme yanıtı eşik değerlerinde değişiklik yapmadı (Şekil 6A).

Mekanik pençe çekme testinde deneye alınan bütün sıçanların kontrol pençe çekme yanıtı eşik değerleri ortalaması 137 ± 4 gram (n=22) olarak bulundu. CGP-35348 ön tedavisini takiben CDP-kolin uygulanan sıçanlarda pençe çekme yanıtı eşik değerleri 217 ± 16 gram (n=6) iken tuzlu su ön tedavisi yapılan grupta ise 295 ± 20 (n=6) olarak ölçüldü. Bu sonuçlara göre mekanik pençe çekme testinde de CGP-35348 ön tedavisi, CDP-kolin ile ortaya çıkan analjezik etkiyi istatistiksel olarak anlamlı şekilde [$F(1,10)=9.5$; $P<0.05$] bloke etti. CGP-35348 ön tedavisi, tek başına mekanik pençe çekme yanıtı eşik değerlerini değiştirmede (Şekil 6B).



Şekil-6: İ.s.v yolla uygulanan CDP-kolin'in termal (A) ve mekanik (B) pençe çekme testindeki analjezik etkisinde CGP-35348 ön tedavisinin etkisi

Termal ve mekanik pençe çekme testinde, kontrol pençe çekme yanıtı eşik değerleri alındıktan sonra i.s.v. yolla CGP-35348 (20 µg) veya tuzlu su (10 µl) ön tedavileri uygulandı. 15 dakika sonra i.s.v. yolla CDP-kolin (1 µmol) ya da tuzlu su (10 µl) enjekte edildi. İkinci enjeksiyondan 10 dakika sonra pençe çekme yanıtı eşik değerleri ölçüldü. Değerler 5-6 sıçanın ortalama ± standart hatası olarak verildi. İstatistikî değerlendirmeler tek yönlü ANOVA'yı takiben Student-Newman-Keuls testi ile yapıldı. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$; kontrole göre anlamlı farkı göstermektedir.

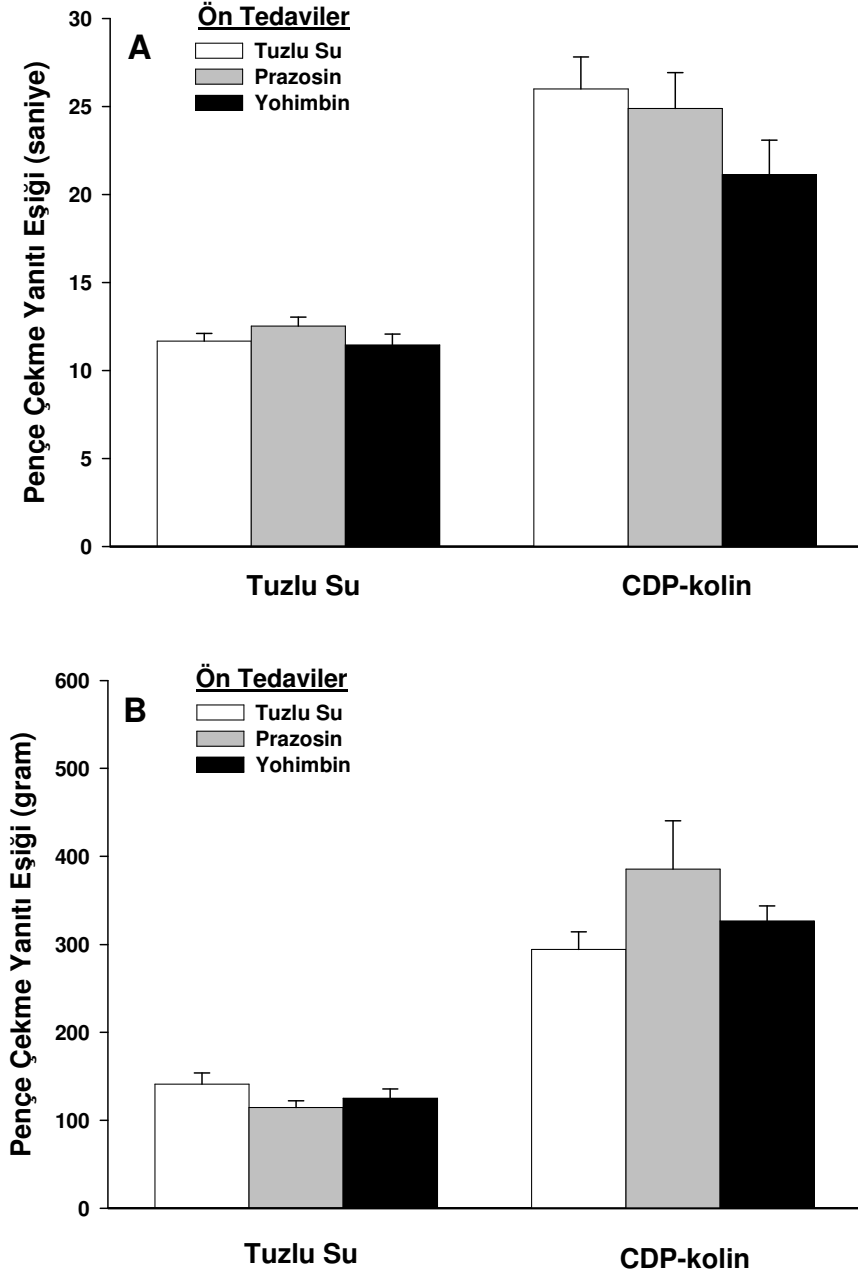
7. İ.s.v. Yolla Uygulanan CDP-kolin'in Analjezik Etkisinde Prazosin ve Yohimbin Ön Tedavilerinin Etkileri

CDP-kolin'in oluşturduğu analjezik etkide santral α -adrenerjik sistemin rolünü araştırmak amacıyla, α -1 adrenerjik reseptör antagonisti prazosin (20 μ g), α -2 adrenerjik reseptör antagonisti yohimbin (30 μ g) veya tuzlu su (10 μ l) i.s.v. yolla uygulandı. Takiben 15 dakika sonra sıçanlara CDP-kolin (1 μ mol; i.s.v.) veya tuzlu su (10 μ l; i.s.v.) enjekte edildi. Termal ve mekanik pençe çekme yanıtı eşik değerleri, ikinci enjeksiyondan 10 dakika sonra ölçüldü.

Termal pençe çekme testinde deneye alınan bütün sıçanların kontrol pençe çekme yanıtı eşik değerleri ortalaması 11.3 ± 0.2 saniye (n=34) idi. Prazosin ve yohimbin ön tedavisini takiben CDP-kolin uygulanan sıçanlarda pençe çekme yanıtı eşik değerleri sırasıyla 24.9 ± 2 (n=6) ve 21.1 ± 2 saniye (n=6) bulundu. Tuzlu su ön tedavisi yapılan grupta da 26 ± 1.8 saniye (n=6) olarak ölçüldü. Bu sonuçlara göre termal pençe çekme testinde, hem prazosin hem de yohimbin ön tedavisi CDP-kolin ile ortaya çıkan analjezik etkide istatistiksel olarak anlamlı bir değişikliğe yol açmadı [sırasıyla, $F(1,10)=0.16$; $P=0.694$ ve $F(1,10)=3.3$; $P=0.098$]. Prazosin ve yohimbin ön tedavileri de, tek başlarına termal pençe çekme eşik değerlerinde değişiklik yapmadı (Şekil 7A).

Mekanik pençe çekme testinde deneye alınan bütün sıçanların kontrol pençe çekme yanıtı eşik değerleri ortalaması 132 ± 3 gram (n=34) olarak bulundu. Prazosin ve yohimbin ön tedavisini takiben CDP-kolin uygulanan sıçanlarda pençe çekme yanıtı eşik değerleri sırasıyla 386 ± 55 (n=6) ve 327 ± 17 gram (n=6) olarak ölçüldü. Tuzlu su ön tedavisi yapılan grupta da 295 ± 20 gram (n=6) idi. Bu sonuçlara göre termal pençe çekme testinde olduğu gibi mekanik pençe çekme testinde de, prazosin ve yohimbin ön tedavisi CDP-kolin ile ortaya çıkan analjezik etkiyi istatistiksel olarak anlamlı bir değişikliğe uğratmadı [sırasıyla, $F(1,10)=2.4$; $P=0.150$ ve $F(1,10)=1.5$;

$P=0.249$]. Prazosin ve yohimbin ön tedavileri de, tek başlarına mekanik pençe çekme eşik değerlerinde değişiklik yapmadı (Şekil 7B).



Şekil-7: İ.s.v yolla uygulanan CDP-kolin'in termal (A) ve mekanik (B) pençe çekme testindeki analjezik etkisinde prazosin ve yohimbin ön tedavilerinin etkisi

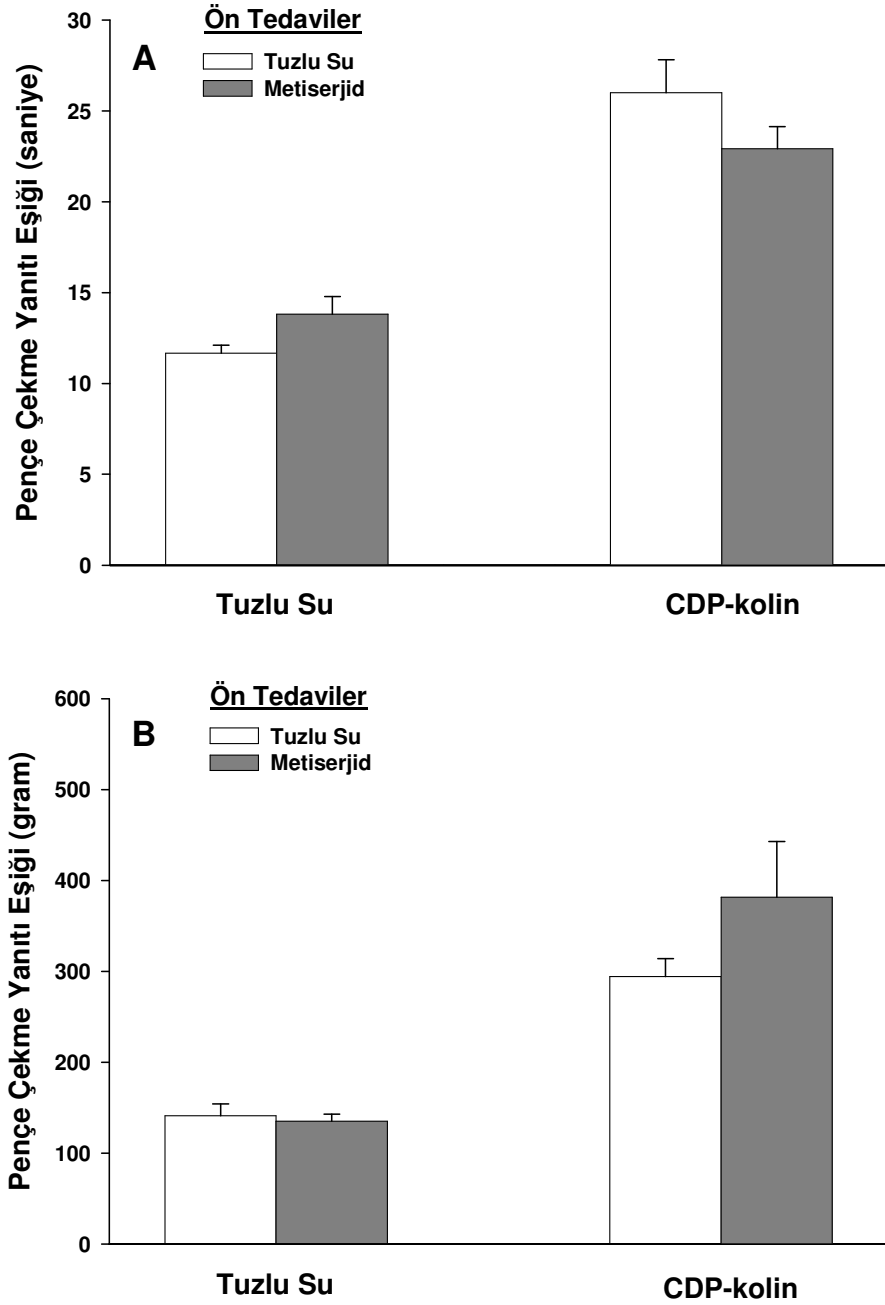
Termal ve mekanik pençe çekme testinde, kontrol pençe çekme yanıtı eşik değerleri alındıktan sonra i.s.v. yolla prazosin (20 µg), yohimbin (30 µg) veya tuzlu su (10 µl) ön tedavileri uygulandı. 15 dakika sonra i.s.v. yolla CDP-kolin (1 µmol) ya da tuzlu su (10 µl) enjekte edildi. İkinci enjeksiyondan 10 dakika sonra pençe çekme yanıtı eşik değerleri ölçüldü. Değerler 5-6 sıçanın ortalama ± standart hatası olarak verildi. İstatistikî değerlendirmeler tek yönlü ANOVA'yı takiben Student-Newman-Keuls testi ile yapıldı.

8. İ.s.v. Yolla Uygulanan CDP-kolin'in Analjezik Etkisinde Metiserjid Ön Tedavisinin Etkisi

CDP-kolin ile ortaya çıkan analjezik etkide santral serotonerjik sistemin rolünü araştırmak amacıyla, seçici olmayan serotonin reseptör antagonisti metiserjid (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. Termal ve mekanik pençe çekme yanıtı eşik değerleri, ikinci enjeksiyondan 10 dakika sonra ölçüldü.

Termal pençe çekme testinde deneye alınan bütün sıçanların kontrol pençe çekme yanıtı eşik değerleri ortalaması 11.6 ± 0.2 saniye (n=24) olarak bulundu. Metiserjid ön tedavisini takiben CDP-kolin uygulanan sıçanlarda pençe çekme yanıtı eşik değerleri 22.9 ± 1.2 saniye (n=7) olarak ölçüldü. Tuzlu su ön tedavisi yapılan grupta da 26 ± 1.8 (n=6) idi. Bu sonuca göre termal pençe çekme testinde, metiserjid ön tedavisi CDP-kolin ile ortaya çıkan analjezik etkide istatistiksel olarak anlamlı bir değişikliğe yol açmadı [$F(1,11)=2.1$; $P=0.177$]. Metiserjid ön tedavisi, tek başına termal pençe çekme eşik değerlerinde değişikliğe neden olmadı (Şekil 8A).

Mekanik pençe çekme testinde deneye alınan bütün sıçanların kontrol pençe çekme yanıtı eşik değerleri ortalaması 144 ± 4 gram (n=24) olarak bulundu. Metiserjid ön tedavisini takiben CDP-kolin uygulanan sıçanlarda pençe çekme yanıtı eşik değerleri 381 ± 62 gram (n=7) olarak ölçüldü. Tuzlu su ön tedavisi yapılan grupta da 295 ± 20 (n=6) idi. Elde edilen sonuçlara göre mekanik pençe çekme testinde, metiserjid ön tedavisi CDP-kolin ile ortaya çıkan analjezik etkiyi istatistiksel olarak anlamlı bir değişikliğe uğratmadı [$F(1,11)=1.6$; $P=0.236$]. Metiserjid ön tedavisi, tek başına mekanik pençe çekme yanıtı eşik değerlerini değiştirmede (Şekil 8B).

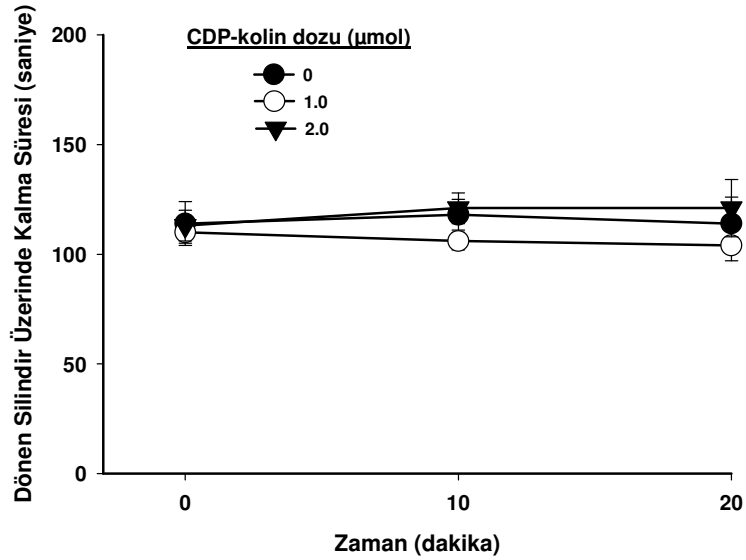


Şekil-8: İ.s.v yolla uygulanan CDP-kolin'in termal (A) ve mekanik (B) pençe çekme testindeki analjezik etkisinde metiserjid ön tedavisinin etkisi

Termal ve mekanik pençe çekme testinde, kontrol pençe çekme yanıtı eşik değerleri alındıktan sonra i.s.v. yolla metiserjid (20 µg) veya tuzlu su (10 µl) ön tedavileri uygulandı. 15 dakika sonra i.s.v. yolla CDP-kolin (1 µmol) ya da tuzlu su (10 µl) enjekte edildi. İkinci enjeksiyondan 10 dakika sonra pençe çekme yanıtı eşik değerleri ölçüldü. Değerler 5-7 sıçanın ortalama ± standart hatası olarak verildi. İstatistiksel değerlendirmeler tek yönlü ANOVA'yı takiben Student-Newman-Keuls testi ile yapıldı.

9. İ.s.v. Yolla Uygulanan CDP-kolin'in Sıçanların Motor Performansı Üzerine Etkisi

Sıçanlarda analjezik etkisi olduğu gösterilen CDP-kolin'in, motor fonksiyon kaybına yol açıp açmadığını değerlendirmek amacıyla, CDP-kolin (1 ve 2 µmol; i.s.v.) veya tuzlu su (10 µl; i.s.v.) enjeksiyonunu takiben 10. ve 20. dakikalarda rota-rod test cihazında sıçanların motor fonksiyonları değerlendirildi. CDP-kolin veya tuzlu su enjeksiyonu öncesi sıçanların dönen silindir üzerinde ortalama kalma süreleri 112 ± 4 saniye ($n=22$) olarak bulundu. CDP-kolin (1 ve 2 µmol; i.s.v.) veya tuzlu su (10 µl; i.s.v.) enjeksiyonu sonrası 10. dakika değerleri ise sırasıyla 106 ± 4 ($n=8$), 121 ± 7 ($n=8$) ve 118 ± 7 saniye ($n=6$) olarak ölçüldü. 20. dakikada dönen silindir üzerinde kalma süreleri ise; sırasıyla 104 ± 7 ($n=8$), 121 ± 13 ($n=8$) ve 114 ± 12 saniye ($n=6$) olarak bulundu. Sonuçta, iki yönlü ANOVA analizine göre CDP-kolin, sıçanların motor performansında doz [$F(2,19)=1.07$; $P=0.363$], zaman [$F(2,38)=0.14$; $P=0.874$] ve doz-zaman ilişkisi [$F(4,38)=0.38$; $P=0.822$] bakımından anlamlı bir değişikliğe neden olmadı (Şekil 9).



Şekil-9: İ.s.v. yolla CDP-kolin enjeksiyonu sonrası sıçanların rota rod test cihazındaki motor performansı

Rota-rod test cihazında kontrol değerleri alındıktan sonra, sıçanlara CDP-kolin (1 ve 2 µmol/10 µl; i.s.v.) ya da tuzlu su (10 µl; i.s.v.) enjekte edildi. Takiben 10. ve 20. dakikalarda dönen silindir üzerinde kalma süreleri ölçüldü. Değerler 6-8 sıçanın ortalama \pm standart hatası olarak verildi. İstatistiki değerlendirmeler iki yönlü RM-ANOVA'yı takiben Student-Newman-Keuls testi ile yapıldı. (Şekilde 0, tuzlu su grubu olarak gösterilmiştir.)

TARTIŞMA ve SONUÇ

Çalışmamızdan elde edilen bulgular, intraserebroventriküler (i.s.v.) yolla uygulanan CDP-kolin'in, akut ağrı modelleri olan termal ve mekanik pençe çekme testinde doza ve zamana bağlı olacak şekilde analjezik etki meydana getirdiğini göstermiştir (Şekil 1). Eşmolar dozda i.s.v. yolla uygulanan kolin, kullanılan akut ağrı modellerinde CDP-kolin'e benzer etki meydana getirirken, i.s.v. sitidin anlamlı bir analjezik etki meydana getirmemiştir (Şekil 2). CDP-kolin'in oluşturduğu analjezik etki i.s.v. yolla uygulanan mekamilamin, MLA, HC-3, nalokson ve CGP-35348 ön tedavileri ile ortadan kaldırılırken (Şekil 3, 4, 5, 6), i.s.v. atropin, prazosin, yohimbin ve metiserjid ön tedavileri CDP-kolin'in analjezik etkisini değiştirmemiştir (Şekil 3, 7, 8). CDP-kolin, sıçanlarda görünen bir davranışsal değişiklik meydana getirmemiş ve motor koordinasyonlarında bozukluğa yol açmamıştır (Şekil 9).

Çalışmalarımızdan elde ettiğimiz bazı sonuçlar, CDP-kolin'in analjezik etkisine kolin ve santral kolinerjik aktivasyonun aracılık ettiğini göstermektedir. Bunlardan ilki; i.s.v. yolla uygulanan kolinin CDP-kolin'in analjezik etkisini taklit ederken sitidinin ise anlamlı derecede analjezik etki oluşturmamasıdır. Gerçekten de termal ve mekanik pençe çekme testlerinde eşmolar dozlarda (1 µmol; i.s.v.) uygulanan kolin, CDP-kolin'e (1 µmol; i.s.v.) şiddet ve süre bakımından oldukça benzer şekilde analjezik etki ortaya çıkarmıştır (Şekil 2). İkinci olarak ise, nöronal kolin geri alım inhibitörü olan HC-3, CDP-kolin ile ortaya çıkan analjezik etkiyi her iki testte de bloke etmiştir (Şekil 4). Son olarak, termal ve mekanik pençe çekme testlerinde CDP-kolin'in analjezik etkisi seçici olmayan nikotinik kolinerjik reseptör antagonisti mekamilamin ile bloke edilmiştir (Şekil 3). Sonuç olarak, bulgularımız CDP-kolin'in i.s.v. yolla uygulanması sonrası akut ağrı modellerinde ortaya çıkardığı analjezik etkide santral kolinerjik sistem aktivasyonunun önemli bir role sahip olduğunu düşündürmektedir. Daha önce farklı deney hayvanları ve ağrı modelleri kullanılarak yapılan çalışmalarda da

çeşitli kolinomimetik ajanların merkezi ya da periferik yolla uygulanmaları sonrasında analjezik etki elde edilmiştir (60-67). Bu çalışmadan elde edilen bulgular, santral yolla uygulanan CDP-kolin'in analjezik etkisinde santral kolinerjik sistem aktivasyonunun aracılığını düşündürmesi açısından daha önce yapılan çalışmalarla uyumlu görünmektedir.

Dışarıdan verilen CDP-kolin'in, sıçanlarda hızla hidrolize uğrayarak kolin ve sitidine ayrıldığı bilinmektedir (1). CDP-kolin'in bu iki ana metabolitinin sıçanlarda birbirine benzer etkileri olduğu kadar aynı zamanda zıt etkiler ortaya çıkardığı da gösterilmiştir (27,51,112). Periferik yolla uygulanan sitidin sıçanlarda antidepresan etkilere neden olurken kolin ise prodepresan etkiler doğurmuştur (112). Ek olarak laboratuvarımızda yapılan çalışmalarda da i.s.v. yolla uygulanan sitidinin kan basıncı ve kalp hızı üzerine olan etkileri gösterilmiştir (51). Ayrıca pürinerjik sistemin analjezide önemli role sahip olduğu da bir çok çalışma ile ortaya konmuştur. (164,165). Ancak çalışmamızda CDP-kolin'in bir diğer metaboliti olan sitidin her iki akut ağrı modelinde de i.s.v. yolla uygulanmasını takiben bir miktar ağrı eşliğini yükseltse de istatistiksel olarak anlamlı bir analjezik etkiye neden olmamıştır (Şekil 2).

HC-3, kolinin kolinerjik nöronlarda presinaptik uçtan geri alınımını yüksek afiniteli transport sistemini inhibe ederek engelleyen bir ilaçtır. Bu yolla kolin ile indüklenen asetilkolin sentezindeki artış engellenmektedir (37). Çalışmamızda, CDP-kolin ile ortaya çıkan analjezik etki her iki akut ağrı modelinde de HC-3 ile bloke edilmiştir (Şekil 4). Bu bulgu, CDP-kolin'in analjezik etkisinde beyin kolin ve asetilkolin düzeylerinde artışa neden olan presinaptik kolinerjik mekanizmaların aktivasyonunun rol oynadığını göstermektedir. Daha önce yapılan çalışmalarla, dışarıdan verilen CDP-kolin'in beyin kolin ve asetilkolin düzeylerini arttırdığı gösterilmiştir (17,51). Çalışmamızdan elde ettiğimiz bulgular CDP-kolin'in analjezik etkisinde presinaptik kolinerjik mekanizmalar ve kolinerjik aktivasyonun aracılığını

göstermesi açısından daha önce yapılan bu araştırmaların sonuçları ile uyum göstermektedir.

Çalışmamızda CDP-kolin'in analjezik 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 analjezik etkisinde bir değişikliğe yol açmazken, mekamilamin ise etkiyi bloke etmiştir (Şekil 3). Bu bulgu, CDP-kolin'in akut ağrı modellerindeki analjezik etkisinde santral nikotinik reseptörlerin rol oynadığını düşündürmektedir. Deney hayvanlarında daha önce yapılan çalışmalar, çeşitli nikotinik agonistlerin uygulanmasının farklı ağrı modellerinde analjezik etkiler doğurduğunu göstermiştir (70-74,153). Ek olarak i.s.v. yolla uygulanan kolinin oluşturduğu analjezik etkide de santral nikotinik reseptörlerin rol oynadığı ortaya konmuştur (68,69). Bulgularımız, santral nikotinik reseptörlerin analjezideki rolünü gösteren çalışmalarla paralellik göstermektedir.

Yapılan çalışmalar, nikotinik reseptör agonistleri ile ortaya çıkan analjezik etkide, nikotinik reseptör alt tiplerinden nöronal yollardaki dağılımları nedeniyle özellikle $\alpha 4\beta 2$ ve $\alpha 7$ alt tiplerinin aracılığı üzerinde yoğunlaşmaktadır (76-80). CDP-kolin'in hidroliz ürünü ve asetilkolin sentezinde bir ön madde olan kolin, nöronal $\alpha 7$ nikotinik asetilkolin ($\alpha 7nACh$) reseptör alt tipine agonistik etki göstermektedir (81-83). Kolin, bu reseptörün aktivasyonu ve desensitizasyonu açısından asetilkolin ile benzer kinetik özelliklere sahiptir (166). Ayrıca, i.s.v. yolla uygulanan kolinin değişik akut ağrı modellerinde oluşturduğu analjezik etki, spesifik $\alpha 7nACh$ reseptör antagonistleri olan MLA ve α -bungarotoksin ile ortadan kaldırılırken, $\alpha 4\beta 2$ nikotinik reseptör antagonisti olan dihidrobetaeritroidin ($Dh\beta E$) etkiyi değiştirmemiş; böylece etkide özellikle $\alpha 7nACh$ reseptörlerinin rol oynadığı vurgulanmıştır (68,69). Çalışmamızda da, etkide rol oynayan nikotinik kolinerjik reseptör alt tiplerini belirlemek amacıyla $\alpha 7nACh$ reseptör antagonisti olan MLA kullanılmıştır. MLA ön tedavisi hem termal hem de

mekanik pençe çekme testinde CDP-kolin ile ortaya çıkan analjezik etkiyi anlamlı şekilde bloke etmiştir (Şekil 3). Bu bulgu, CDP-kolinin hidroliz ürünü olan kolinin, $\alpha 7nACh$ reseptör agonisti olarak CDP-kolin'in analjezik etkisine aracılık ettiğini düşündürmektedir. Ancak i.s.v. yolla uygulanan CDP-kolin'in analjezik etkisinin HC-3 ile tam olarak bloke edilmiş olması, kolinin nikotinik reseptörleri direkt postsinaptik olarak aktive etmesinden çok, asetilkolin sentez ve saliverilmesini artıran presinaptik mekanizmalarla etkiye aracılık ettiğini düşündürmektedir.

Santral nikotinik kolinerjik reseptörlerin analjezik etkilerdeki aracılığını ortaya koyan birçok çalışmanın yanında, santral muskarinik reseptörlerin de analjezide rol oynadığını gösteren çalışmalar mevcuttur. Muskarinik reseptör agonisti olan oksotremorin, sıçanlara i.s.v. yolla uygulandığında akut ağrı modellerinde analjezik etkiye neden olmuştur (144). Kolinin i.s.v. yolla uygulanmasını takiben ortaya çıkan analjezik etkide santral muskarinik reseptörlerin de aracılığı ortaya konmuştur (68,69). Ayrıca laboratuvarımızda da CDP-kolin'in santral yolla uygulanmasını takiben nikotinik reseptör aracılı etkileri yanında muskarinik etkileri de gösterilmiştir (51,58). Ancak çalışmamızda, seçici olmayan muskarinik reseptör antagonisti atropinin, CDP-kolin'in analjezik etkisini değiştirmemiş olması etkide santral muskarinik reseptörlerin rol oynamadığını göstermektedir (Şekil 3).

Sonuç olarak, presinaptik kolinerjik mekanizmaların aktivasyonu ile $\alpha 7nACh$ reseptörleri başta olmak üzere, santral nikotinik kolinerjik reseptörlerin aktivasyonu, i.s.v. yolla enjekte edilen CDP-kolin'in akut ağrı modellerinde oluşturduğu analjezik etkiye aracılık etmektedir.

Çalışmamızda ayrıca, santral yolla uygulanan CDP-kolin'in analjezik etkisinde kolinerjik sistem aktivasyonuna ek olarak başka hangi supraspinal nörotransmitter sistemlerinin rolü olabileceği de incelenmiştir. Bu amaçla ağrının modülasyonunda önemli yeri olan supraspinal opioidergik, GABAergik,

α -adrenerjik ve serotonerjik sistemlerin i.s.v. yolla uygulanan CDP-kolin'in akut ağrı modellerinde ortaya çıkardığı analjezik etkideki rolleri araştırılmıştır.

Seçici olmayan opioid reseptör antagonisti nalokson, i.s.v. yolla enjekte edilen CDP-kolin'in analjezik etkisini, termal ve mekanik pençe çekme testinde bloke etmiştir (Şekil 5). Bu bulgu, supraspinal opioid reseptörlerin aktivasyonunun akut ağrı modellerinde CDP-kolin ile ortaya çıkan analjezik etkide rol oynadığını göstermektedir. Vücudun önemli endojen analjezik sistemlerinden biri olan opioid sistem, çeşitli seviyelerde ağrı modülasyonunda rol oynamaktadır. Supraspinal düzeyde μ , δ ve κ reseptörlerinin varlığı korteks, talamus ve beyin sapı gibi ağrı iletiminde önemli rolü olan bölgelerde gösterilmiştir (167). Morfin, i.s.v. yolla uygulandığında ve beyin sapında ağrı modülasyonunda önemli rolü olan periaquaduktal gri madde (PAG) ve rostroventral medulla (RVM) gibi alanlara enjekte edildiğinde analjeziye neden olmuştur (168-170).

Ağrının modülasyonunda, opioid sistem ve kolinerjik sistem birçok yönden birbiri ile ilişki içinde bulunmaktadır (143,171,172). Nikotin kolinerjik mekanizmalar aracılığı ile morfinin analjezik etkisini artırdığı ve nikotin analjezik etkisinde santral kolinerjik ve opioid reseptörlerinin rol oynadığı ortaya konulmuştur (173,174). Opioid uygulaması sonrası beyin omurilik sıvısında asetilkolin konsantrasyonlarının arttığı gösterilmiş (175) ve sıçanlarda akut ağrı modelinde morfin ile fizostigmin kombinasyonu artmış analjezik etkiye neden olmuştur (176). Ayrıca çeşitli beyin bölgelerinde nikotinik kolinerjik reseptörler ve μ -opioid reseptörleri birlikte yerleşim göstermekte ve ağrı iletiminin kontrolünde beraber rol oynamaktadırlar (177).

CDP-kolin'in analjezik etkisinde supraspinal opioid reseptörlerin rolünü destekleyen bu çalışmaların tersine bazı çalışmalar da nikotinik agonistler ile ortaya çıkan analjezik etkilerde supraspinal opioid reseptörlerin rolü olmadığını vurgulamaktadırlar (153,178). Ayrıca farelerde i.s.v. yolla uygulanan kolinin oluşturduğu analjezik etkide de supraspinal opioid

reseptörlerinin rolü gösterilememiştir (69). Bu çalışmalar ile bulgularımız arasındaki uyumsuzluk uygulanan deneysel ağrı modeline, hayvan türüne ve kullanılan antagonisten dozuna bağlı olabilir. Sonuç olarak bulgularımız, nikotinic kolinerjik mekanizmalar ile oluşan analjezik etkide supraspinal opioid reseptörlerin rolü olabileceğini düşündürmektedir.

GABA, beynin ana inhibitör nörotransmitteridir ve GABAerjik nöronlar santral sinir sisteminde geniş bir alanda yayılım göstermektedirler (179). GABAerjik sistem de opioid sistemine benzer şekilde, spinal düzeyde olduğu kadar supraspinal düzeyde de ağrı inhibisyonunda önemli rol oynamaktadır. Dolayısıyla GABAerjik sistem, analjezikleri de içeren birçok yeni farmakolojik ajanın hedefi haline gelmiştir (180,181). Çalışmamızda, GABA_B antagonisti CGP-35348 i.s.v. yolla enjekte edildiğinde, CDP-kolin'in analjezik etkisini her iki akut ağrı modelinde de bloke etmiştir (Şekil 6). Bu durum supraspinal GABAerjik sistemin, CDP-kolin ile ortaya çıkan analjezik etkideki aracılığını ortaya koymaktadır.

Yapılan çalışmalarda, GABAerjik nöronlar üzerinde $\alpha 7$ nACh reseptörlerinin varlığı gösterilmiş ve bu reseptörlerin uyarılmasının GABA salıverilmesini artırdığı ortaya konulmuştur (182-184). Ayrıca, asetilkolin ve aynı zamanda metaboliti olan kolinin, $\alpha 7$ nACh reseptörleri üzerinden GABAerjik iletiyi artırdığı gösterilmiştir (185). Çalışmamızın sonuçları, daha önce yapılan bu araştırmalarda elde edilen sonuçlarla uyumlu olup, CDP-kolin'in akut ağrı modellerindeki analjezik etkisinde supraspinal GABAerjik ve kolinerjik sistem arasındaki ilişkiyi ortaya koymaktadır.

Monoaminler, ağrı modülasyonunda santral sinir sisteminde çeşitli seviyelerde rol oynamakta ve bu yönde değişik sistemlerle ilişki içinde bulunmaktadır (143,186). Ağrı modülasyonunda önemli supraspinal bölgelerde çeşitli adrenerjik ve serotonerjik reseptörlerin varlığı gösterilmiş ve bu reseptörlerin aktivasyonu değişik ağrı modellerinde analjezik etki ortaya çıkarmıştır (143,187-189). Ayrıca, beyinde presinaptik yerleşimli nikotinic

asetilkolin reseptörleri noradrenalin ve serotoninini de içeren çeşitli nörotransmitterlerin saliverilmesinde rol oynamaktadır. Yapılan çalışmalar değişik nikotinic kolinerjik reseptör agonistlerinin beyinde noradrenalin ve serotonin saliverilmesinde artışa neden olduğunu ortaya koymuştur (190-193). Bununla birlikte sıçan dorsal rafe çekirdeğindeki serotonerjik nöronlarda ve lokus seruleusdaki noradrenerjik nöronlarda $\alpha 7nACh$ reseptör ekspresyonu da gösterilmiştir (190,194). Bu bilgilerin ışığında biz de çalışmamızda i.s.v. yolla enjekte edilen CDP-kolin'in akut ağrı modellerinde ortaya çıkardığı analjezik etkide supraspinal α -adrenerjik ve serotonerjik reseptörlerin rolünü araştırdık. Bu amaçla, i.s.v. yolla uygulanan α -1 adrenerjik reseptör antagonisti prazosin, α -2 adrenerjik reseptör antagonisti yohimbin ve selektif olmayan serotonerjik reseptör antagonisti metiserjid, CDP-kolin'in analjezik etkisinde herhangi bir değişikliğe yol açmadı (Şekil 7 ve 8). Bu sonuçlar, CDP-kolin'in akut ağrı modellerindeki analjezik etkisinde supraspinal α -adrenerjik ve serotonerjik reseptörlerin rolü olmadığını göstermektedir. Nitekim, bir nikotinic agonist olan A-85380'in i.s.v. yolla enjekte edilmesi sonucunda oluşan analjezik etkide dorsal rafe çekirdeğinde $\alpha 7nACh$ reseptörlerinin aracılığı gösterilemezken, etkide çoğunlukla $\alpha 4$ alt tipinin rolü üzerinde durulmuştur (195).

Sonuç olarak, bu çalışmada i.s.v. yolla uygulanan CDP-kolin'in sıçanlarda akut ağrı modellerinde analjezik etki meydana getirdiği gösterilmiştir. CDP-kolin'in analjezik etkisine presinaptik kolinerjik mekanizmalar ile birlikte başlıca nöronal $\alpha 7nACh$ reseptörleri aracılık etmektedir. Ayrıca, supraspinal GABAerjik ve opioiderjik mekanizmaların CDP-kolin'in analjezik etkisinde rolü bulunmaktadır. CDP-kolin, sıçanlarda motor fonksiyonlar üzerine olumsuz bir etki oluşturmamıştır.

Bilindiği gibi, CDP-kolin halen günümüzde birçok ülkede başta serebral iskemi ve stroke olmak üzere çeşitli nörolojik hastalıkların tedavisinde başarı ile kullanılmaktadır. Bu tez çalışması ile ilk kez, CDP-

kolin'in analjezik etkisi de olduğu gösterilmiştir ve bu konuda bundan sonra yapılacak çalışmalar klinik ağrı tedavisi ile ilgili araştırmalara ışık tutacaktır.

KAYNAKLAR

- 1- Weiss GB (1995) Metabolism and actions of CDP-choline as an endogenous compound and administered exogenously as citicoline. *Life Sci.*, 56:637-660
- 2- Caamano J, Gomez MJ, Franco A, Cacabelos R (1994) Effects of CDP-choline on cognition and cerebral hemodynamics in patients with Alzheimer's disease. *Methods Find Exp Clin Pharmacol.*, 16(3):211-8
- 3- Cacabelos R, Caamano J, Gomez MJ, Fernandez-Novoa L, Franco-Maside A, Alvarez XA (1996) Therapeutic effects of CDP-choline in Alzheimer's disease. Cognition, brain mapping, cerebrovascular hemodynamics, and immune factors. *Ann N Y Acad Sci.*, 777:399-403
- 4- Cacabelos R, Alvarez A, Fenandez-Novoa L, Lombardi VR (2000) A pharmacogenomic approach to Alzheimer's disease. *Acta Neurol Scand.*, 176:12-9
- 5- Franco-Maside A, Caamano J, Gomez MJ, Cacabelos R (1994) Brain mapping activity and mental performance after chronic treatment with CDP-choline in Alzheimer's disease. *Methods Find Exp Clin Pharmacol.*, 16(8):597-607
- 6- Amenta F, Parnetti L, Gallai V, Wallin A (2001) Treatment of cognitive dysfunction associated with Alzheimer's disease with cholinergic precursors. Ineffective treatments or inappropriate approaches? *Mech Ageing Dev.*, 122(16):2025-40
- 7- Kakihana M, Fukuda N, Suno M, Nagaoka A (1988) Effects of CDP-choline on neurologic deficits and cerebral glucose metabolism in a rat model of cerebral ischemia. *Stroke*, 19(2):217-22

- 8- Yamamoto M, Shimizu M, Okamiya H (1990) Pharmacological actions of a new TRH analogue, YM-14673, in rats subjected to cerebral ischemia and anoxia. *Eur J Pharmacol.*, 181(3):207-14
- 9- Hamdorf G, Cervos-Navarro J (1990) Study of the effects of oral administration of CDP-choline on open-field behaviour under conditions of chronic hypoxia. *Arzneimittelforschung*, 40(5):519-22
- 10- Hamdorf G, Cervos-Navarro J, Muller R (1992) Increase of survival time in experimental hypoxia by cytidine diphosphate choline. *Arzneimittelforschung*, 42(4):421-4.
- 11- Davalos A, Castillo J, Alvarez-Sabin J, Secades JJ, Mercadal J, Lopez S, Cobo E, Warach S, Sherman D, Clark WM, Lozano R (2002) Oral citicoline in acute ischemic stroke: an individual patient data pooling analysis of clinical trials. *Stroke*, 33(12):2850-7.
- 12- Clark WM, Warach SJ, Pettigrew LC, Gammans RE, Sabounjian LA (1997) A randomized dose-response trial of citicoline in acute ischemic stroke patients. Citicoline Stroke Study Group. *Neurology*, 49(3):671-8
- 13- D'Orlando KJ, Sandage BW Jr. (1995) Citicoline (CDP-choline): mechanisms of action and effects in ischemic brain injury. *Neurol Res.*, 17(4):281-4.
- 14- Tazaki Y, Sakai F, Otomo E, Kutsuzawa T, Kameyama M, Omae T, Fujishima M, Sakuma A (1988) Treatment of acute cerebral infarction with a choline precursor in a multicenter double-blind placebo-controlled study. *Stroke*, 19(2):211-6
- 15- Centrone G, Ragno G, Calicchio G (1986) Use of citicoline in high dosages in acute cerebrovascular disease. *Minerva Med.*, 77(11):371-3

- 16- Warach S, Pettigrew LC, Dashe JF, Pullicino P, Lefkowitz DM, Sabounjian L, Harnett K, Schwiderski U, Gammans R (2000) Effect of citicoline on ischemic lesions as measured by diffusion-weighted magnetic resonance imaging. Citicoline 010 Investigators. *Ann Neurol.*, 48(5):713-22
- 17- Dixon CE, Ma X, Marion DW (1997) Effects of CDP-choline treatment on neurobehavioral deficits after TBI and on hippocampal and neocortical acetylcholine release. *J Neurotrauma*, 14(3):161-9.
- 18- Baskaya MK, Dogan A, Rao AM, Dempsey RJ (2000) Neuroprotective effects of citicoline on brain edema and blood-brain barrier breakdown after traumatic brain injury. *J Neurosurg.*, 92(3):448-52
- 19- Calatayud Maldonado V, Calatayud Perez JB, Aso Escario J (1991) Effects of CDP-choline on the recovery of patients with head injury. *J Neurol Sci.*, 103 Suppl:S15-8
- 20- Leon-Carrion J, Dominguez-Roldan JM, Murillo-Cabezas F, del Rosario Dominguez-Morales M, Munoz-Sanchez MA (2000) The role of citicholine in neuropsychological training after traumatic brain injury. *NeuroRehabilitation*, 14(1):33-40
- 21- Agut J, Ortiz JA (1991) Age-related changes in memory and their pharmacologic modulation. *Ann N Y Acad Sci.*, 640:295-7
- 22- Petkov VD, Kehayov RA, Mosharrof AH, Petkov VV, Getova D, Lazarova MB, Vaglenova J (1993) Effects of cytidine diphosphate choline on rats with memory deficits. *Arzneimittelforschung*, 43(8):822-8

- 23- Bruhwyler J, Liegeois JF, Geczy J (1998) Facilitatory effects of chronically administered citicoline on learning and memory processes in the dog. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 22(1):115-28
- 24- Teather LA, Wurtman RJ. (2003) Dietary cytidine (5')-diphosphocholine supplementation protects against development of memory deficits in aging rats. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 27(4):711-7
- 25- Spiers PA, Myers D, Hochanadel GS, Lieberman HR, Wurtman RJ (1996) Citicoline improves verbal memory in aging. *Arch Neurol.*, 53(5):441-8
- 26- Lopez-Coviella I, Agut J, Savci V, Ortiz JA, Wurtman RJ (1995) Evidence that 5'-cytidinediphosphocholine can affect brain phospholipid composition by increasing choline and cytidine plasma levels. *J. Neurochem.*, 65:889-894
- 27- Savci V, Goktalay G, Cansev M, Cavun S, Yilmaz MS, Ulus IH (2003) 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
- 28- Wurtman RJ, Regan M, Ulus IH, Yu L (2000) Effect of oral CDP-choline on plasma choline and uridine levels in humans. *Biochem. Pharmacol.*, 60:989-992
- 29- Blusztajn JK (1998) Choline, a vital amine. *Science*, 281(5378):794-5
- 30- Cohen EL, Wurtman RJ (1975) Brain acetylcholine: increase after systemic choline administration. *Life Sci.*, 16(7):1095-102

- 31- Cohen EL, Wurtman RJ (1976) Brain acetylcholine: control by dietary choline. *Science*, 191(4227):561-2
- 32- Hirsch MJ, Wurtman RJ (1978) Lecithin consumption increases acetylcholine concentrations in rat brain and adrenal gland. *Science*, 202(4364):223-5
- 33- Köppen A, Klein J, Holler T, Löffelholz K (1993) Synergistic effect of nicotinamide and choline administration on extracellular choline levels in the brain. *J Pharmacol Exp Ther.*, 266(2):720-5
- 34- Haubrich DR, Wang PF, Clody DE, Wedeking PW (1975) Increase in rat brain acetylcholine induced by choline or deanol. *Life Sci.*, 17(6):975-80
- 35- Buyukuysal RL, Ulus IH, Aydin S, Kiran BK (1995) 3,4-Diaminopyridine and choline increase in vivo acetylcholine release in rat striatum. *Eur J Pharmacol.*, 281(2):179-185
- 36- Maire JC, Wurtman RJ (1985) Effects of electrical stimulation and choline availability on the release and contents of acetylcholine and choline in superfused slices from rat striatum. *J Physiol. (Paris)*, 80(3):189-95
- 37- Koshimura K, Miwa S, Lee K, Hayashi Y, Hasegawa H, Hamahata K, Fujiwara M, Kimura M, Itokowa Y (1990) Effects of choline administration on in vivo release and biosynthesis of acetylcholine in the rat striatum as studied by in vivo brain microdialysis. *J Neurochem.*, 54(2):533-9
- 38- Marshall DL, Wurtman RJ (1993) Effect of choline on basal and stimulated acetylcholine release: an in vivo microdialysis study using a low neostigmine concentration. *Brain Res.*, 629 (2):269-274

- 39- Koppen A, Klein J, Erb C, Loffelholz K (1997) Acetylcholine release and choline availability in rat hippocampus: effects of exogenous choline and nicotinamide. *J Pharmacol Exp Ther.*, 282(3):1139-1145
- 40- Ulus IH, Hirsch MJ, Wurtman RJ (1977) Trans-synaptic induction of adrenomedullary tyrosine hydroxylase activity by choline: evidence that choline administration can increase cholinergic transmission. *Proc Natl Acad Sci USA*, 74(2):798-800
- 41- Scally MC, Ulus IH, Wurtman RJ (1978) Choline administration to the rat increases urinary catecholamines. *J Neural Transm.*, 43(2):103-112
- 42- Arslan BY, Ulus IH, Savci V, Kiran BK (1991) Effects of intracerebroventricular injected choline on cardiovascular functions and sympathoadrenal activity. *J Cardiovasc Pharmacol.*, 17(5):814-21
- 43- Ulus IH, Arslan BY, Savci V, Kiran BK (1995) Restoration of blood pressure by choline treatment in rats made hypotensive by haemorrhage. *Br J Pharmacol.*, 116(2):1911-7
- 44- Savci V, Gurun S, Ulus IH, Kiran BK (1996) Intracerebroventricular injection of choline increases plasma oxytocin levels in conscious rats. *Brain Res.*, 709(1):97-102
- 45- Savci V, Gurun MS, Ulus IH, Kiran BK (1996) Effect of intracerebroventricularly injected choline on plasma ACTH and beta-endorphin levels in conscious rats. *Eur J Pharmacol.*, 309(3):275-280
- 46- Savci V, Ulus IH (1996) Central choline reverses hypotension caused by alpha-adrenoceptor or ganglion blockade in rats: the role of vasopressin. *Eur J Pharmacol.*, 311:153-161

- 47- Gurun MS, Savci V, Ulus IH (1997) Intracerebroventricular choline reverses hypotension induced by acute chemical sympathectomy. *J Auton Pharmacol.*, 17(3):155-63
- 48- Gurun MS, Savci V, Ulus IH, Kiran BK (1997) Centrally administered choline increases plasma prolactin levels in conscious rats. *Neurosci Lett.*, 232(2):79-82
- 49- Savci V, Ulus IH (1997) Cardiovascular effects of central choline during endotoxin shock in the rat. *J Cardiovasc Pharmacol.*, 30(5):667-75
- 50- Savci V, Ulus IH (1998) Choline administration reverses hypotension in spinal cord transected rats: the involvement of vasopressin. *Neurochem Res.*, 23(5):733-41
- 51- Savci V, Cavun S, Goktalay G, Ulus IH (2002) 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
- 52- Savci V, Goktalay G, Ulus IH (2002) Intracerebroventricular choline increases plasma vasopressin and augments plasma vasopressin response to osmotic stimulation and hemorrhage. *Brain Res.*, 942(1-2):58-70
- 53- Gurun MS, Ilcol YO, Taga Y, Ulus IH (2002) Hyperglycemia induced by intracerebroventricular choline: involvement of the sympatho-adrenal system. *Eur J Pharmacol.*, 438(3):197-205
- 54- Gurun MS, Millington WR, Ulus IH (2003) Choline potentiates the pressor response evoked by glycyl-glutamine or naloxone in haemorrhaged rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol.*, 30(9):640-2

- 55- Ilcol YO, Gurun MS, Taga Y, Ulus IH (2002) Intraperitoneal administration of choline increases serum glucose in rat: involvement of the sympathoadrenal system. *Horm Metab Res.*, 34(6):341-7
- 56- Ilcol YO, Gurun MS, Taga Y, Ulus IH (2003) Choline increases serum insulin in rat when injected intraperitoneally and augments basal and stimulated acetylcholine release from the rat minced pancreas in vitro. *Eur J Biochem.*, 270(5):991-9
- 57- Cavun S, Savci V, Ulus IH (2004) Centrally injected CDP-choline increases plasma vasopressin levels by central cholinergic activation. *Fundam Clin Pharmacol.*, 18(1):71-77
- 58- Cavun S, Savci V (2004) 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
- 59- Yilmaz MS, Yalcin M, Savci V (2006) Cytidine 5'-diphosphocholine restores blood flow of superior mesenteric and renal arteries and prolongs survival time in haemorrhaged anaesthetized rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol.*, 33(5-6):415-20
- 60- Pedigo NW, Dewey WL, Harris LS (1975) Determination and characterization of the antinociceptive activity of intraventricularly administered acetylcholine in mice. *J Pharmacol Exp Ther.*, 193(3):845-52
- 61- Yaksh TL, Dirksen R, Harty GJ (1985) Antinociceptive effects of intrathecally injected cholinomimetic drugs in the rat and cat. *Eur J Pharmacol.*, 117(1):81-8

- 62- Yaksh TL, Grafe MR, Malkmus S, Rathbun ML, Eisenach JC (1995) Studies on the safety of chronically administered intrathecal neostigmine methylsulfate in rats and dogs. *Anesthesiology*, 82(2):412-27
- 63- Hendershot LC, Forsaith J (1959) Antagonism of the frequency of phenylquinone-induced writhing in the mouse by weak analgesics and nonanalgesics. *J Pharmacol Exp Ther.*, 125(3):237-40
- 64- Ireson JD (1970) A comparison of the antinociceptive actions of cholinomimetic and morphine-like drugs. *Br J Pharmacol.*, 40(1):92-101
- 65- Bartolini A, Ghelardini C, Fantetti L, Malcangio M, Malmberg-Aiello P, Giotti A (1992) Role of muscarinic receptor subtypes in central antinociception. *Br J Pharmacol.*, 105(1):77-82
- 66- Gurun MS, Leinbach R, Moore L, Lee CS, Owen MD, Eisenach JC (1997) Studies on the safety of glucose and paraben-containing neostigmine for intrathecal administration. *Anesth Analg.*, 85(2):317-23
- 67- Eisenach JC (1999) Muscarinic-mediated analgesia. *Life Sci.*, 64(6-7):549-54
- 68- Damaj MI, Meyer EM, Martin BR (2000) The antinociceptive effects of alpha7 nicotinic agonists in an acute pain model. *Neuropharmacology*, 39(13):2785-91
- 69- Wang Y, Su DM, Wang RH, Liu Y, Wang H (2005) Antinociceptive effects of choline against acute and inflammatory pain. *Neuroscience*, 132(1):49-56

- 70- Damaj MI, Fei-Yin M, Dukat M, Glassco W, Glennon RA, Martin BR (1998) Antinociceptive responses to nicotinic acetylcholine receptor ligands after systemic and intrathecal administration in mice. *J Pharmacol Exp Ther.*, 284(3):1058-65
- 71- Badio B, Daly JW (1994) Epibatidine, a potent analgetic and nicotinic agonist. *Mol Pharmacol.*, 45(4):563-9
- 72- Flores CM (2000) The promise and pitfalls of a nicotinic cholinergic approach to pain management. *Pain*, 88(1):1-6
- 73- Decker MW, Meyer MD (1999) Therapeutic potential of neuronal nicotinic acetylcholine receptor agonists as novel analgesics. *Biochem Pharmacol.*, 58(6):917-23
- 74- Decker MW, Rueter LE, Bitner RS (2004) Nicotinic acetylcholine receptor agonists: a potential new class of analgesics. *Curr Top Med Chem.*, 4(3):369-84
- 75- Bannon AW, Decker MW, Curzon P, Buckley MJ, Kim DJ, Radek RJ, Lynch JK, Wasicak JT, Lin NH, Arnold WH, Holladay MW, Williams M, Arneric SP (1998) ABT-594 [(R)-5-(2-azetidylmethoxy)-2-chloropyridine]: a novel, orally effective antinociceptive agent acting via neuronal nicotinic acetylcholine receptors: II. In vivo characterization. *J Pharmacol Exp Ther.*, 285(2):787-94.
- 76- Gillberg PG, Aquilonius SM (1985) Cholinergic, opioid and glycine receptor binding sites localized in human spinal cord by in vitro autoradiography. Changes in amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neurol Scand.*, 72(3):299-306.

- 77- Khan IM, Yaksh TL, Taylor P (1994) Ligand specificity of nicotinic acetylcholine receptors in rat spinal cord: studies with nicotine and cytisine. *J Pharmacol Exp Ther.*, 270(1):159-66
- 78- Marks MJ, Pauly JR, Gross SD, Deneris ES, Hermans-Borgmeyer I, Heinemann SF, Collins AC (1992) Nicotine binding and nicotinic receptor subunit RNA after chronic nicotine treatment. *J Neurosci.*, 12(7):2765-84
- 79- Séguéla P, Wadiche J, Dineley-Miller K, Dani JA, Patrick JW (1993) Molecular cloning, functional properties, and distribution of rat brain alpha 7: a nicotinic cation channel highly permeable to calcium. *J Neurosci.*, 13(2):596-604
- 80- Wada E, Wada K, Boulter J, Deneris E, Heinemann S, Patrick J, Swanson LW (1989) Distribution of alpha 2, alpha 3, alpha 4, and beta 2 neuronal nicotinic receptor subunit mRNAs in the central nervous system: a hybridization histochemical study in the rat. *J Comp Neurol.*, 284(2):314-35
- 81- Papke RL, Bencherif M, Lippiello P (1996) An evaluation of neuronal nicotinic acetylcholine receptor activation by quaternary nitrogen compounds indicates that choline is selective for the alpha 7 subtype. *Neurosci Lett.*, 213(3):201-4
- 82- Alkondon M, Pereira EF, Cortes WS, Maelicke A, Albuquerque EX (1997) Choline is a selective agonist of alpha7 nicotinic acetylcholine receptors in the rat brain neurons. *Eur J Neurosci.*, 9(12):2734-42

- 83- Alkondon M, Pereira EF, Albuquerque EX (1998) alpha-bungarotoxin- and methyllycaconitine-sensitive nicotinic receptors mediate fast synaptic transmission in interneurons of rat hippocampal slices. *Brain Res.*, 810(1-2):257-63
- 84- Lakher MB, Wurtman RJ (1987) Molecular composition of the phosphatidylcholines produced by the phospholipid methylation pathway in rat brain in vivo. *Biochem J.*, 244(2):325-30
- 85- Kennedy EP, Weiss SB (1956) The function of cytidine coenzymes in the biosynthesis of phospholipides. *J Biol Chem.*, 222(1):193-214
- 86- Sundler R, Akesson B (1975) Biosynthesis of phosphatidylethanolamines and phosphatidylcholines from ethanolamine and choline in rat liver. *Biochem J.*, 146(2):309-15
- 87- Toback FG (1984) Phosphatidylcholine metabolism during renal growth and regeneration. *Am J Physiol.*, 246 (3 Pt 2):F249-F259
- 88- Tokmakjian S, Haines DS, Possmayer F (1981) Pulmonary phosphatidylcholine biosynthesis. Alterations in the pool sizes of choline and choline derivatives in rabbit fetal lung during development. *Biochim Biophys Acta*, 663 (2):557-568
- 89- Van Heusden GP, Vanden Bosch H (1982) Utilization of disaturated and unsaturated phosphatidylcholine and diacylglycerols by cholinephosphotransferase in rat lung microsomes. *Biochim. Biophys. Acta*, 711 (2):361-368
- 90- Wientzek M, Man RY, Choy PC (1987) Choline glycerophospholipid biosynthesis in the guinea pig heart. *Biochem. Cell Biol.*, 65 (10):860-868

- 91- Miller BE, Hook GE (1989) Regulation of phosphatidylcholine biosynthesis in activated alveolar type II cells. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, 1 (2):127-136
- 92- Savci V, Wurtman RJ (1995) Effect of cytidine on membrane phospholipid synthesis in rat striatal slices. *J Neurochem.*, 64(1):378-84
- 93- Haines DS, Tokmakjian SD (1987) Actions of dietary orotic acid on liver synthesis of phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine in rats. *Biochem Cell Biol.*, 65(2):105-11
- 94- G-Coviella IL, Wurtman RJ (1992) Enhancement by cytidine of membrane phospholipid synthesis. *J Neurochem.*, 59(1):338-43
- 95- Yashima K, Takamatsu M, Okuda K (1975) Intestinal absorption of cytidine diphosphate choline and its changes in the digestive tract. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)*, 21(1):49-60
- 96- Paroni R, Cighetti G, Del Puppo M, Kienle MG (1985) Evidence for a different metabolic behaviour of cytidine diphosphate choline after oral and intravenous administration to rats. *Pharmacol Res Commun.*, 17(9):805-829
- 97- Dinsdale JR, Griffiths GK, Rowlands C, Castello J, Ortiz JA, Maddock J, Aylward M (1983) Pharmacokinetics of ¹⁴C CDP-choline. *Arzneimittelforschung*, 33(7A):1066-1070
- 98- Galletti P, De Rosa M, Cotticelli MG, Morana A, Vaccaro R, Zappia V (1991) Biochemical rationale for the use of CDPcholine in traumatic brain injury: pharmacokinetics of the orally administered drug. *J Neurol Sci.*, 103 Suppl:S19-25

- 99- Fresta M, Wehrli E, Puglisi G (1995) 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
- 100-Fresta M, Puglisi G (1997) Survival rate improvement in a rat ischemia model by long circulating liposomes containing cytidine-5'-diphosphate choline. *Life Sci.*, 61(13):1227-1235
- 101-Romero A, Serratosa J, Sacristan A, Ortiz JA (1983) High-resolution autoradiography in mouse brain 24 h after radiolabelled CDP-choline administration. *Arzneimittelforschung*, 33(7A):1056-8
- 102-Romero A, Serratosa J, Sacristan A, Ortiz JA (1983) High-resolution autoradiography in mouse brain and cerebellum 10 days after radiolabelled CDP-choline administration. *Arzneimittelforschung*, 33(7A):1058-60
- 103-Zeisel SH (1997) Choline: essential for brain development and function. *Adv Pediatr.*, 44:263-95
- 104-Zeisel SH (2004) Nutritional importance of choline for brain development. *J Am Coll Nutr.*, 23(6 Suppl):621S-626S
- 105-Cermak JM, Holler T, Jackson DA, Blusztajn JK (1998) Prenatal availability of choline modifies development of the hippocampal cholinergic system. *FASEB J.*, 12(3):349-57
- 106-Blusztajn JK, Wurtman RJ (1983) Choline and cholinergic neurons. *Science*, 221(4611):614-620

- 107-Zeisel SH (1985) Formation of unesterified choline by rat brain. *Biochim Biophys Acta*, 835(2):331-343
- 108-Okuda T, Haga T (2000) Functional characterization of the human high-affinity choline transporter. *FEBS Lett.*, 484(2):92-7
- 109-Allen DD, Lockman PR (2003) The blood-brain barrier choline transporter as a brain drug delivery vector. *Life Sci.*, 73(13):1609-15.
- 110-Lockman PR, Allen DD (2002) The transport of choline. *Drug Dev Ind Pharm.*, 28(7):749-71
- 111-Richardson UI, Watkins CJ, Pierre C, Ulus IH, Wurtman RJ (2003) Stimulation of CDP-choline synthesis by uridine or cytidine in PC12 rat pheochromocytoma cells. *Brain Res.*, 971:161-167
- 112-Carlezon WA, Pliakas AM, Parow AM, Detke MJ, Cohen BM, Renshaw PF (2002) Antidepressant-like effects of cytidine in the forced swim test in rats. *Biol Psychiatry*, 51(11):882-9
- 113-Babb SM, Appelmans KE, Renshaw PF, Wurtman RJ, Cohen BM (1996) Differential effect of CDP-choline on brain cytosolic choline levels in younger and older subjects as measured by proton magnetic resonance spectroscopy. *Psychopharmacology*, 127(2):88-94
- 114-Arrigoni E, Averet N, Cohadon F (1987) Effects of CDP-choline on phospholipase A2 and cholinephosphotransferase activities following a cryogenic brain injury in the rabbit. *Biochem Pharmacol.*, 36(21):3697-700

- 115-Guarini S, Tagliavini S, Ferrari W, Bertolini A (1989) Reversal of haemorrhagic shock in rats by cholinomimetic drugs. *Br J Pharmacol.*, 98(1):218-24
- 116-Yılmaz MS (2005) Sıçanda Deneysel Miyokardiyal İskemi-Reperfüzyon Modelinde CDP-kolin ve Metabolitlerinin Etkileri (Uzmanlık Tezi) Bursa: Uludağ Üniversitesi
- 117-Matsuoka T, Kawanaka M, Nagai K (1978) Effect of cytidine diphosphate choline on growth hormone and prolactin secretion in man. *Endocrinol Jpn.*, 25(1):55-7
- 118-Ceda GP, Ceresini G, Denti L, Magnani D, Marchini L, Valenti G, Hoffman AR (1991) Effects of cytidine 5'-diphosphocholine administration on basal and growth hormone-releasing hormone-induced growth hormone secretion in elderly subjects. *Acta Endocrinol (Copenh).*, 124(5):516-20
- 119-Cansev M (2003) CDP-kolin'in Kardiyovasküler, Metabolik ve Nöroendokrin Etkileri (Uzmanlık Tezi) Bursa: Uludağ Üniversitesi
- 120-Romero A, Grau T, Sacristan A, Ortiz JA (1983) Study of subacute toxicity of CDP-choline after 30 days of oral administration to rats. *Arzneimittelforschung*, 33(7A):1035-8
- 121-Romero A, Grau T, Sacristan A, Ortiz JA (1983) CDP-choline: 6-month study on toxicity in dogs. *Arzneimittelforschung*, 33(7A):1038-42.
- 122-Dinsdale JR, Griffiths GK, Castello J, Maddock J, Ortiz JA, Aylward M (1983) CDP-choline: repeated oral dose tolerance studies in adult healthy volunteers. *Arzneimittelforschung*, 33(7A):1061-5

- 123-Lozano Fernandez R (1983) Efficacy and safety of oral CDP-choline. Drug surveillance study in 2817 cases. *Arzneimittelforschung*, 33(7A):1073-80
- 124-Adibhatla RM, Hatcher JF (2002) Citicoline mechanisms and clinical efficacy in cerebral ischemia. *J Neurosci Res.*, 70(2):133-9
- 125-Muralikrishna Adibhatla R, Hatcher JF (2006) Phospholipase A2, reactive oxygen species, and lipid peroxidation in cerebral ischemia. *Free Radic Biol Med.*, 40(3):376-87
- 126-Rao AM, Hatcher JF, Dempsey RJ (1999) CDP-choline: neuroprotection in transient forebrain ischemia of gerbils. *J Neurosci Res.*, 58(5):697-705
- 127-Trovarelli G, de Medio GE, Dorman RV, Piccinin GL, Horrocks LA, Porcellati G (1981) Effect of cytidine diphosphate choline (CDP-choline) on ischemia-induced alterations of brain lipid in the gerbil. *Neurochem Res.*, 6(8):821-33
- 128-Adibhatla RM, Hatcher JF, Dempsey RJ (2002) Citicoline: neuroprotective mechanisms in cerebral ischemia. *J Neurochem.*, 80(1):12-23
- 129-Adibhatla RM, Hatcher JF (2003) Citicoline decreases phospholipase A2 stimulation and hydroxyl radical generation in transient cerebral ischemia. *J Neurosci Res.*, 73(3):308-15
- 130-Adibhatla RM, Hatcher JF, Larsen EC, Chen X, Sun D, Tsao FH (2006) CDP-choline significantly restores phosphatidylcholine levels by differentially affecting phospholipase A2 and CTP: phosphocholine cytidyltransferase after stroke. *J Biol Chem.*, 281(10):6718-25

- 131-Adibhatla RM, Hatcher JF, Dempsey RJ (2004) Cytidine-5'-diphosphocholine affects CTP-phosphocholine cytidyltransferase and lyso-phosphatidylcholine after transient brain ischemia. *J Neurosci Res.*, 76(3):390-6
- 132- Alvarez XA, Mouzo R, Pichel V, Perez P, Laredo M, Fernandez-Novoa L, Corzo L, Zas R, Alcaraz M, Secades JJ, Lozano R, Cacabelos R (1999) Double-blind placebo-controlled study with citicoline in APOE genotyped Alzheimer's disease patients. Effects on cognitive performance, brain bioelectrical activity and cerebral perfusion. *Methods Find Exp Clin Pharmacol.*, 21(9):633-44
- 133-Agnoli A, Ruggieri S, Denaro A, Bruno G (1982) New strategies in the management of Parkinson's disease: a biological approach using a phospholipid precursor (CDP-choline). *Neuropsychobiology*, 8(6):289-96
- 134-Cubells JM, Hernando C (1988) Clinical trial on the use of cytidine diphosphate choline in Parkinson's disease. *Clin Ther.*, 10(6):664-71
- 135-Eberhardt R, Birbamer G, Gerstenbrand F, Rainer E, Traegner H (1990) Citicoline in the treatment of Parkinson's disease. *Clin Ther.*, 12(6):489-95
- 136-Campos EC, Schiavi C, Benedetti P, Bolzani R, Porciatti V (1995) Effect of citicoline on visual acuity in amblyopia: preliminary results. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.*, 233(5):307-12
- 137-Campos EC, Bolzani R, Schiavi C, Baldi A, Porciatti V (1996-1997) Cytidin-5'-diphosphocholine enhances the effect of part-time occlusion in amblyopia. *Doc Ophthalmol.*, 93(3):247-63

- 138- Porciatti V, Schiavi C, Benedetti P, Baldi A, Campos EC (1998) Cytidine-5'-diphosphocholine improves visual acuity, contrast sensitivity and visually-evoked potentials of amblyopic subjects. *Curr Eye Res.*, 17(2):141-8
- 139- Grieb P, Rejdak R (2002) Pharmacodynamics of citicoline relevant to the treatment of glaucoma. *J Neurosci Res.*, 67(2):143-8
- 140- Parisi V, Manni G, Colacino G, Bucci MG (1999) Cytidine-5'-diphosphocholine (citicoline) improves retinal and cortical responses in patients with glaucoma. *Ophthalmology*, 106(6):1126-34
- 141- Loeser JD, Butler SH, Chapman CR, Turk DC (eds) *Bonica's Management of Pain*, 3rd edition. Lippincott Williams & Wilkins (LWW); 2001
- 142- McMahon S, Koltzenburg M (eds) *Wall and Melzack's Textbook of Pain*, 5th edition. Churchill Livingstone; 2005
- 143- Millan MJ (2002) Descending control of pain. *Prog Neurobiol.*, 66(6):355-474
- 144- Wess J, Duttaroy A, Gomeza J, Zhang W, Yamada M, Felder CC, Bernardini N, Reeh PW (2003) Muscarinic receptor subtypes mediating central and peripheral antinociception studied with muscarinic receptor knockout mice: a review. *Life Sci.*, 72(18-19):2047-54
- 145- Naguib M, Yaksh TL (1997) Characterization of muscarinic receptor subtypes that mediate antinociception in the rat spinal cord. *Anesth Analg.*, 85(4):847-53

- 146-Iwamoto ET (1991) Characterization of the antinociception induced by nicotine in the pedunculopontine tegmental nucleus and the nucleus raphe magnus. *J Pharmacol Exp Ther.*, 257(1):120-33
- 147-Iwamoto ET, Marion L (1993) Adrenergic, serotonergic and cholinergic components of nicotinic antinociception in rats. *J Pharmacol Exp Ther.*, 265(2):777-89
- 148-Khan IM, Yaksh TL, Taylor P (1997) Epibatidine binding sites and activity in the spinal cord. *Brain Res.*, 753(2):269-82
- 149-Schmidt BL, Tambeli CH, Gear RW, Levine JD (2001) Nicotine withdrawal hyperalgesia and opioid-mediated analgesia depend on nicotine receptors in nucleus accumbens. *Neuroscience*, 106(1):129-36
- 150-Marubio LM, del Mar Arroyo-Jimenez M, Cordero-Erausquin M, Léna C, Le Novère N, de Kerchove d'Exaerde A, Huchet M, Damaj MI, Changeux JP (1999) Reduced antinociception in mice lacking neuronal nicotinic receptor subunits. *Nature*, 398(6730):805-10
- 151-Pomerleau OF (1986) Nicotine as a psychoactive drug: anxiety and pain reduction. *Psychopharmacol Bull.*, 22(3):865-9
- 152-Jamner LD, Girdler SS, Shapiro D, Jarvik ME (1998) Pain inhibition, nicotine, and gender. *Exp Clin Psychopharmacol.*, 6(1):96-106
- 153-Bannon AW, Decker MW, Holladay MW, Curzon P, Donnelly-Roberts D, Puttfarcken PS, Bitner RS, Diaz A, Dickenson AH, Porsolt RD, Williams M, Arneric SP (1998) Broad-spectrum, non-opioid analgesic activity by selective modulation of neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *Science*, 279(5347):77-81

- 154-Ghelardini C, Galeotti N, Calvani M, Mosconi L, Nicolai R, Bartolini A (2002) Acetyl-L-carnitine induces muscarinic antinociception in mice and rats. *Neuropharmacology*, 43(7):1180-7
- 155-Sibilia V, Lattuada N, Rapetti D, Pagani F, Vincenza D, Bulgarelli I, Locatelli V, Guidobono F, Netti C (2006) Ghrelin inhibits inflammatory pain in rats: involvement of the opioid system. *Neuropharmacology*, 51(3):497-505
- 156-Malcangio M, Ghelardini C, Giotti A, Malmberg-Aiello P, Bartolini A (1991) CGP 35348, a new GABAB antagonist, prevents antinociception and muscle-relaxant effect induced by baclofen. *Br J Pharmacol.*, 103(2):1303-8
- 157-Mahmoudi M, Zarrindast MR (2002) Effect of intracerebroventricular injection of GABA receptor agents on morphine-induced antinociception in the formalin test. *J Psychopharmacol.*, 16(1):85-91
- 158-Zhang C, Guo YQ, Qiao JT, Dafny N (1998) Locus coeruleus modulates thalamic nociceptive responses via adrenoceptors. *Brain Res.*, 784(1-2):116-22
- 159-Svokos K, Nalwalk JW, Leurs R, Menge WM, Timmerman H, Hough LB (2001) A role for spinal, but not supraspinal, alpha(2) adrenergic receptors in the actions of impropgan, a powerful, non-opioid analgesic. *Brain Res.*, 923(1-2):12-9
- 160-Yamazaki N, Umeno H, Kuraishi Y (1999) Involvement of brain serotonergic terminals in the antinociceptive action of peripherally applied calcitonin. *Jpn J Pharmacol.*, 81(4):367-74

- 161-Ochi T, Goto T (2000) The antinociceptive effect induced by FR140423 is mediated through spinal 5-HT_{2A} and 5-HT₃ receptors. *Eur J Pharmacol.*, 409(2):167-72
- 162-Hargreaves K, Dubner R, Brown F, Flores C, Joris J (1988) A new and sensitive method for measuring thermal nociception in cutaneous hyperalgesia. *Pain*, 32(1):77-88
- 163-Randall LO, Selitto JJ (1957) A method for measurement of analgesic activity on inflamed tissue. *Arch Int Pharmacodyn Ther.*, 111(4):409-19
- 164-Liu XJ, Salter MW (2005) Purines and pain mechanisms: recent developments. *Curr Opin Investig Drugs*, 6(1):65-75
- 165-Kennedy C (2005) P2X receptors: targets for novel analgesics? *Neuroscientist*, 11(4):345-56
- 166-Mike A, Castro NG, Albuquerque EX (2000) Choline and acetylcholine have similar kinetic properties of activation and desensitization on the alpha7 nicotinic receptors in rat hippocampal neurons. *Brain Res.*, 882(1-2):155-68
- 167-Holden JE, Jeong Y, Forrest JM (2005) The endogenous opioid system and clinical pain management. *AACN Clin Issues*, 16(3):291-301
- 168-Gogas KR, Cho HJ, Botchkina GI, Levine JD, Basbaum AI (1996) Inhibition of noxious stimulus-evoked pain behaviors and neuronal fos-like immunoreactivity in the spinal cord of the rat by supraspinal morphine. *Pain*, 65(1):9-15

- 169-Jensen TS, Yaksh TL (1986) Comparison of the antinociceptive action of mu and delta opioid receptor ligands in the periaqueductal gray matter, medial and paramedial ventral medulla in the rat as studied by the microinjection technique. *Brain Res.*, 372(2):301-12
- 170-Azami J, Llewelyn MB, Roberts MH (1982) The contribution of nucleus reticularis paragigantocellularis and nucleus raphe magnus to the analgesia produced by systemically administered morphine, investigated with the microinjection technique. *Pain*, 12(3):229-46
- 171-Abe K, Ishida K, Kato M, Shigenaga T, Taguchi K, Miyatake T (2002) Effect of morphine-induced antinociception is altered by AF64A-induced lesions on cholinergic neurons in rat nucleus raphe magnus. *Acta Pharmacol Sin.*, 23(11):961-6
- 172-Leite-Panissi CR, Brentegani MR, Menescal-de-Oliveira L (2004) Cholinergic-opioidergic interaction in the central amygdala induces antinociception in the guinea pig. *Braz J Med Biol Res.*, 37(10):1571-9
- 173-Zarrindast MR, Nami AB, Farzin D (1996) Nicotine potentiates morphine antinociception: a possible cholinergic mechanism. *Eur Neuropsychopharmacol.*, 6(2):127-33
- 174-Zarrindast MR, Pazouki M, Nassiri-Rad S (1997) Involvement of cholinergic and opioid receptor mechanisms in nicotine-induced antinociception. *Pharmacol Toxicol.*, 81(5):209-13
- 175-Bouaziz H, Tong C, Yoon Y, Hood DD, Eisenach JC (1996) 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):143-54

- 176- Beilin B, Nemirovsky AY, Zeidel A, Maibord E, Zelman V, Katz RL (1997) Systemic physostigmine increases the antinociceptive effect of spinal morphine. *Pain*, 70(2-3):217-21
- 177- Mansour A, Watson SJ, Akil H (1995) Opioid receptors: past, present and future. *Trends Neurosci.*, 18(2):69-70
- 178- Damaj MI, Glassco W, Aceto MD, Martin BR (1999) Antinociceptive and pharmacological effects of metanicotine, a selective nicotinic agonist. *J Pharmacol Exp Ther.*, 291(1):390-8
- 179- Enna SJ, McCarson KE (2006) The role of GABA in the mediation and perception of pain. *Adv Pharmacol.*, 54:1-27
- 180- Iversen L (2004) GABA pharmacology--what prospects for the future? *Biochem Pharmacol.*, 68(8):1537-40
- 181- Sawynok J, LaBella FS (1982) On the involvement of GABA in the analgesia produced by baclofen, muscimol and morphine. *Neuropharmacology*, 21(5):397-403
- 182- Yang X, Criswell HE, Breese GR (1996) Nicotine-induced inhibition in medial septum involves activation of presynaptic nicotinic cholinergic receptors on gamma-aminobutyric acid-containing neurons. *J Pharmacol Exp Ther.*, 276(2):482-9
- 183- Alkondon M, Pereira EF, Eisenberg HM, Albuquerque EX (1999) Choline and selective antagonists identify two subtypes of nicotinic acetylcholine receptors that modulate GABA release from CA1 interneurons in rat hippocampal slices. *J Neurosci.*, 19(7):2693-705

- 184-Maggi L, Sher E, Cherubini E (2001) Regulation of GABA release by nicotinic acetylcholine receptors in the neonatal rat hippocampus. *J Physiol.*, 536(Pt 1):89-100
- 185-Alkondon M, Braga MF, Pereira EF, Maelicke A, Albuquerque EX (2000) $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptors and modulation of gabaergic synaptic transmission in the hippocampus. *Eur J Pharmacol.*, 393(1-3):59-67
- 186-Pertovaara A (2006) Noradrenergic pain modulation. *Prog Neurobiol.*, 80(2):53-83.
- 187-Galeotti N, Ghelardini C, Bartolini A (1997) 5-HT_{1A} agonists induce central cholinergic antinociception. *Pharmacol Biochem Behav.*, 57(4):835-41
- 188-Guo TZ, Jiang JY, Buttermann AE, Maze M (1996) Dexmedetomidine injection into the locus ceruleus produces antinociception. *Anesthesiology*, 84(4):873-81
- 189-Haws CM, Heinricher MM, Fields HL (1990) Alpha-adrenergic receptor agonists, but not antagonists, alter the tail-flick latency when microinjected into the rostral ventromedial medulla of the lightly anesthetized rat. *Brain Res.*, 533(2):192-5
- 190-Kenny PJ, File SE, Neal MJ (2000) Evidence for a complex influence of nicotinic acetylcholine receptors on hippocampal serotonin release. *J Neurochem.*, 75(6):2409-14.

- 191-Mitchell SN, Brazell MP, Joseph MH, Alavijeh MS, Gray JA (1989) Regionally specific effects of acute and chronic nicotine on rates of catecholamine and 5-hydroxytryptamine synthesis in rat brain. *Eur J Pharmacol.*, 167(3):311-22
- 192-Reuben M, Clarke PB (2000) Nicotine-evoked [³H]5-hydroxytryptamine release from rat striatal synaptosomes. *Neuropharmacology*, 39(2):290-9
- 193-Sacaan AI, Menzaghi F, Dunlop JL, Correa LD, Whelan KT, Lloyd GK (1996) Epibatidine: a nicotinic acetylcholine receptor agonist releases monoaminergic neurotransmitters: in vitro and in vivo evidence in rats. *J Pharmacol Exp Ther.*, 276(2):509-15
- 194-Bitner RS, Nikkel AL (2002) Alpha-7 nicotinic receptor expression by two distinct cell types in the dorsal raphe nucleus and locus coeruleus of rat. *Brain Res.*, 938(1-2):45-54
- 195-Bitner RS, Nikkel AL, Curzon P, Donnelly-Roberts DL, Puttfarcken PS, Namovic M, Jacobs IC, Meyer MD, Decker MW (2000) Reduced nicotinic receptor-mediated antinociception following in vivo antisense knock-down in rat. *Brain Res.*, 871(1):66-74

TEŞEKKÜR

Eğitimim süresince bana her konuda emek harcayan ve uzmanlık tezimi hazırlamamda önemli katkıları bulunan başta tez danışmanım Prof. Dr. M. Sibel GÜRÜN olmak üzere tüm Farmakoloji ve Klinik Farmakoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerine, uzmanlık eğitimimin başlangıcından itibaren hem tecrübeleri hem de dostluklarıyla bana her zaman yol gösteren ve beraber çalışmaktan büyük mutluluk duyduğum abilerim Uzm. Dr. Gökhan GÖKTALAY, Uzm. Dr. Mehmet CANSEV ve Uzm. Dr. M. Sertaç YILMAZ'a, çalışmalarım esnasında bana her zaman yardımcı olan Dr. Murat GÜRSOY, Dr. N. Cenk COŞKUN, Dr. Nesrin FİLİZ ile diğer araştırma görevlisi arkadaşlarım Dr. Hakkı H. DOĞRU, Dr. Sinem EVCİM ve Dr. Arif K. BALCI'ya, tüm bilgisini ve dostluğunu cömertçe benimle paylaşan Kimyager Sami AYDIN'a, benden teknik bilgilerini ve yardımını esirgemeyen Biyolog Şevket DOĞRUSÖZ'e ve beraber hep büyük keyif alarak çalıştığım Vet. Dr. Deniz BAĞDAŞ'a teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca, her zaman ve her konuda yanımda olan sevgili eşim Feride'ye ve bugünlere gelebilmem için her türlü fedakarlığı yaparak bana her konuda büyük destek olan sevgili anneme, babama ve kardeşime de sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışma, Uludağ Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Destekleme Fonu tarafından desteklenmiştir (Proje No: 2003 / 37).

ÖZGEÇMİŞ

15 Ağustos 1977 tarihinde Eskişehir’de doğdum. İlkokulu Etimesgut Şeker İlkokulu’nda bitirdikten sonra ortaokul ve lise öğrenimimi Çankaya Milli Piyango Anadolu Lisesi’nde 1995 yılında tamamladım. Aynı yıl Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi’nde tıp eğitimime başladım. 2001 yılında tıp doktoru ünvanı ile mezun oldum. 2002 yılında Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Farmakoloji ve Klinik Farmakoloji Anabilim Dalı’nda uzmanlık eğitimime başladım. Eğitimim süresince çeşitli bilimsel projelerde görev aldım. Halen aynı anabilim dalında tıpta uzmanlık öğrencisi olarak eğitimime devam etmekteyim. İyi düzeyde İngilizce biliyorum. Evliyim.