



**T.C.
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI**

**AKUT VE NÖROPATİK AĞRIDA AMİGDALA'YA UYGULANAN
CDP-KOLİN'İN ANALJEZİK ETKİSİNİN TANIMLANMASI**

Dr. Hasret YÜCEL ÖZBÖLÜK

UZMANLIK TEZİ

Bursa – 2013



**T.C.
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI**

**AKUT VE NÖROPATİK AĞRIDA AMİGDALA'YA UYGULANAN
CDP-KOLİN'İN ANALJEZİK ETKİSİNİN TANIMLANMASI**

Dr. Hasret YÜCEL ÖZBÖLÜK

UZMANLIK TEZİ

Danışman: Prof. Dr. Mine Sibel GÜRÜN

Bursa – 2013

İÇİNDEKİLER

TÜRKÇE ÖZET	ii
İNGİLİZCE ÖZET	iv
GİRİŞ.....	1
GENEL BİLGİLER.....	2
1. Amigdala.....	2
2. Ağrı ve Analjezi.....	12
3. CDP-kolin'in Genel Özellikleri.....	20
GEREÇ ve YÖNTEM.....	26
1. Cerrahi ve Deneysel İşlemler.....	26
2. Deney Planı.....	29
3. CDP-kolin'in Akut Ağrı Üzerine Etkisinin Değerlendirilmesi.....	30
4. CDP-kolin'in Nöropatik Ağrı Üzerine Etkisinin Değerlendirilmesi.....	32
5. İlaçlar ve intra-CeA'a Enjeksiyon.....	32
6. İstatistiksel Değerlendirmeler.....	33
BULGULAR.....	34
TARTIŞMA ve SONUÇ.....	51
KAYNAKLAR	60
TEŞEKKÜR.....	75
ÖZGEÇMİŞ.....	76

ÖZET

Amigdala endojen ağrı kontrolü ile ilgili beyin bölgeleriyle bağlantısı nedeniyle hem emosyonel-affektif ağrı cevabı hem de ağrı modülasyonunda anahtar rol oynayan santral bir yapıdır. CDP-kolin, vücutta endojen olarak üretilen nükleotid yapısında bir bileşiktir ve laboratuvarımızda yapılan çalışmalarda santral yolla uygulandığında farklı ağrı modellerinde güçlü analjezik ve antihiperalezik etki göstermiştir. Bu tez çalışmasında da deneysel ağrı modellerinde amigdala üzerine uygulanan CDP-kolin'in analjezik ve antihiperalezik etkisi ve etkiye aracılık eden mekanizmalar değerlendirildi. Çalışmada Sprague-Dawley erkek sıçanlar kullanıldı. İlaçlar, amigdalanın santral nükleus bölgesine (CeA) 0.5 µl hacimde olacak şekilde uygulandı. Nöropatik ağrı, sıçanların sol siyatik sinirleri bağlanarak oluşturuldu. Akut ve nöropatik ağrı duyarlılığı mekanik pençe çekme testi ile ölçülerek değerlendirildi.

CDP-kolin (1 µmol), zamana bağlı olacak şekilde akut ve nöropatik ağrı modellerinde analjezik ve antihiperalezik etki meydana getirdi. CDP-kolin'in nöropatik ağrı modelindeki antihiperalezik etkisi eşmolar dozda (1 µmol) uygulanan kolin ile taklit edilirken, eşmolar dozdaki (1 µmol) sitidin ile hafif ama istatistiksel olarak anlamlı antihiperalezik etki meydana getirdi. Amigdala içine uygulanan mekamilamin (seçici olmayan nikotinik reseptör antagonisti, 3 µg), MLA (α_7 nöronal nikotinik reseptör antagonisti, 10 µg), CGP-35348 (GABA_B reseptör antagonisti, 3 µg), nalokson (seçici olmayan opioid reseptör antagonisti, 1 µg), metiserjid (seçici olmayan serotonin reseptör antagonisti, 5 µg) ve LY341495 (grup II metabotropik glutamat reseptör [mGLUR_{2/3}] antagonisti, 5 µg) ön tedavileri CDP-kolin'in nöropatik ağrı modelindeki antihiperalezik etkisini baskımlarken, atropin (seçici olmayan muskarinik reseptör antagonisti, 1 µg) ön tedavisi ise etkiyi değiştirmedii.

Elde edilen bulgulara göre sıçanlarda amigdala üzerine uygulanan CDP-kolin akut ve nöropatik ağrı modellerinde analjezik ve antihiperalezik etki

meydana getirmiştir. CDP-kolin'in antihiperalezik etkisine α_7 nikotinic kolinerjik reseptörler üzerinden kolinerjik mekanizmaların aktivasyonu ile birlikte amigdalada bulunan GABA_B, serotonerjik, opioidderjik ve mGLUR_{2/3} reseptörlerinin aracılık ettiği, bununla birlikte kolinerjik muskarinik reseptörlerin rolünün olmadığı düşünölmüştür.

Anahtar kelimeler: Amigdala, CDP-kolin, nöropatik ağrı, antihiperalezik, nikotinic reseptörler

SUMMARY

Characterization of the Analgesic Effect of CDP-choline Administered intra-Amygdala in Acute and Neuropathic Pain Models

The amygdala is a central structure that plays a critical role in both emotional-affective pain response and modulation of pain because of its interactions with brain regions related to endogenous pain control. CDP-choline is an endogenous nucleotide which was shown to elicit potent analgesic and antihyperalgesic effects via central administration in several pain models in the studies performed in our laboratory. In this study, the analgesic and antihyperalgesic effects of CDP-choline administered intra-amygdala in experimental pain models, as well as the mechanism involved in these effects were investigated.

Experiments were performed using male Sprague-Dawley rats. All drugs were administered into the central nucleus of amygdala (intra-CeA) in 0.5 μ l volume. Neuropathic pain was performed by ligation of left sciatic nerve of rats. The acute and neuropathic pain sensitivities were evaluated by mechanical paw withdrawal test.

CDP-choline (1 μ mol), exerted analgesic and antihyperalgesic effects in a time-dependent manner in acute and neuropathic pain models. Whereas the antihyperalgesic effect of CDP-choline in neuropathic pain model was replicated by equimolar dose of (1 μ mol) choline, an equimolar dose of (1 μ mol) cytidine showed light but statistically significant antihyperalgesic effect. Although mecamylamine (nonspecific nicotinic receptor antagonist, 3 μ g), methylicaconitine (selective α_7 nicotinic receptor antagonist, 10 μ g), naloxone (non-specific opioid receptor antagonist, 1 μ g), CGP-35348 (GABA_B receptor antagonist, 3 μ g), methysergide (non-specific serotonin receptor antagonist, 5 μ g) and LY341495 (metabotropic glutamate II receptor [mGLUR_{2/3}]

antagonist, 5 µg) pretreatments administered intra-amygdala suppressed the antihyperalgesic effect of CDP choline in neuropathic pain model, atropine (nonspecific muscarinic receptor antagonist, 1 µg) pretreatment did not change the effect.

These data indicate that CDP-choline administered intra-amygdala in rats exhibits analgesic and antihyperalgesic effects in acute and neuropathic pain models. Activation of cholinergic mechanisms through α_7 nicotinic cholinergic receptors as well as amygdaloid GABA_B, serotonin, opioid, mGLUR_{2/3} receptors, but not cholinergic muscarinic receptors, is likely to be involved in the antihyperalgesic effect of CDP-choline.

Key words: Amygdala, CDP-choline, neuropathic pain, antihyperalgesic, nicotinic receptors

GİRİŞ

Amigdala temporal lobun dorsomedial kısmında yerleşmiş, anatomik ve fonksiyonel açıdan farklı nükleuslardan oluşan bir santral yapıdır (1) ve limbik sistemin bir parçası olarak; korku, zevk, duygulanım, duysal uyarının duygusal değerlendirilmesi, duygusal öğrenme ve hafıza ve affektif hastalıklarda (anksiyete, depresyon vd) kilit rol oynamaktadır (2-4). Çalışmalar, amigdalanın, çok boyutlu bir deneyim olan ağrının emosyonel-affektif boyutunda önemli rolü olduğunu güçlü bir şekilde desteklemektedir ve bu nedenle amigdala, ağrı ve duygudurum arasındaki ilişkide kritik role sahip nöral bir yapı olarak kabul edilmektedir. Amigdala'nın santral nükleusu (CeA) ise özellikle nosisepsiyon, korku, anksiyete, dikkat, biliş, otonomik fonksiyon, endojen ağrı kontrolü ile ilgili beyin alanları ve sistemleriyle bağlantısı nedeniyle hem emosyonel-affektif ağrı cevabı hem de ağrı modülasyonunda anahtar rol oynamaktadır (5).

Nöropatik ağrı, sinir sisteminin herhangi bir bölümünün hasarı ve/veya disfonksiyonundan kaynaklanmaktadır. Spontan yanma, hiperaljezi, allodini ile karakterize, sıklıkla depresyon ve/veya anksiyetenin de eşlik ettiği klinik bir durumdur ve günümüzde halen ideal ve güvenli bir analjezik tedavi yaklaşımı geliştirilememiştir. Bu nedenlerle nöropatik ağrı tedavisi için yeni, güvenli ve etkin analjezik ilaçların geliştirilmesine gereksinim bulunmaktadır (6-7).

Kolinerjik sistemin ağrı regülasyonundaki rolleri uzun bir zamandan beri bilinmektedir. Özellikle son yıllarda nikotinik asetilkolin reseptör subtiplerinin (nAChR) tanımlanması ile bu reseptörlere karşı geliştirilen spesifik agonistlerin hem antidepresan hem de analjezik etkilerinin olduğunun gösterilmesi bu reseptörleri ilaç araştırmalarında potansiyel bir hedef haline getirmiştir (8-10). Bizim laboratuvarımızda da deney hayvanlarına santral ve periferik yoldan uygulanan CDP-kolin'in farklı ağrı modellerinde güçlü analjezik ve antihiperaljezik etki meydana getirdiğinin gösterilmesi ve CDP-kolin'in bu etkisine özellikle α_7 nAChR'nin aracılık ettiğinin açığa çıkarılmış

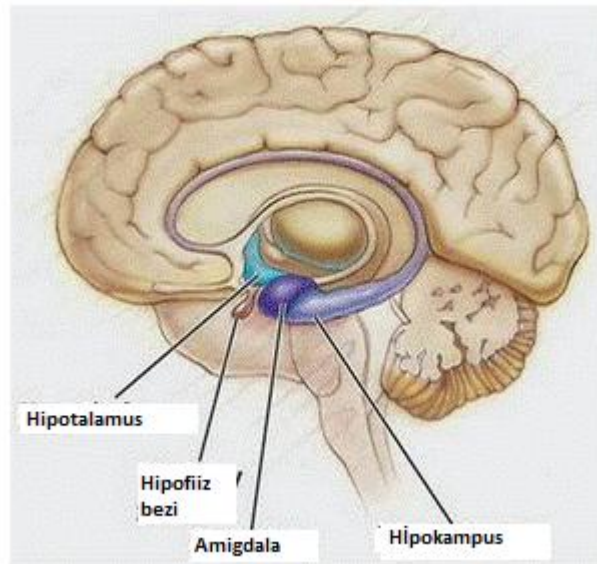
olması (11-13) bizim bu konuya duyduğumuz ilgiyi arttırmış ve bu teze konu olan araştırmayı planlamamıza öncülük etmiştir.

GENEL BİLGİLER

1. Amigdala

1.A. Anatomi

Amigdala (Corpus amigdaloidum=amigdaloid nükleer kompleks) temporal lobun dorsomedial kısmında yerleşmiş badem şeklinde gri cevher oluşumudur (Şekil-1). Burdach tarafından, 19. yüzyılın ilk yarısında insan temporal lobuna ait kesitlerde keşfedilerek isimlendirilmiştir. Burdach aslında bir grup hücreyi bazolateral kompleks olarak tarif etmiştir. Daha sonra bazolateral kompleksi çevreleyen çok sayıda yapı amigdaloid kompleks olarak tanımlanmıştır. Bu yapı emosyonel süreçteki merkezi rolünden dolayı sürekli ilgi çekmiştir (1).



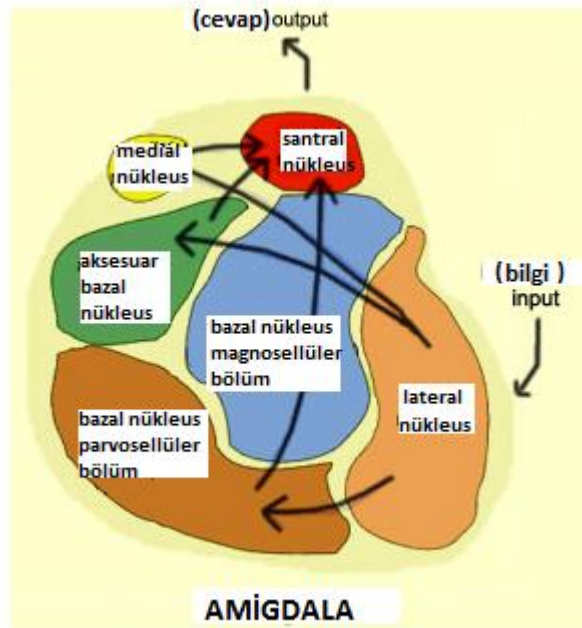
Şekil- 1: Amigdala

Medial temporal lobda lokalize amigdala yapısal olarak birbirinden farklı 13 nükleusdan oluşmaktadır (Şekil-2). Bu nükleuslar da yoğun internükleer ve intranükleer bağlantılar içeren alt bölmelere bölünür. Bu nükleus ve subnükleuslar yapısal, histokimyasal ve yaptıkları bağlantılara dayanılarak ayıt edilebilirler (3,4). Çalışmalarda farklı amigdala nükleuslarının türler arasında birçok benzerliğe sahipken aynı zamanda organizasyon ve boyutlar bakımından belirgin farklılıklar gösterdiği ortaya konmuştur (14,15).

Price ve ark.'nın (16) yaptığı bir klasifikasyona göre amigdala nükleusları üç gruba bölünür:

1. Derin veya bazolateral grup: lateral, bazal ve aksesuar bazal nükleusu içerir
2. Süperfisiyal veya kortikal benzeri grup: kortikal nükleus ve olfaktor traktın lateral nükleusu
3. Centromedial grup: medial ve santral nükleus

Swanson ve Petrovich (17) ise amigdaloid kompleksin isteğe bağlı olarak gruplandırılan yapısal ve fonksiyonel heterojen bir grup olduğunu savunmuştur.



Şekil-2: Amigdalanın ana nükleusları

1.B. Fonksiyonları

Amigdala genel bir tanımı ile uygun davranışsal yanıtların programlanmasında rol oynayan bir limbik sistem bölümüdür. Başta koku, işitme, görme ve somatosensoryal duyular olmak üzere tüm duylardan effentler alan amigdala, limbik sistemin bir parçası olarak; korku, zevk, duygulanım, duysal uyarının duygusal değerlendirilmesi, duygusal öğrenme, hafıza ve affektif hastalıklar (anksiyete, depresyon)'da (2,3) kilit rol oynar.

1.C. Bağlantıları

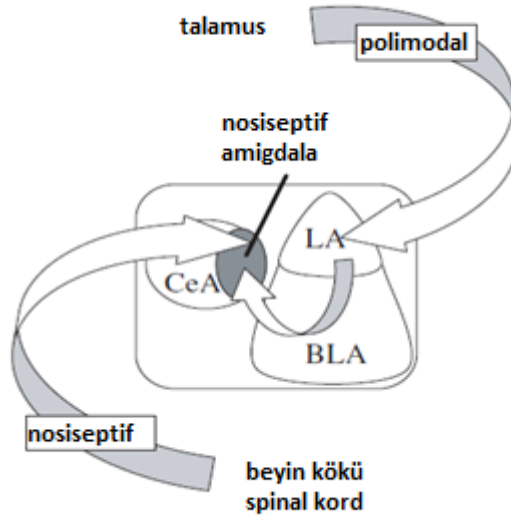
Amigdalanın afferent ve efferent bağlantıları yaygındır. Her amigdala nükleusu çoğu beyin bölgelerinden inputlar alır. Amigdaladan kortikal ve subkortikal bölgeleri de içeren efferent projeksiyonları da yaygındır (18,19).

Amigdalanın afferent ve efferent bağlantıları ile ilgili datalar amigdalaya yapılan enjeksiyonlarla ilgili araştırmalara dayanır. Bu çalışmalar amigdala nükleuslarının birçok farklı beyin bölgelerinden inputlar aldığını ortaya koyar (4,15). Amigdala, periaquaduktal gri madde (PAG), nükleus rafe magnus (NRM) ve lokus serelous (LC) gibi bölgelerle afferent bağlantılar içerir (19,20). Ayrıca amigdaladan kortikal ve subkortikal bölgeleri de içeren efferent projeksiyonları da yaygındır (15).

1.C.1. Afferent Bağlantılar

Amigdala tüm sistemlerden (somatosensoryal, visseral, tat, işitsel ve görsel) duysal inputlar alır (1,5,21) (Şekil-3). Bu inputlar, geleneksel input alanı kabul edilen bazolateral kompleks ve kortikal nükleusdan output alanına (centromedial nükleus, CeA) kadar amigdaladaki yapıları tüm seviyelerde hedef alır. Böylece farklı duysal modaliteler arasında birleşme seviyeleri olur. Duysal bilgiye ek olarak diğer nükleuslar yetersiz projeksiyon alırken santral, lateral ve medial nükleuslar hipotalamusdan önemli inputlar alır. Özellikle santral nükleus midbrain, pons ve medulladan gelen çeşitli inputlar için ana hedeftir (15).

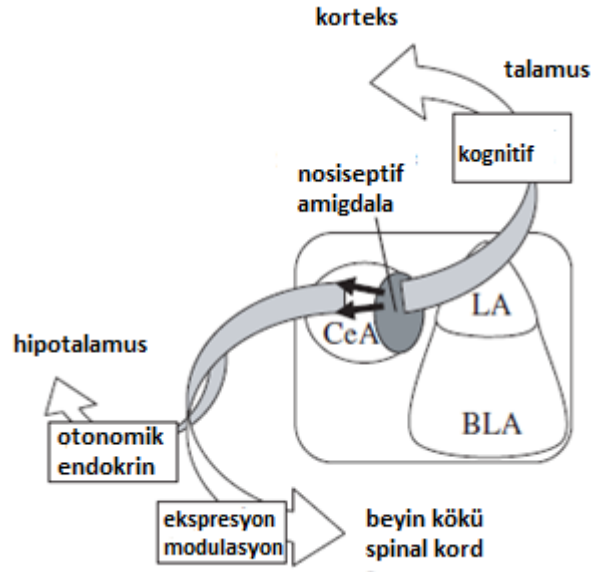
Polimodal duysal bilgiler de amigdalaya farklı kaynaklardan gelir. Bunlar arasında prefrontal korteks, peririnal korteks ve hipokampus vardır (1,2,22).



Şekil- 3: Amigdala afferent bağlantıları
(CeA: amigdala santral nükleusu, LA: amigdala lateral nükleusu,
BLA: amigdala bazolateral nükleusu)

1.C.2. Efferent Bağlantılar

Amigdala kortikal, hipotalamik ve beyin sapı bölgelerine yaygın projeksiyonlar gönderir (Şekil-4). Amigdala santral nükleusu (CeA), hipotalamusa direk projeksiyonlara ek olarak aynı zamanda hipotalamik nükleusları innerve eden stria terminalis bed nükleusuna güçlü projeksiyonlara sahiptir. Ayrıca amigdalanın CeA bölgesi asending monoaminerjik ve kolinerjik nöron gruplarına projeksiyonlar gönderir. Bunlar, noradrenerjik LC, dopaminerjik substansia nigra ve ventral tegmental alan, serotonerjik NRM ve kolinerjik nükleus bazalisi içerir (16,23).



Şekil- 4: Amigdala efferent bağlantıları
(CeA: amigdala santral nukleusu, LA: amigdala lateral nukleusu,
BLA: amigdala bazolateral nukleusu)

1.C.3. Amigdala içi Bağlantılar

Çalışmalar amigdalanın intranükleer ve internükleer bağlantıları olduğunu ortaya koymuştur. Bu çalışmalar, duysal bilginin amigdalaya bazolateral nükleus aracılığıyla gelerek lokal olarak işlendiğini ve sonra genelde output istasyonu gibi görev yapan santral nükleusa lateralden mediale ilerlediğini bildirir. Bu bağlantılar, amigdalaya giren bilginin uygun davranışsal cevaplara yol açmadan önce yoğun bir işleme süreci olduğunu gösterir (1,24).

1.D. Amigdala ve Ağrı

Çok boyutlu bir deneyim olan ağrı sadece nosiseptif değil aynı zamanda emosyonel-affektif ve kognitif bileşenler içerir (25,26). Ağrıya verilen emosyonel cevapların nörobiyolojik temelini anlamak yeni ve etkili terapötik stratejiler geliştirmek için çok önemlidir. Emosyon ve affektif hastalıklardaki önemli rolü uzun zamandır bilinen amigdala (27), ağrı çalışmalarında hedef bölgelerden biri olmuştur. Ağrı, anksiyete ve depresyona neden olabilirken tersine anksiyete ve depresyonlu hastalar ağrıyı daha güçlü yaşarlar ve kronik ağrı geliştirme olasılığı daha fazladır

(28,29). Amigdala, kronik ağrı ve negatif affektif durumlar arasındaki bu çift taraflı ilişkide önemli bir yapıdır (30,31).

Anatomik, nörokimyasal, elektrofizyolojik ve davranışsal çalışmalar amigdalanın ağrının emosyonel-affektif boyutunda önemli rolü olduğunu güçlü bir şekilde desteklemektedir (32,33). Lateral, laterobazal ve santral nükleuslar nosiseptif sinyal transmisyonda özellikle önemlidir. Nosiseptif bilgi santral nükleusa spino-parabrachio-amigdaloid ağrı yolağı ile ya da direk spinal veya trigeminal dorsal boynuz lamina 1'den ya da çoğunlukla parabrachial kompleks aracılığıyla gelir (34).

Çeşitli raporlar amigdalada nörotransmisyona katkıda bulunan peptid ve aminoasitlerin ve asetilkolin ve enkefalin gibi nörotransmitterlerin varlığını göstermiştir. Aslında CeA' da asetilkolinesteraz ve kolin asetiltransferaz gibi enzimlerin oluşu amigdalada asetilkolin sentezinin meydana geldiğini gösterir (35).

Nosisepsiyon, korku, anksiyete, dikkat, biliş, otonomik fonksiyon ve endojen ağrı kontrolü ile ilgili beyin alanları ve sistemleri ile bağlantılarından dolayı CeA, emosyonel-affektif ağrı cevabı ve ağrı modülasyonunda anahtar rol oynamaktadır. CeA; PAG, parabrachial nükleus, talamus nükleusları, insular korteks ve ağrıda önemli rol oynayan diğer beyin bölgeleri ile direk bağlantılara sahiptir (36,37).

Amigdalanın CeA bölgesine parabrachial nükleusdan glutamaterjik ve peptiderjik sinapslar aracılığıyla nosiseptif stimülasyon hakkında direk bilgi gelirken, amigdalanın bazolateral nükleusundan (BLA) glutamaterjik projeksiyonlar ile polimodal bilgi gelebilir. CeA' nın internal ağı GABAerjik inhibitör nöronlara dayanır. Ağrı algı seviyesinde değişiklikler inen ağrı kontrol merkezlerine CeA'nın projeksiyonlarını içerir iken amigdalanın ağrının afektif ve emosyonel boyutundaki etkisi kortikal bölgelerle indirek bağlantıları içeren daha büyük ağlardan kaynaklanır (38,39).

Amigdalanın ağrı kontrol mekanizmalarına katılımı ile ilgili bilgilerin çoğu, amigdala lezyonlu hayvan çalışmalarına veya amigdalaya bazı agonistlerin mikroenjeksiyonu ile oluşan antinosisepsiyonun gözlenmesine dayanır. Amigdalanın özellikle BLA ve CeA lezyonları, çevresel olarak

indüklenen antinosisepsiyonun çeşitli formlarını azaltır (40-43). Bilateral CeA lezyonları sistemik verilen düşük doz morfinin antinosiseptif etkisini tail flick (44) ve formalin (45) testte ortadan kaldırmıştır. Amigdalaya k-opioid agonist (46) veya nörotensin (47) mikroinjeksiyonu antinosisepsiyon meydana getirir. Benzer bir etki, tail-flick testte santral ve medial nükleusu da içeren çeşitli amigdala nükleuslarına karbacol mikroinjeksiyonu ile görülmüştür (48,49). Santral nükleusa opioidlerin (50,51) veya bazomedial bölgeye serotonin (52) mikroinjeksiyonu antinosisepsiyon meydana getirir.

Bazı çalışmalar amigdalanın elektriksel stimülasyonunun nosiseptif cevaplardaki etkileri üzerine yapılmıştır. İlk çalışmalara göre, amigdalanın lateral bölgesinin stimülasyonu antinosiseptif benzeri etkilere yol açarken medial bölgesinin ağırlı cevap paterni ortaya çıkarmıştır (53). Daha sonra CeA elektriksel stimülasyonunun visseral ağrıyı azalttığı gözlenmiştir (54). Olivera ve ark. santral nükleus stimülasyonun meydana getirdiği antinosisepsiyonun sistemik verilen nalokson ile inhibe edildiğini göstermişlerdir (49).

Ayrıca amigdalaya nöropeptid (54,55) veya noradrenerjik ve kolinerjik agonist (49,57,58) enjeksiyonu antinosiseptif etki meydana getirir. Ek olarak amigdala, sistemik verilen morfin ve kannabinoidlerin analjezik etkisi ile ilişkilidir çünkü CeA nükleusun lezyon veya inaktivasyonu tail-flick testte ölçülen morfin veya kannabinoidlerin oluşturduğu analjeziyi azaltmıştır (49,59). Amigdalanın CeA bölgesine uygulanan morfin veya beta endorfinin analjezik özellikleri amigdala-PAG yolağında opioid transmisyonu dayandırmaktadır (60).

Stresli durumlar tail-flick veya hot-plate testlerle ölçülen analjeziye neden olur. Çeşitli çalışmalar, amigdalanın CeA nükleusunun bilateral lezyonu veya inaktivasyonunun bu analjezik etkiyi azalttığı veya kaldırdığını göstermiştir (40,41). Bu veriler, CeA'nın analjezik süreci güçlü bir şekilde etkilediğini göstermektedir.

Nöropatik ağrı, akut ağrıdan farklı bir profile sahiptir. Hayvan çalışmaları, insanda tanımlanan tüm semptomları kapsamasa da, kullanılan modeller spontan ağrı davranışlarını, hiperaljezi ve/veya allodiniyi ve

anksiyete ve depresyon gibi ağrının emosyonel sonuçlarını gösterebilmektedir. Nöropatik ağrı sıklıkla depresyon ve anksiyete gibi comorbid hastalıklarla birlikte görülür (61). Amigdala, mood süreci, korku, emosyonel hafıza ve ağrının emosyonel- affektif komponenti ile ilgilidir (2,3,5,62). Nöropatik ağrı CeA'da nöronal aktivite ve sinaptik transmisyon artışına yol açar (5,61,63) ve CeA'nın aktivite ve nörokimyasında değişiklikler nöropatik ağrıda nosiseptif davranışların alevlenmesine katkıda bulunur. İnsanlarda ise beyin görüntüleme çalışmaları artrit veya mononöropati hastalarında amigdala aktivitesinde değişiklikleri gösterir, bu da amigdalanın bu patolojilerin emosyonel yönlerine katıldığını gösterir (64,65).

Nörolojik görüntüleme çalışmaları; hayvanlarda, ağrılı ısı, vasküler ağrı ve periferik mononöropati durumlarında amigdalada ağrı ile ilgili değişiklikler ortaya koymuştur (66,67). CeA' da, periferik uyarana güçlü nöronal cevaplar gözlenmiştir (5). CeA yüksek nosiseptif nöron içeriği nedeniyle 'nosiseptif amigdala' (5) olarak adlandırılmıştır. Depresif davranışlarla ilişkili olarak CeA nöron sayısının artması ve artrit, visseral ve nöropatik ağrı modellerinde CeA nöronlarının eksitabilitesinin artmasına dayanarak bu tanımlama yapılmıştır (68,69).

İlginç bir gözlem sağ CeA'nın sola göre ağrı modülasyonuna daha fazla katılmasıdır. Carrasquillo ve Gereau (70) ile Ji ve Neugebauer (62) formalin uygulanması sonrası ve bir artrit ağrı modelinde sağ CeA' da sola göre daha fazla nöronal aktivite rapor etmişlerdir. Nöropatik sıçanlarda spontan aktivite ve uyarılmış cevaplar sol CeA' da siyatik sinir ligasyonundan sonra 2-6 gün artarken sağ CeA'da 14 gün sonra artmıştır. Bu bulgular amigdalada ağrı lateralizasyonu olduğunu göstermektedir (71). Bu lateralizasyonun anatomik ve fonksiyonel temeli bilinmese de sağ amigdala ve ağrının emosyonel komponenti arasındaki güçlü ilişkiyi destekler (72).

Opioid sistem, enkefalinin santral amigdalada intrinsik iletişime katkısından ve diğer opioid peptidlerin ekstrinsik CeA outputlarına katkısından dolayı amigdalanın ağrı ile ilişkisinde kilit bir rol oynar (73). Amigdalanın opioid analjezisindeki rolünü gösteren çeşitli çalışmalar vardır.

Opioid, opioid reseptör agonisti, enkefalinaz inhibitörlerinin amigdalaya mikroenjeksiyonunun antinosiseptif davranışlar oluşturduğu gösterilmiştir.(60, 74-76). Amigdala lezyonlarının morfin analjezisini azalttığı ortaya konmuştur (45).

Opioid sistemin amigdalada ağrı üzerinde etkisi birçok veri ile desteklenmiştir. Amigdalada morfinin antinosiseptif etkisi, opioid ligandların CeA ve PAG arasında sinerjistik dağılımı (60) ve nöropatik farelerde CeA' da opioid reseptör bağlanmada değişiklik (119) bu kanıtlardan bazılarıdır. Amigdala özellikle de CeA dinorfinlere oranla yüksek konsantrasyonda enkefalin ve opioid reseptörlere sahiptir (120, 121). Amigdalanın morfin antinosisepsiyonunda mediatör olduğunu işaret eden kanıtlar vardır. Çünkü bu yapıya morfin mikroenjeksiyonu bazı ağrı testlerinde analjezi oluşturmuştur (111). Diğer taraftan amigdala lezyonları sistemik uygulanan opioid agonistlerin antinosisepsiyon oluşturma kabiliyetlerini etkiler (67).

Sabetkasaei'nin (80) yaptığı çalışmada CeA'ya morfin mikroenjeksiyonu formalin testinde analjezi meydana getirmiş ve bu etki sistemik nalokson ile bloke edilmiştir. Ayrıca CeA'ya nalokson mikroenjeksiyonu da sistemik morfinin analjezik etkisini bloke etmiştir. Bu bulgular santral nükleusdaki opioidderjik transmisyonun morfin analjezik etkisinde kritik rol oynadığını göstermektedir. Amigdalanın özellikle de santral nükleusun yüksek konsantrasyonlarda opioid reseptörler içermesi de bu görüşü destekleyen kanıtlardan birisidir. CeA' da opioid reseptörler endojen ligandlarıyla beraber pre ve post sinaptik olarak eksprese edilir. Önceki çalışmalarda amigdalaya morfin enjeksiyonunun amigdala ve PAG' de enkefalin ve beta endorfin salınımında artışa yol açtığı ve bu etkinin nalokson ile antagonize edildiği gösterilmiştir. Amigdalaya kolinerjik agonist enjeksiyonu ile görülen antinosiseptif etki aynı alana uygulanan nalokson ön tedavisi ile önlenmiştir. Bu da kolinerjik-opioiderjik bir etkileşimi gösterir. Kolinerjik transmisyon, CeA internöronlarından endorfin/enkefalin salınımını aktive edebilir (81,82).

Oliveira ve Prado (49), santral nükleusun stimülasyonun tail flick teste meydana getirdiği antinosisepsiyonun sistemik nalokson uygulaması ile bloke

edildiğini göstermiştir. Bu bulgular da amigdalaadaki kolinerjik-opioiderjik etkileşimi göstermektedir.

GABA sinir sistemin ana inhibitör transmitterdir ve GABA_B reseptörlerin nikotinin akut etkilerini module ettiği gösterilmiştir. Buna göre GABA_B reseptör antagonisti baklofen nikotinin antinosiseptif etkilerini azaltır (83). Elektrofizyolojik ve farmakolojik çalışmalar amigdalanın güçlü inhibitör GABAergic sistem içerdiğini göstermiştir, gerçekten de GABAergic sistem amigdala bilgi işleme sürecinde önemli rol oynamaktadır. Ek olarak nöropatik sıçanlarda CeA' da GABA_A reseptörlerin aktivasyonunun mekanik hiperaljeziyi azatlığı gösterilmiştir (84).

Amigdalanın ağrı modülasyonuna katılımında serotonerjik sistemin de rolü vardır. Amigdala en büyük serotonerjik çekirdek olan dorsal raphe nükleusdan güçlü serotonerjik projeksiyonlar alır. 5-HT salınımı, hoş olmayan uyaran durumlarında amigdala artar. Bir çalışmada amigdala serotonin reseptör antagonisti uygulanması serotoninin ağrıyı inhibe edici etkisini önlemiştir. Ayrıca çeşitli çalışmalarda sistemik serotonin agonist enjeksiyonu nöropatik ağrı modeli oluşturmak için siyatik sinir ligasyonu (CCI) yapılmış sıçanlarda hiperaljeziyi azaltmıştır (85,86).

Glutamaterjik sistem ağrıda rol oynayan sistemlerden biridir. Metabotropik glutamat reseptörlerin amigdala ağrıyı ve ilişkili affektif davranışları kontrol eder (67). Ek olarak amigdalanın CeA nükleusuna metabotropik glutamaterjik reseptör (mGluR) agonisti enjeksiyonu artmış pençe reflekslerini azaltır. Amigdalaadaki glutamat reseptörlerin aktivasyonunun, nöropatik ağrının duysal ve emosyonel komponentinin sürdürülmesine katkıda bulunduğu yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (68).

Sonuç olarak literatürlerden elde edilen veriler amigdalanın özellikle de onun CeA nükleusunun ağrı modülasyonuna katkıda bulunduğunu göstermektedir. Amigdalanın inen ve çıkan ağrı yolağı ve affektif ve kognitif merkezler ile anatomik ve fonksiyonel ilişkisi de CeA'ı kritik bir konuma yerleştirmektedir. Ağrı ve duygudurum arasında önemli bir merkez olması nedeniyle amigdala ve nöropatik ağrıyı içeren araştırmalar yeni tedavi yaklaşımlarına yön verecektir.

2. Ağrı ve Analjezi

Ağrı çok faktörlü kompleks bir olgudur ve Uluslararası Ağrı Çalışma Derneği (International Association for the Study of Pain, IASP) tarafından yapılan tanıma göre ağrı; “gerçek veya potansiyel doku hasarıyla ilişkili, duyuşsal ve emosyonel hoş olmayan subjektif bir deneyimdir”(87). Bu tanıma göre ağrı gerçek bir duyu değil, algıdır ve duyuşsal (sensoryal), duygusal (etkilenen, emosyonel) ve bilişsel bileşenlerden oluşmaktadır (88).

Ağrının başlaması, algılanması, iletimi ve ağrıya karşı verilen cevap bir dizi karmaşık mekanizmalar sonucu gelişir.

2.1. Ağrı Mekanizmaları ve İletimi

Nosiseptif süreçlerin başlangıç noktası primer afferent nosiseptörlerdir. Bunlar mekanik, termal ve kimyasal uyaranlara yanıt veren sinir uçlarıdır. Nosiseptörün yanıt özelliklerine bağlı olarak spinal korda doğru bir yayılım meydana gelir. Ağrının yayılımı ile ilgili reseptörler iki sınıfta ele alınabilir: A-delta mekanotermal ve C polimodal nosiseptörler. Birçok ağrı tipi primer afferent nöronların, özellikle C polimodal nosiseptörlerin uyarılması ile başlar. Normal koşullarda mekanik, termal ve kimyasal uyaranlar yüksek eşik değerdeki nosiseptörleri harekete geçirirler (89). Ağrılı uyaran dört aşamada üst merkezlere doğru bir yol izler (90,91). Bu aşamalar transdüksiyon, transmisyon, modülasyon ve persepsiyon'dur (92) (Şekil-5).

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 uyaranlar ile aktive olurken, myelinsiz C liflerinin uçları olan polimodal nosiseptörler ise şiddetli mekanik, kimyasal, aşırı sıcak ve soğuk uyaranlarla 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.

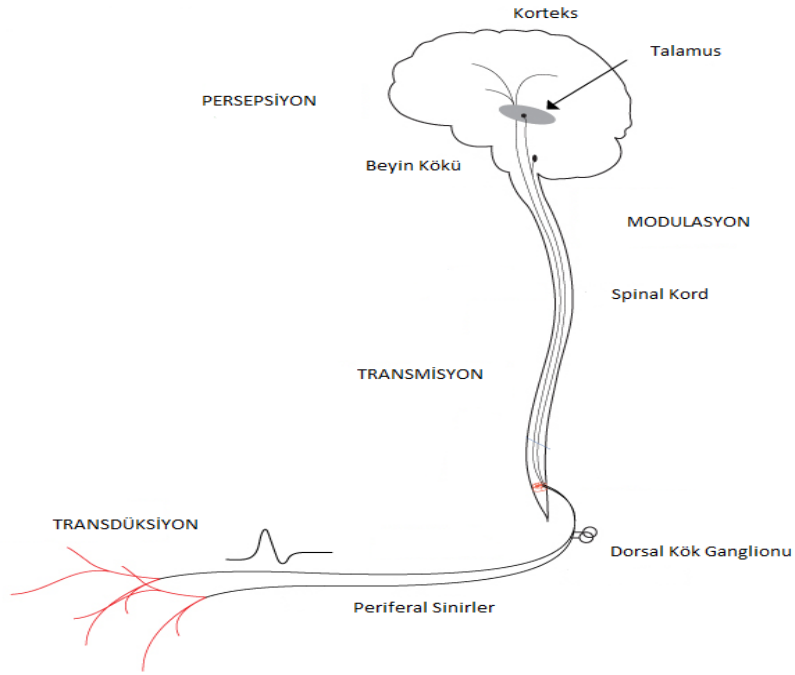
b) Spinal korddan beyin sapı ve talamusa uzanan çıkan (assendan) projeksiyon nöronları (II. sıra nöronlar): Bu grup nöronlar içerisinde en önemli yolak spinotalamik yolaktır (STT) ve retiküler formasyon, periakvaduktal gri madde (PAG) ve hipotalamus ile yakın ilişki içerisindedir.

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: Ağrı impulsuna yanıt oluşması ve inen (dessendan) nöral yollar ile ağrılı uyarının inhibe edilmeye çalışılmasıdır. Özetle transmisyon iletisinin azaltılmasıdır.

Modülasyon periferik, spinal ve supraspinal düzeylerde olabilmektedir. Kapı kontrol teorisi, ağrının ilk olarak spinal kordda kontrol edildiği düşüncesini ortaya koyarak modülasyonu açıklamada önemlidir. Çeşitli beyin bölgeleri desendan inhibitör yollara etkir ve bu yollardaki sinir lifleri dorsal boynuz nöronlarıyla sinaps yaparak, sinaptik aralığa endojen opiadlar, serotonin, norepinefrin ve gama amino bütirik asit (GABA) gibi inhibitör maddeler salıverirler. Bu mediyatörler primer aferent ve/veya dorsal boynuz nöronları üzerindeki reseptörlere bağlanarak nosiseptif transmisyonu inhibe ederler.

4) Persepsiyon: Supraspinal düzeye ulasan ağrı impulsunun kortekste değerlendirilerek ağrı duyusu olarak algılanmasıdır. Talamus ve korteksteki nöronların ağrılı uyarının şiddetine paralel yanıt oluşturması burada önemlidir.



Şekil-5: Ağrılı uyarının santral sinir sistemine iletilmesi aşamaları

Ağrı çok boyutlu bir deneyimdir. Farklı komponentler etkileşerek ağrının kompleks yapısını oluşturur (93):

Duyusal diskriminatif boyut: Ağrının, şiddeti, süresi ve lokalizasyonunun algılanmasını sağlar. Kalın liflerle (A-alfa) iletilen afferent uyarı neospinotalamik yolla yukarı çıkar ve talamusun ventrobazal nükleusuna iletilir. Stimülusun lokalizasyonu, süresi ve kantitatif özellikleri hakkında ilk enformasyon burada yapılır. Ventrobazal nükleustan çıkan enformasyon santral sulkusun posteriorunda somatosensoryal kortekse iletilir.

Motivasyonal-affektif boyut: Hissi davranışın belirlenmesini sağlar. Ağrı deneyimleri tektir. Genellikle, zihinsel dikkati, normal cevabı değiştiren, düşünce ve davranışı bozan ağrılı stimülasyonun oluşturduğu hoş olmayan duruma duyusal bir nitelik verilir. Ağrının bu yönüne hizmet eden nörofizyolojik mekanizma, spinal T hücrelerinden gelen çıkan impulslarla başlar, omuriliğin anterolateralinde lokalize olan paleospinotalamik ve paleospinobulber traktuslara ait ikinci nöronlar tarafından taşınır. Bu yollar

medüller retiküler formasyo ve orta beyinde gri maddede sonlanır. Bu alanlardan çıkan lifler iki sisteme girer:

1 - Talamusun medial intralaminer nükleusları: Bu nükleusların stimülasyonu anksiete ile birlikte hoş olmayan, lokalizasyonu zayıf bir duyu oluşturur. Beraberinde korkuya benzer cevaplar ve kaçınma davranışı ortaya çıkar. Bundan sonra iletim üçüncü nöronlarla korteks ve limbik sisteme iletilir.

2 - Limbik sistem: Bu santral elemanı hipotalamus olan birçok subkortikal yapıdan oluşur. Limbik sistem, anterior talamus, amigdala, hipokampus ve bazal ganglionları içerir. Bu yapılar bir duyunun affektif (hissi) niteliğini verir; duyunun hoş olan veya hoş olmayan niteliği ile ısırdap çekme ve ödüllendirme sürecini limbik sistem ayarlar. Hafıza büyük ölçüde aktive edilir ve enformasyon kaydedilir. Bundan sonra her kişinin ağrı duyusuna karşı tavır ve hissi belirlenir. Bunun üzerine ağırlı stimülasyona göre çekinme ve kaçınma davranışı oluşturulur.

Kognitif (bilişsel) boyut: Ağrının değerlendirilmesi ve motor cevabın belirlenmesi

Kortikal aktivite duyuya entellektüel bir boyut kazandırır. Ağrıya bağlı korku, anksiyete ve farkındalık oluşmasını sağlar. Frontal korteks ve ilişkili olduğu beyin alanları bu zihinsel işlemlerde ve motor mekanizmalar tarafından oluşturulan cevabın belirlenmesinde santral bir rol oynar.

2.2. Nöropatik Ağrı

Ağrıyı; nöropatik ve nosiseptif ağrı olmak üzere iki başlık altında sınıflandırabiliriz. Nosiseptif ağrı, periferik nosiseptörlerin aktivasyonu sonucu gelişen ve ağırlı stimulusa karşı korunma mekanizması oluşturan bir alarm sistemidir. Nöropatik ağrı, sağlıklı normal primer afferentlerin uyarılmasıyla ortaya çıkan, organizmayı tehdit eden tehlikeleri haber vererek onu korumaya yönelik nosiseptif ağrıdan farklıdır ve bir nöral disfonksiyon bulgusudur (94). Nöropatik ağrıda fizyopatolojik mekanizmalar; periferik ve santral mekanizmalar olmak üzere iki gruba ayrılır (6,7). Periferik mekanizmalar; ektopik deşarj, nosiseptör sensitizasyonu, lifler arası anormal etkileşim, katekolaminlere artmış duyarlılık olarak tanımlanmaktadır ve tüm mekanizmalar primer afferentlerde değişikliklere bağlıdır. Santral

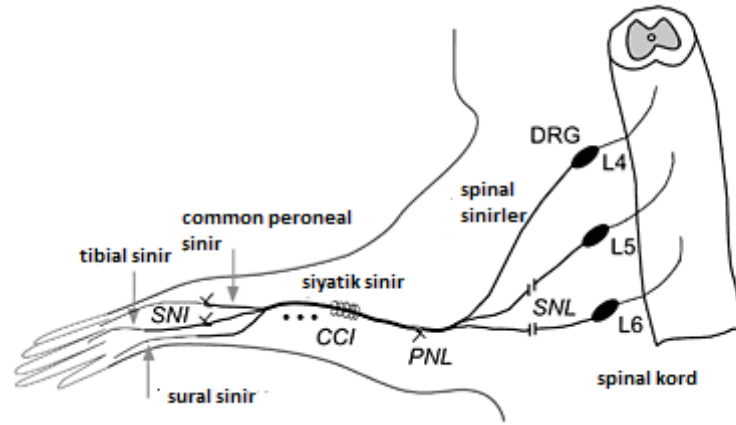
mekanizmalar ise; duyusal yolların irritasyonu, sempatik sistem irritasyonu, hipotalamik bozukluk, inisi inhibitör mekanizmaların kaybı ve alternatif sekonder çıkıcı yolların aktivasyonu olarak tanımlanabilir (95,96).

Nöropatik ağrı; periferik veya santral sinir sisteminin primer bir lezyon veya disfonksiyonu sonucu ortaya çıkar. Fizyolojik ağrıya karşın, nöropatik ağrı eksternal uyaran olmaksızın ve/veya normalde zararsız bir uyaran karşısında artmış spontan ağrı ile karakterizedir. Somatosensoryel sistemin anormal uyarılması söz konusudur. Nöropatik ağrı normal nosiseptif yollardan geçer ve çoğunlukla direkt doku hasarı yolu ile başlatılır. İyi tedavi edilmeyen nöropatik ağrı duygu durum ve uyku bozukluklarına yol açmakta, hastaların iş ve sosyal hayatlarında engellere neden olmakta ve hayat kalitesini düşürmektedir. Bu nedenle toplum sağlığı açısından önemi giderek artmaktadır (89).

Nöropatik ağrı, ağrı sendromları içinde tedavi edilmesi en güç olanlardan birisidir. Hastalar için etkili olduğu kanıtlanmış terapötik bir ilaç ya da ilaç grubu yoktur. Bir hasta için etkin bir farmakolojik tedavi belirlenmesi zordur. Bunun nedeninin ağrı semptomunun farklı mekanizmalardan kaynaklanıyor olması ve altta yatan mekanizmanın birçok değişik semptomu oluşturabilmesi olduğu düşünülmektedir. Kronik ağrı tiplerindeki gibi hastanın psikolojik sağlığını da etkilemektedir. Bu nedenlerden dolayı tedavide yeni ajanlara yönelik araştırmalar devam etmektedir.

2.2.1. Nöropatik Ağrı Modeli

Yaygın olarak kullanılan üç nöropatik ağrı modeli vardır (Şekil-6): parsiyel siyatik sinir ligasyonu (PSL), spinal sinir ligasyonu (SNL) ve kronik konstriksiyon hasarı (CCI). Her üç modelde de ligasyondan sonra hızlıca allodini ve hiperaljezi gelişir ve iki aydan daha fazla devam eder. CCI sık kullanılan bir modeldir ve cerrahi sonrası en az yedi hafta termal hiperaljezi ve mekanik allodini oluşturduğu doğrulanmıştır (97). Bu model, çoğu A- lifleri ve bazı C-lifleri kaybı sonucu inflamatuvar bir etki geliştirdiği için önemlidir. İnflamatuvar komponent, α_7 nAChR' lerin kolinerjik anti-inflamatuvar yolakla ilişkisi nedeniyle önemlidir (98).



Şekil- 6: Sık kullanılan nöropatik ağrı modelleri
(CCI: kronik konstriksiyon hasarı SNI: spinal sinir ligasyonu
PNL:parsiyel sinir ligasyonu SNI:spared sinir hasarı)

2.3. Kolinerjik Sistem ve Ağrı

Günümüze kadar yapılan çalışmalar nikotin ve nikotinik agonistlerin potansiyel etkili analjezikler olduğunu ortaya koymaktadır (8). Bu agonistler periferik ve santral sinir sisteminde yaygın olarak bulunan nikotinik asetilkolin reseptörleri (nAChR)' ne etki eder ve nAChR' ler, $\alpha(1-10)$, $\beta(1-4)$, γ , δ ve ϵ olmak üzere beş subunitten oluşan, periferik ve santral sinir sisteminde yaygın olarak bulunan ligand kapılı iyon kanallarıdır (99). Bu subunitlerin çeşitli kombinasyonları değişik fizyolojik ve fonksiyonel özelliklere sahip nAChR subtiplerini oluşturur (100). nAChR'i SSS' de orta beyin, medulla, NRM, talamus, pedukulopontin tegmental nükleus ve spinal kord gibi ağrıya katkıda bulunan bölgelerde eksprese edilir. nAChR' ler ayrıca PSS' de otonomik ganglion ve nonnöronal hücrelerde de mevcuttur (101-103).

Kolinerjik sistemin direk veya indirek aktivasyonunun analjezi oluşturduğu uzun zamandır bilinmektedir. İlk olarak Pedigo ve arkadaşları (104) tarafından yapılan çalışmada intraserebroventriküler yolla enjekte edilen asetilkolin deney hayvanlarında belirgin analjezi meydana getirmiştir. 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 (105-107). Ancak bu ajanların kullanımı hipotermi, motor bozukluklar ve teropatik indeks darlığı gibi yan etki

ve zorluklar nedeniyle kısıtlıdır (108, 109). Bu nedenle güvenli ve etkili analjezik nikotinik agonistler geliştirmek için nosiseptif transmisyon modulasyonuna katılan nAChR subtipleri için selektif ligandlar geliştirmek gereklidir. $\alpha 4\beta 2$ ve $\alpha 7$ subtipler nöronal yolakda dağılımlarından dolayı ağrı modulasyonuna katılımda önemlidirler (110-112). Son dekadda ağrı transmisyon çalışmaları büyük çoğunlukla $\alpha 4\beta 2$ ve $\alpha 7$ subtiplerini kapsamaktadır

Nikotinik AChR subtiplerinden birisi olan $\alpha 7$ nAChR' ler nörotransmitter-kapılı iyon kanalları ailesinin üyesidir. Diğer nAChR subtiplerine göre farklı fizyolojik ve farmakolojik profile sahiptir. Yüksek kalsiyum permeabilitesi, homopentamerik yapısı ve agonist aktivasyonundan sonra hızlı desensitizasyon ile karakterizedir (113, 114). nAChR'i sinir sisteminde yoğun olarak bulunur ve hafıza, biliş ve ağrı modulasyonu gibi birçok fonksiyonu vardır. Santral sinir sisteminde korteks, hipokampus, lateral genikulat nükleus, superior kollikulus, striatum ve spinal kord dorsal boynuzunda eksprese edilir. Hücresel seviyede $\alpha 7$ nAChRler GABAerjik, glutamaerjik ve kolinerjik nöronlarda pre ve post-sinaptik olarak bulunur (115).

İnflamatuar ve nöropatik ağrı modellerinde, dorsal kök ganglionlarında $\alpha 7$ subunit upregülasyonu gibi protein ekspresyonunda değişiklikler görölmüştür (116). Nikotinik $\alpha 7$ AChR subtipi ağrı modülasyonunda potansiyel bir hedef olarak kabul edilmektedir. Bu reseptörler ağırlıklı olarak nöronal dokularda eksprese edilmesine rağmen makrofajları da içeren birçok immun hücre tipi $\alpha 7$ nAChR mRNA'sı eksprese eder. Preklinik alışmalar, proinflamatuar sitokinlerin modulasyonu aracılığıyla $\alpha 7$ nAChR-aracılı antiinflamatuar etkilerin teropatik potansiyeline dikkat çekmiştir. Bu kolinerjik antiinflamatuar yolak makrofaj ve immun hücrelerde eksprese edilen $\alpha 7$ nAChR'lere etki eden asetilkolin aracılığıyla immun sistemi modüle eder (117,118).

Son yıllarda $\alpha 7$ nAChR agonistler kognitif gelişim, antinosisepsiyon ve anti-inflamatuar özellikler için olası hedef olarak önerilmektedir (9,10,119-121) ve $\alpha 7$ nAChR' leri supraspinal ve spinal ağrı transmisyon yolağında

mevcuttur (110-112,122,123). Buna göre α_7 nAChR agonistleri kolin, CDP-kolin çeşitli inflamasyon ve ağrı modellerinde antiinflamatuvar etkiler göstermiştir (10,12,120). Bu nedenle α_7 nAChR lerin, antiinflamatuvar ve analjezik ilaç araştırmalarında potansiyel hedef olduğu artan bir kabul görmektedir (8,9,125). Gerçekten de α_7 agonistler kronik nöropatik ve inflamatuvar ağrı modellerinde antinosiseptif ve antiinflamatuvar özellikler göstermektedir (10,119,126,127).

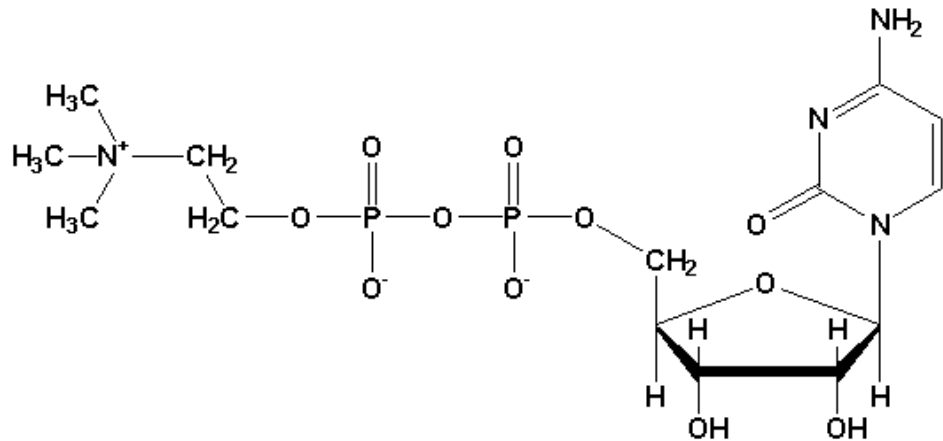
Kronik nöropatik ağrı, periferden kortekse kadar somatosensoryal yolakta uzun süreli plastisite nedeniyle ortaya çıkar. Bu plastisitik değişiklikler genellikle SSS' de sinir hasarı ve/veya disfonksiyonu sonucu meydana gelir ve hiperaljezi veya allodini ile sonuçlanır. Artmış ağrı duyarlılığı enzimler, nöropeptidler, eikozonoidler, kemokin ve sitokinler gibi farklı faktörlerin aracılık ettiği inflamatuvar bozukluğun en sık görülen belirtilerinden biridir (128-131). Bugüne kadar kronik nöropatik ağrı tedavisinde kullanılan opioidler, antiinflamatuvarlar ve antidepresanlar gibi çeşitli ilaçlar major yan etkiler ve/veya yetersiz etkiye sahiptir. Bu nedenle yüksek etki ve güvenliğe sahip ilaçların geliştirilmesi gereklidir (100). Önceki çalışmalar nAChR agonistlerinin kronik ağrılı durumları tedavisinde yararını ortaya koymuşlardır (8,132,133). nAChR subtiplerinin çoğu ağrı transmisyonu yolağında eksprese edilir, örneğin, $\alpha_4\beta_2$ ve α_7 subtipleri spinal dorsal boynuzda eksprese edilmektedir (122,123). Son çalışmalar α_7 nAChR lerin inflamasyon ve nosisepsiyon modülasyonundaki rolüne odaklanmıştır. (119,134). Nöronal varlıklarına ek olarak, α_7 nAChR' ler inflamasyonda anahtar immun hücreler olan makrofajlarda eksprese edilir (117,135). Önceki çalışmalar makrofaj ve diğer sitokin üreten hücrelerde eksprese edilen α_7 nAChRleri direk etkileyen asetilkolinin proinflamatuvar sitokin sentezinin downregülasyonunda ve doku hasarını önlemede önemini göstermiştir (117, 118). Ek olarak, Xiao ve arkadaşları (116) siyatik sinir aksotomisinden 14 gün sonra sıçan dorsal kök gangliyonunda α_7 nAChR subunit ekspresyonunda upregülasyon göstermişlerdir. Özellikle α_7 nAChR subtipinin kronik inflamatuvar ve nöropatik ağrı modellerinde önemli rol oynadığını gösteren kanıtlar giderek artmaktadır. α_7 nAChR agonistler kronik nöropatik ağrı ve inflamasyon modellerinde

anlamli anti-inflamatuar ve nosiseptif etki ortaya koymuştur (9-11,13,120). Yakın zamanda yapılan bir çalışmada endojen α_7 nAChR sinyalinin ağrı ve inflamasyondaki rolü transgenik fareler kullanılarak gösterilmiştir (136). Bizim laboratuvarımızda da yapılan çalışmalarda CDP-kolinin çeşitli ağrı modellerinde (akut, inflamatuvar ve kronik ağrı modelleri) analjezik ve antihiperaljezik etkilerinin araştırıldığı çalışmalarda hem kolinerjik sistem aktivasyonunun hem de α_7 nAChR'nin CDP-kolinin analjezik ve antiheraljezik etkilerine aracılık ettiği gösterilmiştir (11-13,137). Tüm bu çalışmaların işığında, α_7 nAChR'ler analjezik ve antiinflamatuvar ajanlar geliştirilmesinde mit verici bir hedefi temsil etmektedir.

3. CDP-kolin'in Genel zellikleri

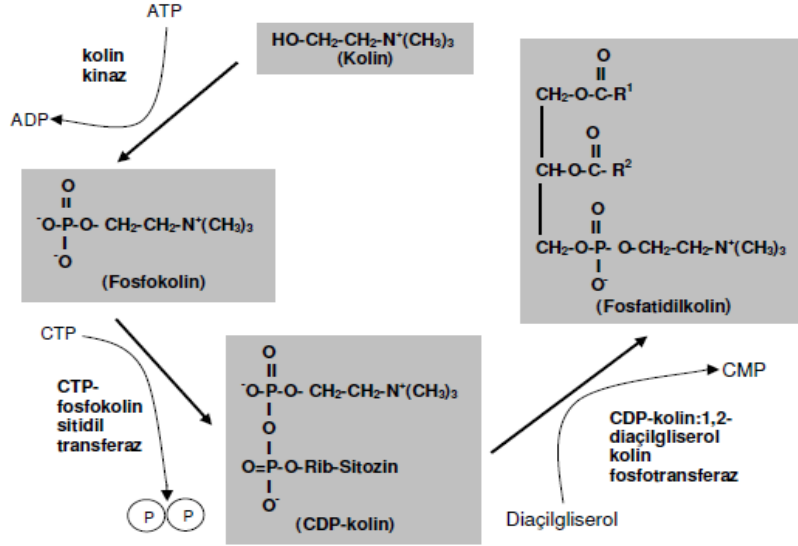
3.A. CDP-kolin'in Yapısı, Sentezi ve Metabolizması

Vücutta endojen olarak üretilen CDP-kolin ($C_{14}H_{26}N_4O_{11}P_2$), nükleotid yapısında büyük ve polar bir bileşiktir (238) (şekil -7). Uluslararası alanda önerilen tescil edilmemiş ismi Sitikolin' dir.



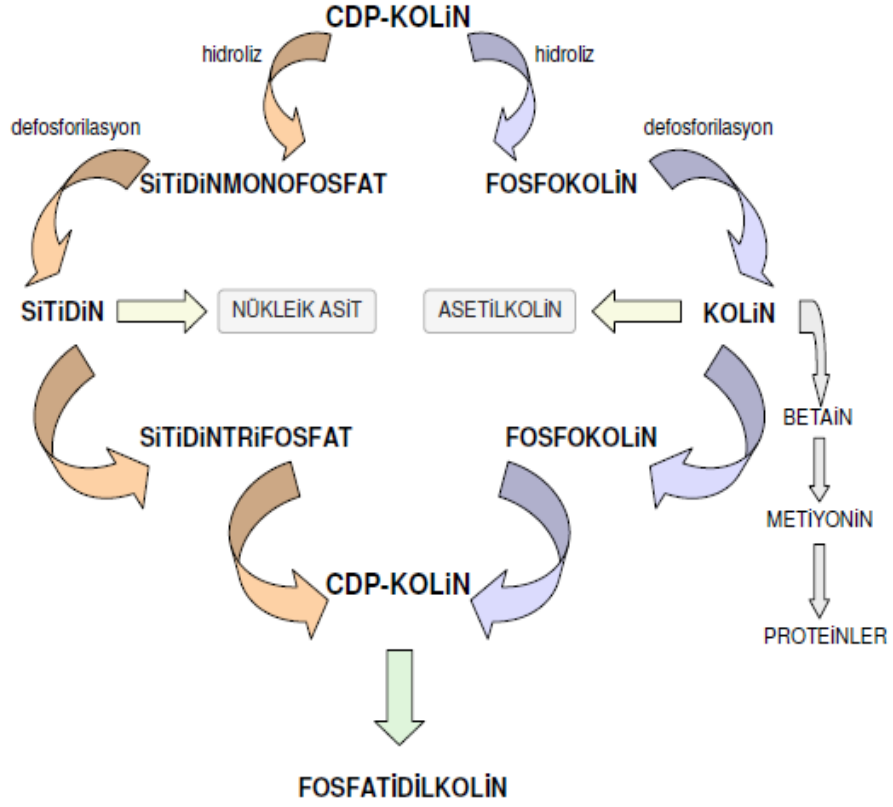
şekil-7: CDP-kolin'in molekül yapısı

CDP-kolin; kolin'den fosfatidilkolin sentez basamaklarında yer alan moleküllerden biridir (Şekil-8). Endojen CDP-kolin miktarını arttırmaya yönelik kolin, sitidin, orotik asit gibi ön tedavilerle ya da doğrudan CDP-kolin verilmesiyle fosfatidilkolin sentezinde artış sağlanabilmektedir (139).



Şekil- 8: Kennedy yolağı aracılığı ile CDP-kolin sentezi

CDP-kolin vücuda alındığında hücre membranlarında bulunan fosfodiesterazlar tarafından önce sitidinmonofosfat ve fosfokoline hidroliz edilir. Daha sonraki aşamalarda son metabolitleri olan kolin ve sitidine dönüşür (Şekil-9). Yapılan çalışmalar CDP-kolin'in etkilerini büyük oranda bu metabolitleri aracılığı ile meydana getirdiğini göstermiştir.



Şekil- 9: CDP-kolin'in metabolizması

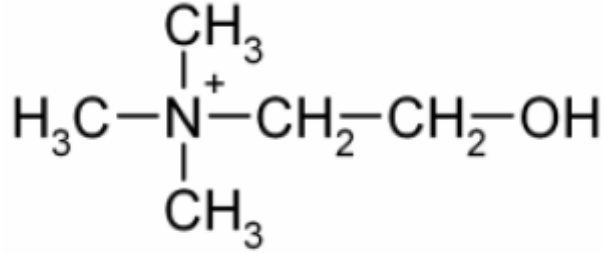
CDP-kolin oral yolla verildiğinde, molekül yapısı nedeniyle parçalanarak aktif metabolitlerine dönüşmeden absorbe edilmesi güçtür. Oral yolla uygulanan CDP-kolin, emilim öncesi ya da emilim sırasında parçalanmak suretiyle hızla aktif metabolitleri olan kolin ve sitidine dönüşür. CDP-kolin, büyük ve polar bir bileşik olduğu için beyine geçişi oldukça zordur ve normal şartlarda verilen total dozun yaklaşık olarak %0.25'inin beyin dokusuna geçebildiği gösterilmiştir (140,141). İntraserebroventriküler yolla uygulanan CDP-kolin'in hipotalamusta ve lateral serebral ventrikülde kolin düzeyini arttırdığı laboratuvarlarımızda yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (142).

3.2. CDP-kolin'in Metabolitleri

3.2.1. Kolin

Kolin parasempatik sistemin başlıca nörotransmitteri olan asetilkolinin ön maddesidir. Ayrıca hücre membranı lipidlerinden olan fosfatidilkolin ve sfingomyelinin yapısına katılmaktadır (Şekil-10). Kolin, diyetle bulunması

gereken temel gıdalardan olup beyin gelişimi ve fonksiyonu açısından kritik role sahiptir (143-145). Gıdalarla alındığında barsaklardan kolaylıkla emilir ve kan-beyin bariyerini geçebilir.



Şekil- 10: Kolin'in molekül yapısı

Vücut için gerekli kolin, diyetle alınımının yanı sıra, hücre membranında bulunan fosfatidilkolinden birkaç yol ile sentezlenebilir. Daha önce yapılan çalışmalar göstermiştir ki, sistemik kolin konsantrasyonunun artırılması sonucu beyin kolin ve asetilkolin (ACh) düzeylerinde artış meydana gelmektedir ve bu bulgu kolinin hem kolinerjik iletide hem de bu iletiye bağlı fonksiyonlarda artış meydana getirebildiğini ortaya koymuştur (146-150).

3.2.2. Sitidin ve Üridin

Sitidin ve üridin birer primidin nükleozididirler. Primidin nükleozidleri, içerdikleri şeker molekülünün tek bir hidroksil grubunun fosforile edilmesiyle, primidin mononükleotidlerine dönüşerek yıkılmaktan korunurlar. Kısaca nükleotid molekülü, nükleozid molekülünün fosfat esteridir. Primidin nükleotidleri genetik bilgi transferi, nükleik asid oluşumu, enerji metabolizması, lipid biyosentezi, metabolik reaksiyonlar ve sinyalizasyon gibi önemli fonksiyonlarda rol alan kritik moleküllerdir (151).

3.3. CDP-kolin'in Etkileri ve Tedavide Kullanımı

CDP-kolin'in asetilkolin sentezi ve kolinerjik sistem (142,152,153), membran fosfolipidleri (108,139,151), kardiyovasküler sistem (140,142,154,155) ve endokrin sistem (156,157) üzerine etkileri vardır. Ayrıca CDP-kolin'in günümüzde ilaç olarak kullanıldığı veya kullanıma

potansiyelinin bulunduğu alanlar vardır. Bu alanlar; bazı nörodejeneratif hastalıklar (158,159), serebral iskemi ve hipoksi (160,161), kafa travmaları (162,163), öğrenme ve bellek (164), Parkinson hastalığı (159,165), ambliyopi (166) ve glokom (167) gibi göz bozuklukları ile birlikte ağrı ve analjezi (11,137,168) olarak özetlenebilir.

3.3.1. CDP-kolin ve Ağrı

Yapılan araştırmalar CDP-kolin'in yukarıda da bahsedilen söz konusu etkilerini büyük oranda metabolitleri aracılığı ile meydana getirdiğini göstermiştir. Bu metabolitlerden biri olan kolin, hücre membranının yapısal komponentlerinin sentezinde kullanılan endojen bir nükleozid, hücrelerin normal fonksiyonu için esansiyel bir besin ve kolinerjik nörotransmitter ACh sentezi için de bir prekürsördür. Plazma ve doku kolin seviyelerini arttıran tedaviler ACh sentez ve salınımını ve kolinerjik transmisyonu artırır (142,152-154). Ayrıca eksojen CDP-kolin uygulanmasını takiben beyinde ACh ve kolin sentez ve/veya salınımı da artmaktadır.

Ağrı ve kolinerjik sistem ilişkisi ile ilgili son yıllarda yapılan çalışmalar nikotinik reseptör subtiplerinin önemini ortaya çıkarmış ve özellikle α_7 nAChR'lerin inflamasyon ve ağrı modülasyonundaki rolü ile ilgili çok sayıda araştırma yapılmıştır (119,134). Bu araştırmalardan elde edilen sonuca göre α_7 nAChR agonistleri nöropatik ağrı ve inflamasyonda hem antiinflamatuvar hem de antihiperalezik etki göstermektedir. CDP-kolin'in metaboliti olan kolin aynı zamanda α_7 nAChR için selektif bir agonisttir ve eksojen yolla uygulanan (santral veya periferik yolla) çeşitli ağrı modellerinde analjezik etki gösterdiği bilinmektedir (9,10,120). Buna ek olarak bazı ağrı modellerinde dışarıdan verilen morfinin de analjezik etkisini de arttıran kolinin antiinflamatuvar etkisi seçici α_7 nAChR antagonisti olan MLA ön tedavisi ile önlenmiştir (9).

Laboratuvarımızda santral yolla, intraserebroventriküler (i.c.v.), uygulanan CDP-kolin'in akut ağrı modelinde doz ve zamana bağlı olacak şekilde analjezik etki gösterdiği ortaya konmuştur (11). CDP-kolin'in bu etkisine kolin ve santral kolinerjik aktivasyonun yanında supraspinal α_7 nAChR'i ile birlikte opioidler ve gabaerjik reseptörler de aracılık etmektedir (137). Yine laboratuvarımızda deneysel inflamatuvar ve nöropatik ağrı

modellerinde de santral uygulanan CDP-kolin'in analjezik etkisi araştırılmış ve bu modellerde de CDP-kolin doz ve zamana bağlı olacak şekilde antihiperalezik etki göstermiştir (12). Bu ağrı modellerinde de CDP-kolin'in antihiperalezik etkisine santral α_7 nAChR'i ile birlikte opioidlerjik ve gabaerjik reseptörler aracılık etmiştir. Bir başka çalışmamızda da CDP-kolin inflamatuvar ağrı modelinde lokal yolla uygulanmış ve bu çalışmada lokal yolla uygulanan bir α_7 nAChR agonistinin antihiperalezik etki gösterdiği ilk defa rapor edilmiştir (13).

Ağrı çalışmalarından elde edilen bu bulgular CDP-kolin'in ağrı tedavisinde umut verici bir ajan olabileceğini göstermektedir. Biz de bu çalışmamızda, nöropatik ağrıda önemli bir santral yapı olan amigdalada CDP-kolin'in olası analjezik ve antihiperalezik etkilerini araştırarak bu konudaki bilgi birikimine katkıda bulunmayı amaçladık.

GEREÇ VE YÖNTEM

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

Uludağ Üniversitesi Hayvan Bakımı ve Kullanımı Etik Komitesi, çalışmadaki tüm cerrahi ve deneysel işlemlere onay verdi.

(Onay no: 18.10.2011-11/ 03 nolu karar)

1. Cerrahi ve Deneysel İşlemler

1.1. Kanül İmplantasyonu

Kanül implantasyonu, sevofluran (%2-4,%100 O₂) anestezisi altında sıçanların sağ santral amigdala nükleusuna (CeA) kılavuz kanülü yerleştirilerek yapıldı. Kılavuz kanül yerleştirmek amacıyla, sıçanlar stereotaksik alete yerleştirildi. Cerrahi işlem yapılacak bölgede sıçanların kafasına orta hattın cilt ve cilt altı dokular geçilerek insizyon yapıldı. Bu bölgede, kanama kontrol altına alındı ve fasyalar uzaklaştırılıp bregma görünür hale getirildi. Kafatası bölgesinin steril gazlı bezle kurutulmasından sonra bregma referans noktası kabul edilerek sıçan beyin atlasından (The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates, George Paxinos and Charles Watson, 1986) yardım alınarak koordinatlar belirlendi (bregmaya göre A: -2.3 mm; L: 4.7 mm; V: -8.5 mm). Buna göre önce uygun bir aparat ile kafatasına küçük bir delik açıldı ve takiben orta hattın 4.7 mm laterali ile bregmanın 2.3 mm arkasında kesişen nokta delici yardımı ile delindi. Bu delikten sağ CeA'a 21-gauge'luk (21G) hipodermik paslanmaz çelik iğneden kesilerek hazırlanmış el yapımı kılavuz kanül, alt ucu kafatası yüzeyinden 3.5 mm kadar derinliğe

inecek şekilde dik olarak yerleştirildi. Kafatası yüzeyinde kalan üst kısım dişi akriliği (Zinc polycarboxylate cement, Adhesor Carbofine, SpofaDental a.s., Praha) ile kafatasına sabitlendi. Deney gününe kadar tıkanmaması için kanülün ucu hazırlanan bir tıpa ile kapatıldı (Şekil- 11). Cerrahi işlemin sonunda her kafeste bir sıçan olacak şekilde deney gününe kadar bakım odasında tutuldu. Kanülasyon sonrasında 7. gün deney yapıldı.

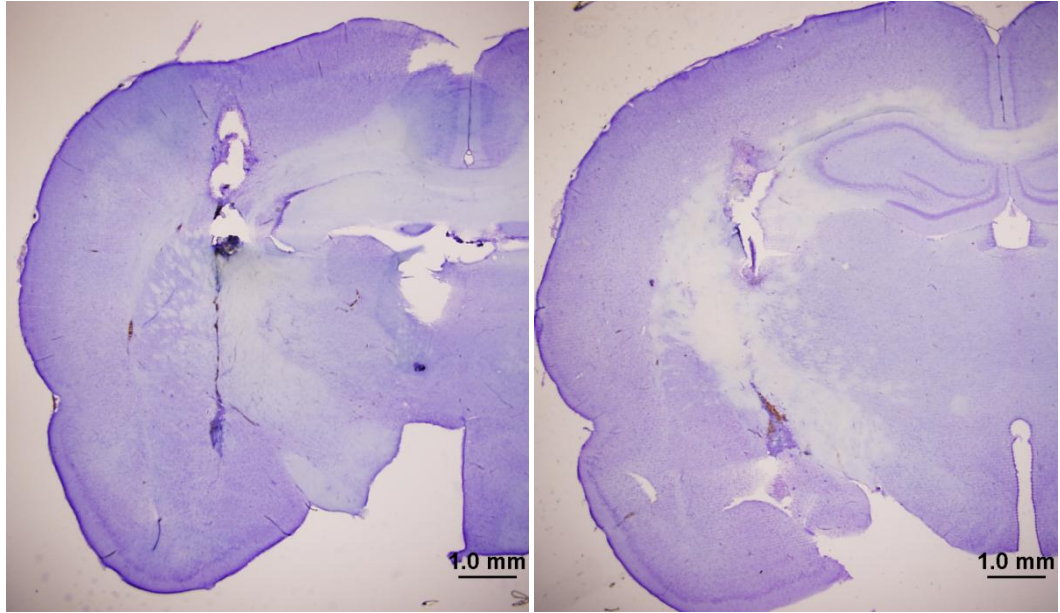


Şekil- 11: kanül implantasyonu

1.2. Kanül Yerleşiminin Histolojik Olarak Belirlenmesi

Çalışmalarda kullanılan deney hayvanlarına uygulanan kanüllerin yerleşimlerinin uygunluğu histolojik olarak değerlendirildi. Bu amaçla, son farmakolojik uygulamayı takiben, deneylerde kullanılan tüm deney hayvanların derin anestezi altında dekapitasyon ile kurban edildi. Kafatası kemikleri açılarak çıkartılan beyinler fosfat tamponlu %4'lük paraformaldehid (Sigma-Aldrich, Steinheim, Almanya) içerisinde +4°C'de 3 gün süre ile fiksasyona tabi tutuldu. Fiksasyonu takiben beyinlerden vibratom ile 50 mikrometre'lik koronal seri kesitler alındı. Seri kesitlerin alındığı beyin alanları, Bregma -1.56 mm ile Bregma -2.76 mm koordinatları arasında, rostro-kaudal düzlemde CeA'nın tümünü kapsayacak şekilde belirlendi. Her

denek için, alınan kesitlerin tümü lamlara yerleştirilerek kurutuldu. Kesitler %1'lik krezil viyole asetat (Acros Organics, New Jersey, NY, CAS No: 10510-54-0) solüsyonunda 5 dakika süreyle boyandı. Yüzde 50, %70 ve %96'lık etanol serilerinde dehidrete edilen kesitlere absolu etanolde diferansiyasyon uygulandı ve DPX kapama medyumunu (BDH Laboratory Supplies, Poole, İngiltere) ile kapatıldı. Elde edilen preparatlar Olympus BX-50 araştırma mikroskopunda X1,25, X4 ve X10 objektifler kullanılarak incelendi. İncelemelerde kanül trasesi bulunarak trasenin en ventral sonlanma noktasının CeA'a erişimi değerlendirildi. Doğru koordinatlarda yerleşim gösteren (Şekil-12a) deney hayvanlarına ait data, sonuçların değerlendirilmesinde kullanılırken, yanlış yerleşimli kanül içeren deney hayvanlarından (Şekil-12b) elde edilen data değerlendirme dışı tutuldu.



Şekil- 12a: CeA'a uygun yerleşim

Şekil- 12b: CeA'a yanlış yerleşim

1.3. Akut Ağrı Modeli

Akut ağrının test edilmesinde kanülasyonu takiben, deneysel olarak mekanik pençe testi kullanılmak suretiyle, bu test cihazının oluşturduğu ağrılı uyarana verilen cevap değerlendirildi.

Akut ağrı modelinde her iki arka pençeden de ölçümler alınarak iki pençenin ortalama değeri olarak verildi. 10 dakika ara ile ardışık olarak alınan ilk üç ölçümün ortalaması kontrol değerleri olarak kaydedildi. Daha sonra akut ağrı modelinde ilaç enjeksiyonları yapıldı ve takiben ölçümler 5, 10, 15, 20, 30, 40. dakikalarda alındı.

1.4. Nöropatik Ağrı Modeli

Sıçanlarda nöropatik ağrı oluşturmak amacıyla Bennett modeli kullanılarak siyatik sinir ligasyonu (CCI) yapıldı. Bu amaçla eter anestezisi altında sıçanların sol uyluk bölgesi açılarak siyatik sinir, 4.0 kromik katgüt aracılığıyla 1 mm aralıkla iki kez hafifçe ligatüre edildi. Kesi 4.0 ipek iplikle kapatıldı. Cerrahi işlem sonunda sıçanlar her kafeste bir sıçan olacak şekilde deney gününe kadar bakım odasında tutuldu. CCI operasyonunu takip eden 7. gün, sevofluran anestezisi altında sıçanların sağ amigdalalarının CeA nukleusuna (bregmaya göre A: -2.3 mm; L: 4.7 mm; V: -8.5 mm) kılavuz kanül (21G hipodermik paslanmaz çelik iğneden hazırlanmış, el yapımı) yerleştirildi. Sıçanlar kanülasyondan 7 gün sonra deneye alındılar.

Nöropatik ağrı modelinde her iki arka pençeden de ölçümler alındı. Sol pençenin 10 dakika ara ile ardışık olarak alınan ilk üç ölçümün ortalaması CCI öncesi kontrol değerleri olarak kaydedildi. Daha sonra ilaç enjeksiyonun yapıldığı 14. gün alınan sol pençe değeri CCI sonrası kontrol değerleri olarak kaydedildi. İlaç enjeksiyonu takiben ölçümler 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50 ve 60. dakikalarda alındı.

2. Deney Planı

Birinci seri çalışmada; akut ağrı modeli uygulanan sıçanlara amigdalanın santral nukleusuna (intraCeA) CDP-kolin (1 µmol/0.5 µl) enjekte edilerek mekanik pençe çekme testinde ağrı eşikleri değerlendirildi. Bu amaçla, bu grupta toplam 12 sıçan kullanıldı. Kullanılan CDP-kolin daha önce laboratuvarımızda yapılan çalışmalardan seçilmiştir (11,12).

İkinci seri çalışmada; nöropatik ağrı modeli uygulanan sıçanlarda, CCI'dan 14 gün sonra CDP-kolin (1 µmol/0.5 µl; intraCeA) verilerek mekanik

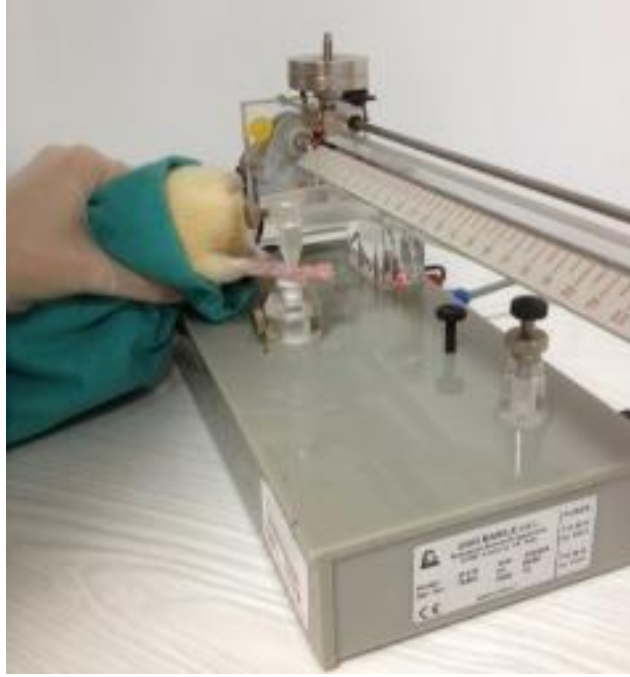
pençe çekme testinde ağrı eşikleri değerlendirildi. Bu amaçla, bu grupta toplam 12 sıçan kullanıldı.

Üçüncü seri çalışmada; CDP-kolin'in hidroliz ürünleri olan kolin ve sitidin'in CCl ile oluşturulmuş nöropatik ağrıdaki antihiperalezik etkileri araştırıldı. CCl'dan 14 gün sonra, eşmolar dozlardaki kolin (1 $\mu\text{mol}/0.5 \mu\text{l}$; intraCeA) ve sitidin (1 $\mu\text{mol}/1 \mu\text{l}$; intraCeA) uygulanarak antihiperalezik etkileri değerlendirildi. (Çalışmada 0.5 μl ' de çözülemediği için sadece sitidin 1 μl kullanıldı). Bu amaçla, bu grupta toplam 18 sıçan kullanıldı.

Dördüncü seri çalışmada, çeşitli antagonistler kullanılarak amigdalanın santral nukleusuna uygulanan CDP-kolin'in CCl ile oluşturulmuş nöropatik ağrıdaki antihiperalezik etkisine aracılık eden ve amigdalada yer alan mekanizmalar araştırıldı. Bunun için sıçanlara CCl'dan 14 gün sonra, selektif olmayan muskarinik kolinerjik reseptör antagonisti atropin sülfat (1 $\mu\text{g}/0.5 \mu\text{l}$), selektif olmayan nikotinik kolinerjik reseptör antagonisti mekamilamin (3 $\mu\text{g}/10 \mu\text{l}$), α_7 nACh reseptör antagonisti metillikakonitin (10 $\mu\text{g}/0.5 \mu\text{l}$), selektif olmayan opioid reseptör antagonisti nalokson (1 $\mu\text{g}/0.5 \mu\text{l}$), spesifik GABA_B reseptör antagonisti CGP-35348 (3 $\mu\text{g}/0.5 \mu\text{l}$), selektif metabotropik glutamat grup II antagonist LY 341495 (5 $\mu\text{g}/0.5 \mu\text{l}$), selektif olmayan serotonin reseptör antagonisti metiserjid (5 $\mu\text{g}/0.5 \mu\text{l}$) veya tuzlu su (0.5 μl) intra-CeA yolla enjekte edildi. 15 dakika sonra CDP-kolin (1 $\mu\text{mol}/0.5 \mu\text{l}$; intra-CeA) veya tuzlu su (0.5 μl ; intra-CeA) enjekte edilerek mekanik pençe çekme eşiği değerlendirildi. Bu amaçla, bu grupta toplam 76 sıçan kullanıldı. Araştırmamızda kullandığımız bütün antagonist maddelerin dozları başta ağrı olmak üzere benzer fonksiyonların araştırıldığı, ilaçların amigdalaya mikroenjeksiyon yoluyla uygulandığı ve etkili olduğunun gösterildiği çalışmalardan seçilmiştir (169-177).

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

Bu çalışmada CDP-kolin'in akut ağrı üzerine etkisi mekanik pençe çekme testi kullanılarak değerlendirildi. Bunun için Randall-Sellitto test cihazı-analjezimetre (Ugo- Basile, Comerio, VA, İtalya) kullanıldı (Şekil-13).



Şekil- 13: Randall-Selitto test cihazı

3.1. Mekanik Pençe Çekme Testi

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

sıçanlar aynı kafese konulup, adaptasyonları sağlandı. İlaç enjeksiyonlarını takiben ölçümler 5, 10, 15, 20, 30 ve 40. dakikalarda alındı.

4. CDP-kolin'in Nöropatik Ağrı Üzerine Etkisinin Değerlendirilmesi

Bu çalışmada CDP-kolin'in nöropatik ağrı üzerine etkisi mekanik yolla değerlendirildi. Bunun için akut ağrı modelinde olduğu gibi Randall-Sellitto test cihazı-analjezimetre (Ugo- Basile, Comerio, VA, İtalya) kullanıldı. 10 dakika ara ile ardışık olarak alınan üç ölçümün ortalaması CCI öncesi kontrol değeri olarak kaydedildi. Deney günü sıçanların ortama adaptasyonlarını sağlamak amacıyla, yukarıda bahsedilen şekilde sıçanlar aynı kafese konulup, adaptasyonları sağlandı. İlaç enjeksiyonundan önce onar dakika ara ile alınan üç ölçümün ortalaması da, CCI sonrası kontrol değerleri olarak kaydedildi. İlaç enjeksiyonlarını takiben ölçümler 5,10,15,20,30,40,50 ve 60. dakikalarda alındı.

5. İlaçlar ve intra-CeA'a Enjeksiyon

Çalışmada kullanılan CDP-kolin ve nalokson hidroklorid dihidrat Fluka (Fluka Chemie GmbH, İsviçre); kolin klorür, atropin sülfat, mekamilamin hidroklorid, metillicakonitin sitrat (MLA), CGP-35348 ve metiserjid maleat Sigma (Sigma Chem. Co., MO, ABD); sitidin ve LY341495 Acros (Acros Organics, Geel, Belçika) firmasından temin edildi. Deneylerde kullanılan ilaçlar tuzlu su (%0.9 NaCl) içinde hazırlandı. Amigdalanın CeA nukleusuna enjeksiyonlar bu bölgeye daha önce yerleştirilmiş olan kılavuz kanül içine yerleştirilen, kılavuz kanülün ucundan 4 mm kadar çıkacak şekilde ayarlanmış olan ve 25G iğneden hazırlanmış bir enjeksiyon kanülü ve ondan da 1 mm çıkan kapiller membran aracılığı ile yapıldı. Enjeksiyon kanülü 10 µl'lik Hamilton mikroenjektörüne 3 µl hacimde ilaç veya tuzlu su içeren PE–20 kateter içindeki kapiller membran aracılığı ile takıldı. Daha sonra infüzyon pompası yardımı ile 0.5 µl hacmindeki ilaç veya tuzlu su, 1 dakika boyunca

uygulandı. Enjeksiyon kanülü 1 dakika kadar daha yerinde bırakılarak ilacın geri gelmesi önlenmiş oldu.

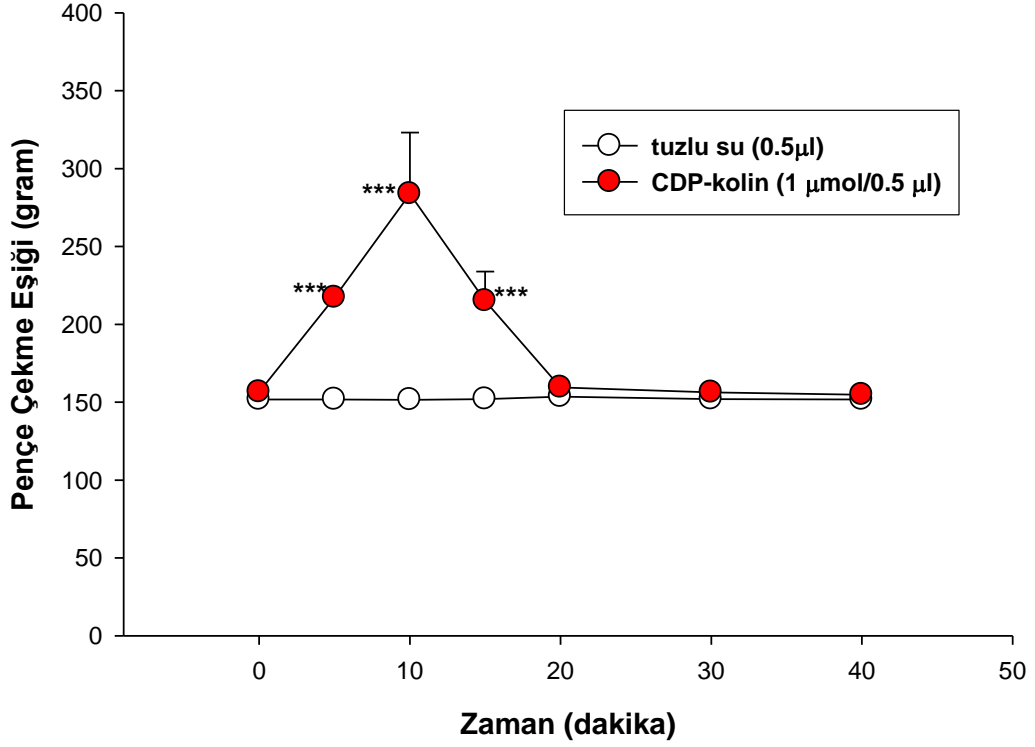
6. İstatistiksel Değerlendirmeler

Çalışmada istatistiksel işlemlerde SigmaStat® (versiyon 2.03) bilgisayar programı kullanıldı. İstatistiksel değerlendirmeler tek yönlü ANOVA'yı takiben Student-Newman-Keuls test kullanılarak yapıldı. Elde edilen veriler "ortalama ± standart hata" şeklinde verildi. Anlamlılık P değeri ile gösterilerek, karşılaştırılan gruplar arasındaki değerlerin istatistiksel ölçüsü olarak sunuldu. P'nin 0.05'den küçük olduğu değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. *** $P < 0,001$; ** $P < 0,01$; * $P < 0,05$ ifade etmektedir.

BULGULAR

1. Amigdala'ya Uygulanan CDP-kolin' in Akut Ağrı Üzerine Etkisi

Amigdala'nın CeA nukleusuna uygulanan CDP-kolin'in sıçanlarda akut ağrıdaki analjezik etkisi, mekanik pençe çekme testi kullanılarak araştırıldı. Mekanik pençe çekme testinde deneye alınan bütün sıçanların, deney öncesi kontrol pençe çekme yanıtı eşik değerleri ortalaması 154.1 ± 1.1 g (n=12) olarak ölçüldü. Takiben sıçanlara CDP-kolin (1 μ mol/0.5 μ l; intraCeA) veya tuzlu su (0.5 μ l; intraCeA) enjekte edildi. CDP- kolin mekanik pençe çekme testinde, pençe çekme eşiği üzerinde zamana bağlı olacak şekilde istatistiksel olarak anlamlı analjezik etki meydana getirdi (Şekil–14). CDP-kolin'in analjezik etkisi enjeksiyonu takiben 10. dakikada en yüksek değerine ulaştı [284.7 ± 39.3 g (n=6)]. Analjezik etki, CDP-kolin uygulamasını takiben 20. dakikada geri döndü. (Şekil–14).



Şekil-14: Akut ağrı modelinde, CDP-kolin'in (1 µmol/0.5 µl;intraCeA) mekanik pençe çekme testindeki analjezik etkisi.

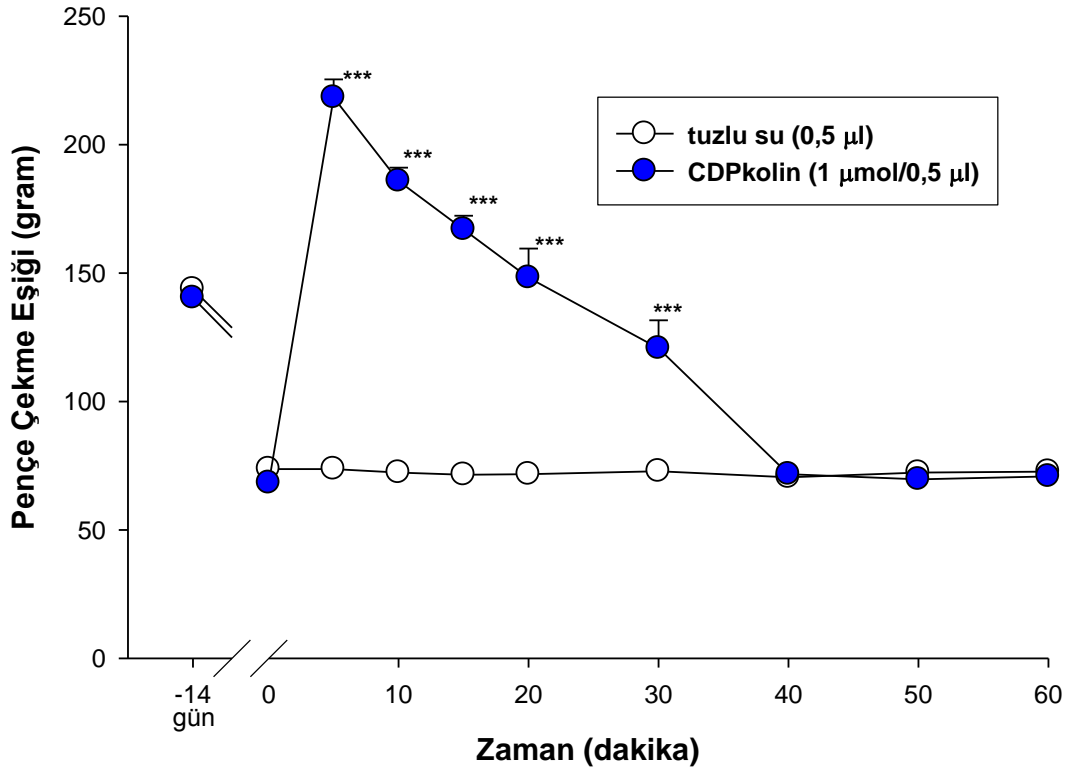
Mekanik pençe çekme testinde, kontrol pençe çekme yanıtı eşik değerleri alındıktan sonra, CDP-kolin (1 µmol/0.5 µl; intraCeA) ya da tuzlu su (0.5 µl; intraCeA) enjekte edildi. Takiben 5,10,15,20,30 ve 40. dakikalarda pençe çekme yanıtı eşik değerleri ölçüldü. Değerler 6 sıçanın ortalama ± standart hatası olarak verildi. İstatistiksel değerlendirmeler tek yönlü ANOVA'yı takiben Student-Newman-Keuls testi ile yapıldı. ***p<0.001; tuzlu su grubuna göre anlamlı farkı göstermektedir

2. Amigdala'ya Uygulanan CDP-kolin' in Nöropatik Ağrı Üzerine Etkisi

Amigdala'nın CeA nukleusuna uygulanan CDP-kolin'in sıçanlarda CCI ile oluşturulan nöropatik ağrıdaki antihiperalezik etkisi, mekanik pençe çekme testi kullanılarak araştırıldı. Mekanik pençe çekme testinde deneye alınan bütün sıçanların CCI yapılmadan, deney öncesi kontrol pençe çekme yanıtı eşik değerleri ortalaması sol pençe için 142.0 ± 1.1 g, sağ pençe için 139.5 ± 0.9 g (n=12) olarak ölçüldü. Aynı sıçanların sol pençeye CCI uygulandıktan 14 gün sonraki kontrol pençe çekme yanıtı eşik değerleri ortalaması sol pençe için 7.0 ± 1.1 g, sağ pençe için 139.4 ± 0.9 g (n=12)

olarak kaydedildi. Takiben CDP-kolin (1 µmol/0.5 µl; intraCeA) veya tuzlu su (0.5 µl; intraCeA) uygulandı.

CDP-kolin mekanik pençe çekme testinde, sol pençe üzerinde zamana bağlı olacak şekilde istatistiksel olarak anlamlı antihiperalezik etki meydana getirdi (Şekil-15). CDP- kolin'in antihiperalezik etkisi enjeksiyonu takiben 5. dakikada en yüksek değerine ulaştı [1 µmol/0.5 µl dozlarında pençe çekme yanıtı eşik değerleri CCl uygulanan sol pençe için; 218.3 ± 7.0 g (n=6)]. Antihiperalezik etki, 1 µmol CDP-kolin uygulamasını takiben 40. dakikada geri döndü (Şekil –15)



Şekil-15: Nöropatik ağrı modelinde CDP-kolin'in (1 µmol/0.5 µl; intraCeA) mekanik pençe çekme testindeki antihiperalezik etkisi

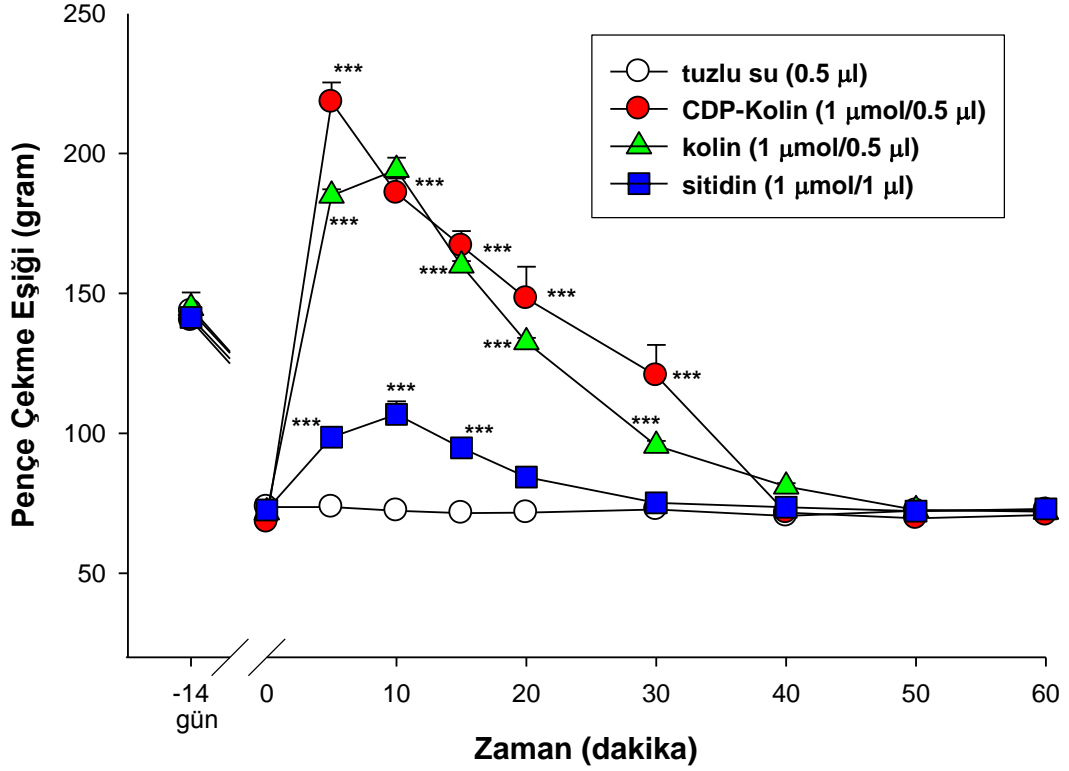
Mekanik pençe çekme testinde, kontrol pençe çekme yanıtı eşik değerleri alındıktan sonra sol arka pençeye CCl yapıldı. 14 gün sonra kontrol pençeçekme yanıtı eşik değerleri tekrar alındı. Takiben CDP-kolin (1 µmol/0.5 µl; intraCeA) ya da tuzlu su (0.5 µl; intraCeA) uygulanarak 5,10,15,20,30,40,50 ve 60. dakikalarda pençe çekme yanıtı eşik değerleri ölçüldü. Değerler 6 sıçanın ortalama ± standart hatası olarak verildi. İstatistiksel değerlendirmeler tek yönlü ANOVA'yı takiben Student-Newman-Keuls testi ile yapıldı. ***p<0.001; tuzlu su grubuna göre anlamlı farkı göstermektedir.

3. Amigdala'ya Uygulanan Eşmolar Dozlardaki Kolin ve Sitidin'in Nöropatik Ağrı Üzerine Etkisi

CDP-kolin'in hidroliz ürünleri olan kolin ve sitidin'in, CCl ile oluşturulan nöropatik ağrı modelindeki antihiperalezik etkilerini araştırmak amacıyla sıçanlara 0.5 µl tuzlu su içinde hazırlanan CDP-kolin (1 µmol), kolin (1 µmol), sitidin (1 µmol) veya tuzlu su (0.5 µl) intraCeA yolla uygulandı, takiben mekanik pençe çekme testi kullanılarak antihiperalezik etkileri araştırıldı.

Mekanik pençe çekme testinde deneye alınan bütün sıçanların CCl yapılmadan, deney öncesi kontrol pençe çekme yanıtı eşik değerleri ortalaması sol pençe için 142.5 ± 1.4 g, sağ pençe için 139.3 ± 0.6 g (n=22) bulundu. Aynı sıçanların CCl sol pençeye uygulanmasından 14 gün sonraki kontrol pençe çekme yanıtı eşik değerleri ortalaması sol pençe için 71.5 ± 0.7 g, sağ pençe için 139.5 ± 0.5 g (n=22) olarak kaydedildi. Takiben sıçanlara CDP-kolin, kolin, sitidin veya tuzlu su CeA yolla enjekte edildi ve pençe çekme yanıtı eşik değerleri ölçüldü.

Mekanik pençe çekme testinde kolin (1 µmol; intraCeA) uygulanmasını takiben meydana gelen antihiperalezik etki, aynı dozda CDP-kolin (1 µmol; intraCeA) uygulamasından sonra görülen antihiperalezik etkiye benzerdi. Kolin uygulamasını takiben pençe çekme yanıtı esiği, 10. dakikada en üst düzeyine ulaştı [194.2 ± 4.3 g (n=5)]. Takiben CDP-kolin'e benzer şekilde etkisi azalarak 40. dakikada geri döndü. Sitidin (1 µmol; intraCeA) ise, pençe çekme yanıtı esiği değerlerinde 5, 10 ve 15. dakikalarda istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik oluşturdu. Sitidin, enjeksiyonunu takiben pençe çekme yanıtı esiği, 10. dakikada en üst düzeyine ulaştı [106.8 ± 4.6 g (n=5)] (Şekil–16).



Şekil-16: Amigdala'ya intraCeA yolla uygulanan eşmolar dozlardaki CDP-kolin, kolin ve sitidin'in, CCI ile oluşturulmuş nöropatik ağrı modelinde, mekanik pençe çekme testindeki antihiperalezik etkisi

Mekanik pençe çekme testinde, kontrol pençe çekme yanıtı eşik değerleri alındıktan sonra sol arka pençeye CCI yapıldı. 14 gün sonra kontrol pençe çekme yanıtı eşik değerleri tekrar alındı. Takiben CDP-kolin (1 µmol/0.5 µl; intraCeA), kolin (1 µmol/0.5 µl; V), sitidin (1 µmol/1 µl; intraCeA) veya tuzlu su (0.5 µl; intraCeA) uygulanarak 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50 ve 60. dakikalarda pençe çekme yanıtı eşik değerleri ölçüldü. Değerler 6 sıçanın ortalama ± standart hatası olarak verildi. İstatistiksel değerlendirmeler tek yönlü ANOVA'yı takiben Student-Newman-Keuls testi ile yapıldı. ***p < 0.001; tuzlu su grubuna göre anlamlı farkı göstermektedir.

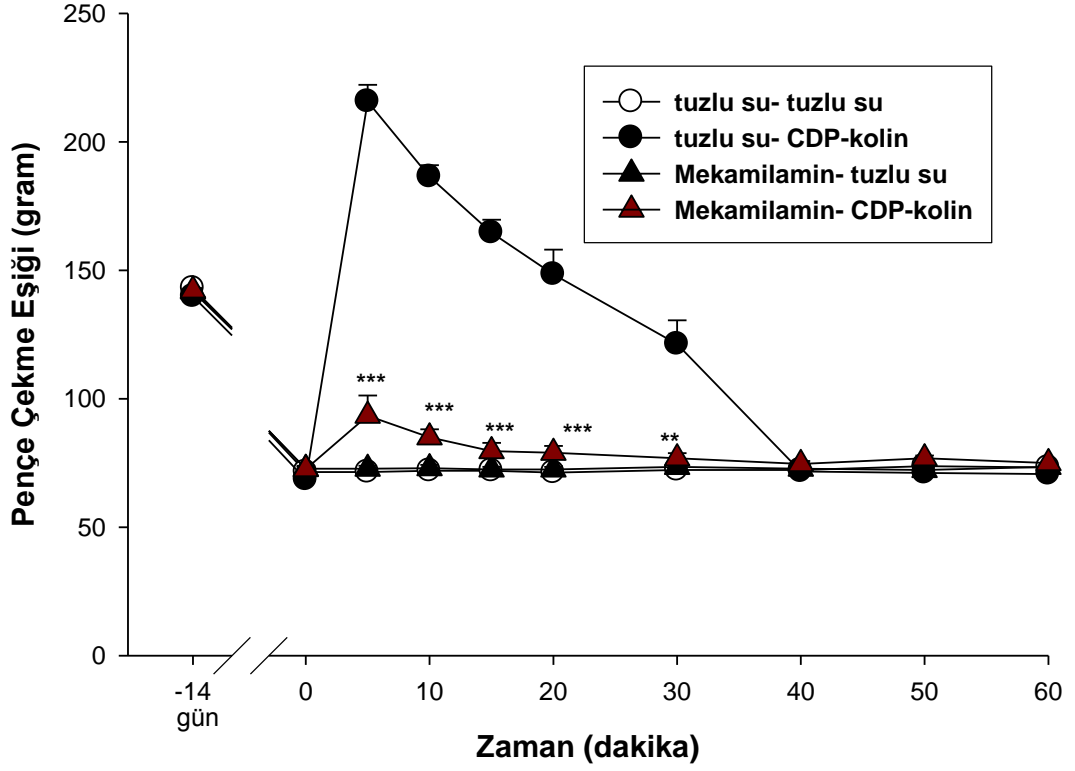
4. CDP-kolin'in Nöropatik Ağrıdaki Antihiperalezik Etkisinde Amigdala'ya Uygulanan Kolinerjik Reseptör Antagonist Ön Tedavilerinin Etkisi

Amigdala'nın CeA nukleusuna uygulanan CDP-kolin'in sıçanlarda CCI ile oluşturulan nöropatik ağrıdaki antihiperalezik etkilerine aracılık ettiği düşünülen kolinerjik reseptör tiplerinin araştırılması amacıyla, sıçanlara intraCeA yolla CDP-kolin (1 µmol/0.5 µl) veya tuzlu su (0.5 µl) enjeksiyonundan 15 dakika önce, kolinerjik muskarinik reseptör antagonisti

atropin sülfat (1 µg/0.5 µl; intraCeA), kolinerjik nikotirik reseptör antagonisti mekamilamin (3 µg/0.5 µl; intraCeA), α₇ nAChR antagonisti MLA (5 µg/0.5 µl; intraCeA) veya tuzlu su (0.5 µl; intraCeA) ön tedavileri uygulandı. Takiben CDP-kolin'in antihiperalezik etkisi, mekanik pençe çekme testi kullanılarak araştırıldı ve mekanik pençe çekme yanıtı eşik değerleri, ikinci enjeksiyondan sonra 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50 ve 60. dakikalarda ölçüldü. Mekanik pençe çekme testinde, tuzlu su veya CDP-kolin enjeksiyonu öncesi atropin, mekamilamin, MLA veya tuzlu su ön tedavisi uygulanan sıçanların CCI öncesi ortalama kontrol pençe çekme yanıtı eşik değerleri sol pençe için 139,9 ± 0,6 g, sağ pençe için 139,8 ± 0,5 g (n=38) olarak ölçüldü. Aynı sıçanların CCI sonrası ortalama kontrol pençe çekme yanıtı eşik değerleri sol pençe için 70,3 ± 0,4 g, sağ pençe için 139,8 ± 0,5 g (n=38) olarak ölçüldü. Tuzlu su ön tedavisini takiben CDP-kolin enjeksiyonunu yapılan sıçanların sol pençe çekme yanıtı esiği, 5. dakikada en üst düzeyine ulaştı [215.7 ± 6.4 g (n=5)]. Tuzlu su ön tedavisini takiben kontrol olarak intraCeA yolla tuzlu su uygulanan sıçanların mekanik sol pençe çekme yanıtı eşik değerleri ise aynı dakikada 71.5 ± 1.5 g (n=4) olarak ölçüldü. Buna göre tuzlu su sonrası CDP-kolin enjeksiyonu mekanik pençe çekme yanıtı eşik değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı bir artışa yol açtı (Şekil-17,18 ve19).

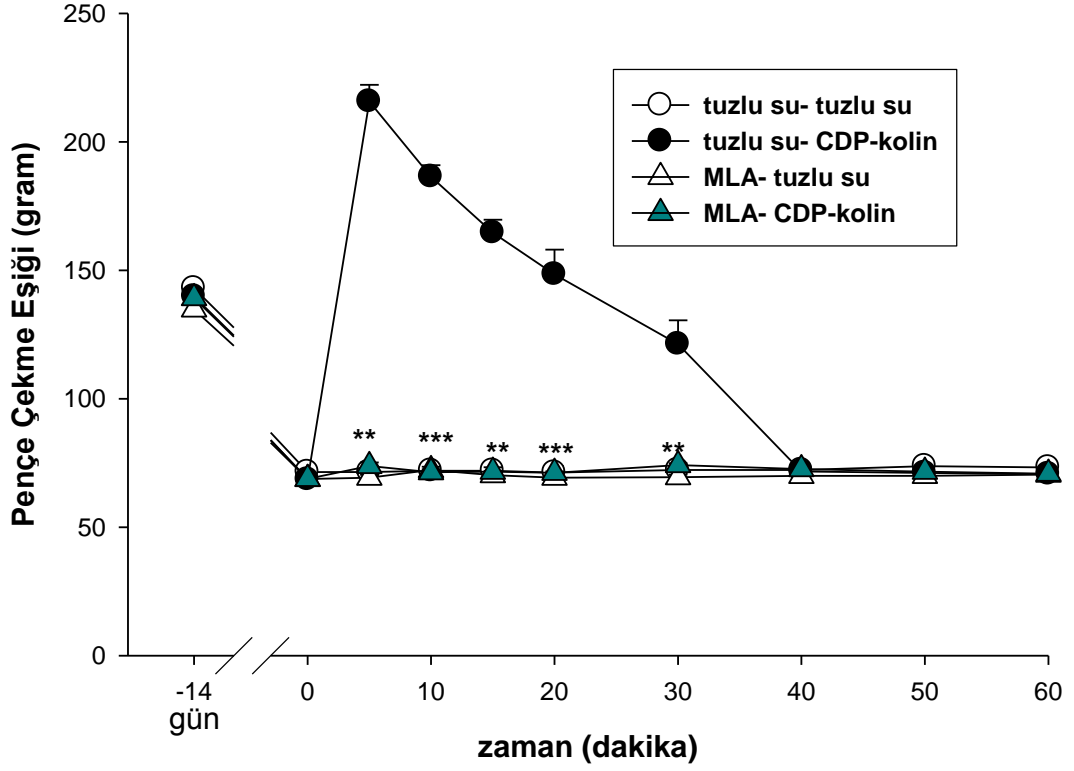
Atropin, mekamilamin ve MLA ön tedavileri sonrası CDP-kolin enjeksiyonu yapılan sıçanlarda sol pençe çekme yanıtı eşik değerleri 5. dakikada sırasıyla; 201.0 ± 2.4 (n=5); 93.4 ± 7.8 (n=5) ve 73.8 ± 1.3 g (n=5) olarak ölçüldü. Mekanik pençe çekme testinde de mekamilamin ve MLA ön tedavileri, CDP-kolin'in antihiperalezik etkisini hemen hemen tamamen önlerken (Şekil-17 ve 18), atropin ön tedavisi ise CDP-kolin'in antihiperalezik etkisini değiştirmede (Şekil-19).

Kolinerjik reseptör antagonistlerinden atropin, mekamilamin ve MLA ön tedavilerinin ise, tek başlarına mekanik pençe çekme yanıtı eşik değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı bir değişikliğe neden olmadığı saptandı (Şekil-17, 18 ve 19).



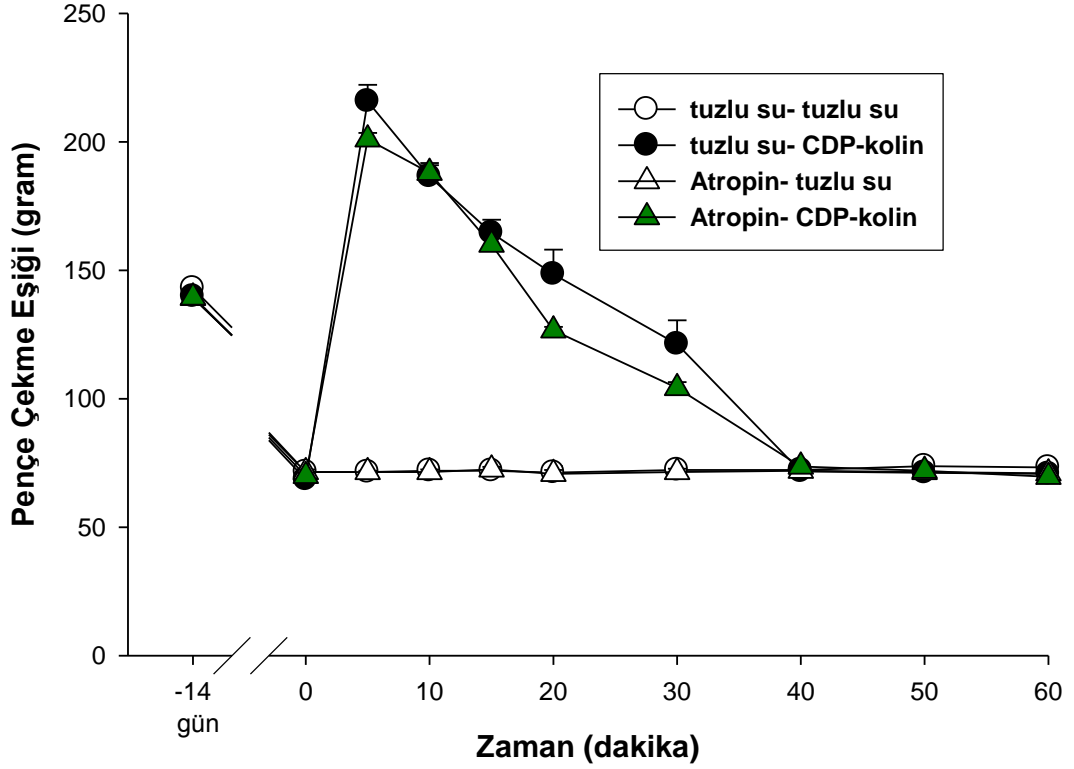
Şekil-17: Amigdala'ya intraCeA yolla uygulanan CDP-kolin'in CCI ile oluşturulmuş nöropatik ağrıdaki antihiperaljezik etkisinde mekamilamin ön tedavisinin etkisi

Mekanik pençe çekme testinde, kontrol pençe çekme yanıtı eşik değerleri alındıktan sonra sol arka pençeye CCI yapıldı. 14 gün sonra kontrol pençe çekme yanıtı eşik değerleri tekrar alındı. Takiben intraCeA yolla mekamilamin (3 µg / 0.5 µl) veya tuzlu su (0.5 µl) ön tedavileri uygulandı. 15 dakika sonra CDP-kolin (1 µmol / 0.5 µl; intraCeA) ya da tuzlu su (0.5 µl; intraCeA) enjekte edildi. İkinci enjeksiyondan sonra bir saat boyunca pençe çekme yanıtı eşik değerleri ölçüldü. Değerler 5 sıçanın ortalama ± standart hatası olarak verildi. İstatistiksel değerlendirmeler tek yönlü ANOVA'yı takiben Student Newman-Keuls testi ile yapıldı. **p<0.01 ve ***p<0.001; kontrole göre anlamlı farkı göstermektedir.



Şekil-18: Amigdala'ya intraCeA yolla uygulanan CDP-kolin'in CCI ile oluşturulmuş nöropatik ağrıdaki antihiperaljezik etkisinde MLA ön tedavisinin etkisi

Mekanik pençe çekme testinde, kontrol pençe çekme yanıtı eşik değerleri alındıktan sonra sol arka pençeye CCI yapıldı. 14 gün sonra kontrol pençe çekme yanıtı eşik değerleri tekrar alındı. Takiben intraCeA yolla MLA (10 µg / 0.5 µl;intraCeA) veya tuzlu su (0.5 µl) ön tedavileri uygulandı. 15 dakika sonra CDP-kolin (1 µmol / 0.5 µl;intraCeA) ya da tuzlu su (0.5 µl; intraCeA) enjekte edildi. İkinci enjeksiyondan sonra bir saat boyunca pençe çekme yanıtı eşik değerleri ölçüldü. Değerler 5 sıçanın ortalama ± standart hatası olarak verildi. İstatistiksel değerlendirmeler tek yönlü ANOVA'yı takiben Student Newman-Keuls testi ile yapıldı. **p<0.01 ve ***p<0.001; kontrole göre anlamlı farkı göstermektedir.



Şekil-19: Amigdala'ya intraCeA yolla uygulanan CDP-kolin'in CCI ile oluşturulmuş nöropatik ağrıdaki antihiperaljezik etkisinde atropin ön tedavisinin etkisi

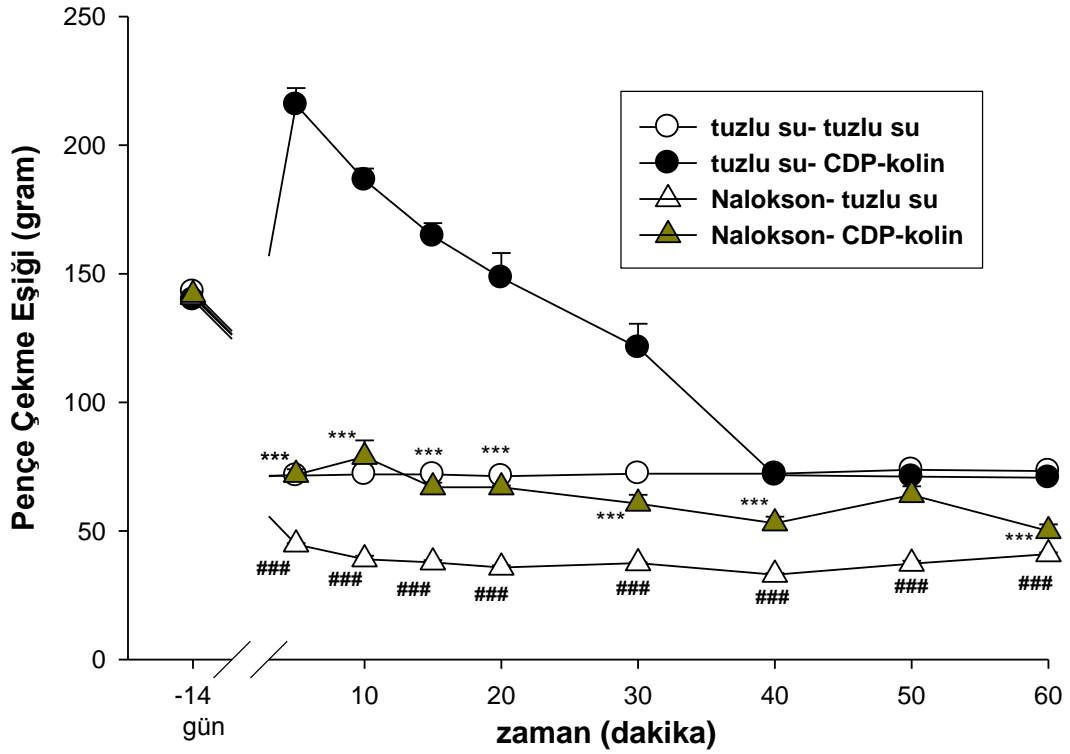
Mekanik pençe çekme testinde, kontrol pençe çekme yanıtı eşik değerleri alındıktan sonra sol arka pençeye CCI yapıldı. 14 gün sonra kontrol pençe çekme yanıtı eşik değerleri tekrarlandı. Takiben intraCeA yolla atropin (1 µg/0.5 µl) veya tuzlu su (0.5 µl) ön tedavileri uygulandı. 15 dakika sonra yolla CDP-kolin (1 µmol/0.5 µl;intraCeA) ya da tuzlu su (0.5 µl; intraCeA) enjekte edildi. İkinci enjeksiyondan sonra bir saat boyunca pençe çekme yanıtı eşik değerleri ölçüldü. Değerler 5 sıçanın ortalama ± standart hatası olarak verildi. İstatistiksel değerlendirmeler tek yönlü ANOVA'yı takiben Student Newman-Keuls testi ile yapıldı.

6. CDP-kolin'in Nöropatik Ağrıdaki Antihiperaljezik Etkisinde Amigdala'ya Uygulanan Nalokson Ön Tedavisinin Etkisi

Amigdala'nın santral nükleusuna uygulanan CDP-kolin'in nöropatik ağrı modelinde oluşturduğu antihiperaljezik etkide amigdalada yer alan opioid sistemini araştırmak amacıyla, seçici olmayan opioid reseptör antagonisti nalokson (1 µg / 0.5 µl) veya tuzlu su (0.5 µl) intraCeA yolla uygulandı. Takiben 15 dakika sonra sıçanlara CDP-kolin (1 µmol/0.5 µl; intraCeA) veya tuzlu su (0.5 µl;intraCeA) enjekte edildi. CCI ile oluşturulan

nöropatik ağrıdaki CDP-kolin'in antihiperalezik etkisi, sıçanlarda mekanik pençe çekme testi kullanılarak araştırıldı. Mekanik pençe çekme yanıtı eşik değerleri, ikinci enjeksiyondan sonra 60 dakika boyunca ölçüldü.

Mekanik pençe çekme testinde deneye alınan bütün sıçanların CCI öncesi ortalama kontrol pençe çekme yanıtı eşik değerleri sol pençe için 141.2 ± 0.7 g ve sağ pençe için 140.3 ± 0.7 g (n=20) olarak bulundu. Aynı sıçanların CCI sonrası ortalama kontrol pençe çekme yanıtı eşik değerleri sol pençe için $70,3 \pm 0,6$ g ve sağ pençe için $139,4 \pm 0,7$ g (n=20) olarak ölçüldü. Nalokson ön tedavisini takiben CDP-kolin uygulanan sıçanlarda sol pençe çekme yanıtı eşik değerleri 5. dakikada 71.8 ± 2.1 g (n=5) iken tuzlu su ön tedavisi yapılan grupta ise aynı dakikada 215.7 ± 6.4 g (n=7) olarak ölçüldü. Elde edilen sonuçlara göre nalokson ön tedavisi mekanik pençe çekme testinde, CDP-kolin ile ortaya çıkan antihiperalezik etkiyi tamamen önledi ve 20. dakikadan itibaren de kontrol değerlerinin altına düşürdü (Şekil-20). Nalokson ön tedavisi tek başına mekanik pençe çekme yanıtı eşik değerlerini ise istatistiksel olarak anlamlı şekilde düşürdü ve bu değer 5. dakikada 44.7 ± 0.4 g olarak ölçüldü (Şekil-20).



Şekil-20: Amigdala'ya intraCeA yolla uygulanan CDP-kolin'in CCI ile oluşturulmuş nöropatik ağrıdaki antihiperaljezik etkisinde nalokson ön tedavisinin etkisi

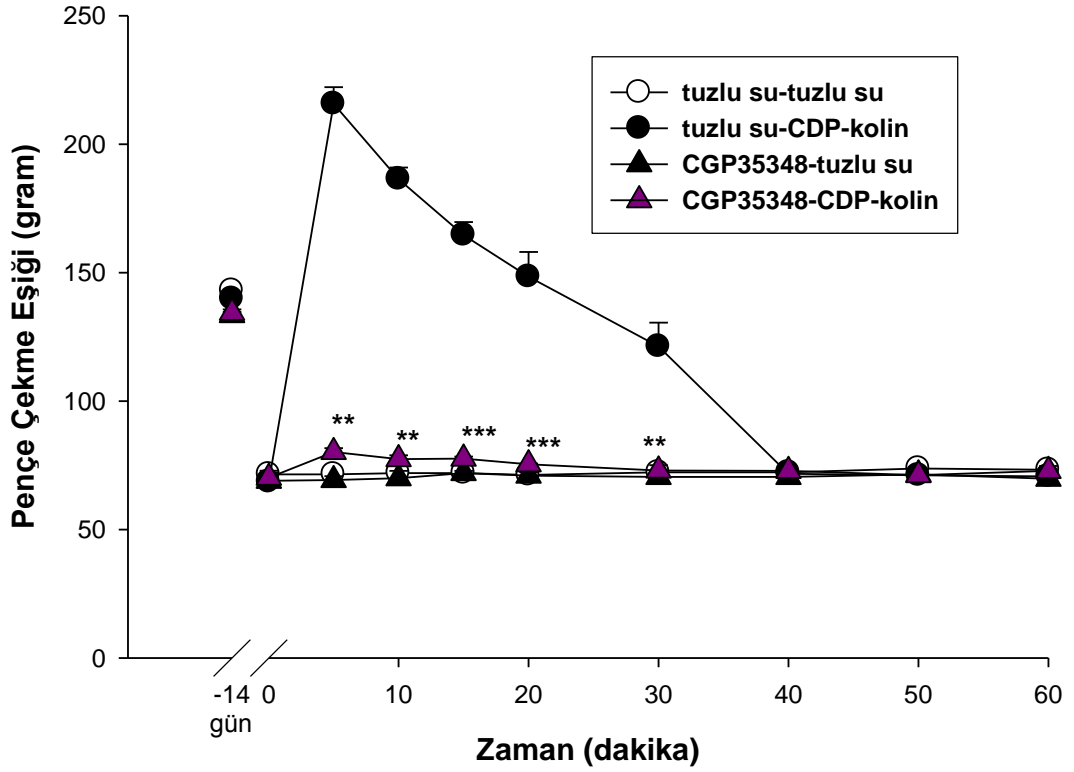
Mekanik pençe çekme testinde, kontrol pençe çekme yanıtı eşik değerleri alındıktan sonra sol arka pençeye CCI yapıldı. 14 gün sonra kontrol pençe çekme yanıtı eşik değerleri tekrar alındı. Takiben intraCeA yolla nalokson (1 µg / 0.5 µl) veya tuzlu su (0.5 µl) ön tedavileri uygulandı. 15 dakika sonra CDP-kolin (1 µmol / 0.5 µl; intraCeA) ya da tuzlu su (0.5 µl intraCeA) enjekte edildi. İkinci enjeksiyondan sonra bir saat boyunca pençe çekme yanıtı eşik değerleri ölçüldü. Değerler 5 sıçanın ortalama ± standart hatası olarak verildi. İstatistiksel değerlendirmeler tek yönlü ANOVA'yı takiben Student Newman-Keuls testi ile yapıldı. ***p<0.001; kontrole göre; ### p<0.001; tuzlu suya göre anlamlı farkı göstermektedir

7. CDP-kolin'in Nöropatik Ağrıdaki Antihiperaljezik Etkisinde Amigdala'ya Uygulanan CGP-35348 Ön Tedavisinin Etkisi

Nöropatik ağrı modelinde amigdala'nın CeA nukleusuna uygulanan CDP- kolin'in oluşturduğu antihiperaljezik etkide amigdalada yer alan GABA_Berjik sistemin rolünü araştırmak amacı ile GABA_B reseptör antagonisti CGP-35348 (3 µg/0.5 µl; intraCeA) veya tuzlu su (0.5 µl; intraCeA) uygulanmasını takiben 15 dakika sonra aynı sıçanlara CDP-kolin (1 µmol/0.5 µl; intraCeA) veya tuzlu su (0.5 µl; intraCeA) uygulandı. CDP-kolin'in

antihiperalezik etkisi, mekanik pençe çekme testi kullanılarak araştırıldı ve pençe çekme yanıtı eşik değerleri, ikinci enjeksiyondan sonra 60 dakika boyunca ölçüldü.

Deneye alınan bütün sıçanların CCI öncesi ortalama kontrol pençe çekme yanıtı eşik değerleri sol pençe için 137.8 ± 1.1 g ve sağ pençe için 139.1 ± 1.0 g (n=20) olarak bulundu. Aynı sıçanların CCI sonrası ortalama kontrol mekanik pençe çekme yanıtı eşik değerleri ise sol pençe için 69.6 ± 0.9 g ve sağ pençe için 139.7 ± 0.9 g (n=20) olarak ölçüldü. CGP-35348 ön tedavisini takiben CDP-kolin uygulanan sıçanlarda sol pençe çekme yanıtı eşik değerleri 5. dakikada 80.2 ± 1.4 g (n=5) iken tuzlu su ön tedavisi yapılan grupta ise 215.7 ± 6.4 g (n=7) olarak ölçüldü. Bu sonuçlara göre mekanik pençe çekme testinde CGP-35348 ön tedavisi, CDP-kolin ile ortaya çıkan antihiperalezik etkiyi tamamen baskılarken tek başına CGP-35348 ön tedavisi, mekanik pençe çekme yanıtı eşik değerlerini değiştirmede (Şekil-21).



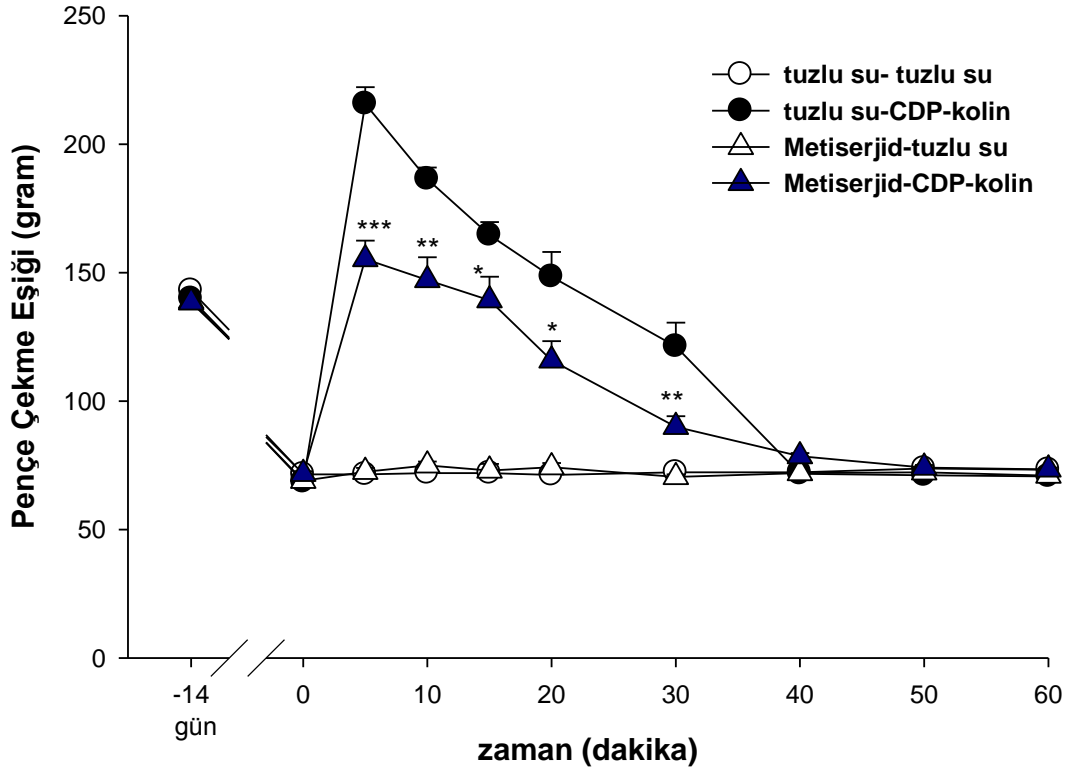
Şekil-21: Amigdala'ya intraCeA yolla uygulanan CDP-kolin'in CCI ile oluşturulmuş nöropatik ağrıdaki, mekanik pençe çekme testindeki antihiperalezik etkisinde CGP-35348 ön tedavisinin etkisi

Mekanik pençe çekme testinde, CCI öncesi kontrol pençe çekme yanıtı eşik değerleri alındıktan sonra sol arka pençeye CCI yapıldı. 14 gün sonra kontrol pençe çekme yanıtı eşik değerleri alındı. Takiben CGP-35348 (3 µg/0.5 µl; intraCeA) veya tuzlu su (0.5 µl; intraCeA) ön tedavileri uygulanmasını takiben 15 dakika sonra CDP-kolin (1 µmol / 0.5 µl; intraCeA) ya da tuzlu su (0.5 µl; intraCeA) enjekte edildi. İkinci enjeksiyondan sonra bir saat boyunca pençe çekme yanıtı eşik değerleri ölçüldü. Değerler 5 sıçanın ortalama ± standart hatası olarak verildi. İstatistiksel değerlendirmeler tek yönlü ANOVA'yı takiben Student Newman-Keuls testi ile yapıldı. **p<0.01 ve ***p<0.001; kontrole göre anlamlı farkı göstermektedir.

8. CDP-kolin'in Nöropatik Ağrıdaki Antihiperalezik Etkisinde Amigdala'ya Uygulanan Metiserjid Ön Tedavisinin Etkisi

Amigdala'nın CeA nukleusuna uygulanan CDP-kolin'in nöropatik ağrı modelinde oluşturduğu antihiperalezik etkide amigdalada yer alan serotonerjik sistemin rolünü araştırmak amacı ile seçici olmayan serotonin reseptör antagonisti metiserjid'in (5 µg/0.5 µl; intraCeA) veya tuzlu su (0.5 µl; intraCeA) uygulanmasını takiben 15 dakika sonra sıçanlara CDP-kolin (1

$\mu\text{mol}/0.5 \mu\text{l}$; intraCeA) veya tuzlu su ($0.5 \mu\text{l}$; intraCeA) uygulandı. Oluşturulan nöropatik ağrıdaki CDP-kolin'in antihiperalezik etkisi, sıçanlarda mekanik pençe çekme testli kullanılarak araştırıldı ve pençe çekme yanıtı eşik değerleri, ikinci enjeksiyondan sonra 60 dakika boyunca ölçüldü. Deneye alınan bütün sıçanların CCI öncesi ortalama kontrol mekanik pençe çekme yanıtı eşik değerleri sol pençe için $139.8 \pm 0.9 \text{ g}$ ve sağ pençe için $138.9 \pm 0.8 \text{ g}$ ($n=22$) olarak bulundu. Aynı sıçanların CCI sonrası ortalama kontrol pençe çekme yanıtı eşik değerleri sol pençe için $70.1 \pm 0.6 \text{ g}$ ve sağ pençe için $139.4 \pm 0.7 \text{ g}$ ($n=22$) olarak ölçüldü. Metiserjid ön tedavisini takiben CDP-kolin uygulanan sıçanlarda sol pençe çekme yanıtı eşik değerleri $155.2 \pm 7.1 \text{ g}$ ($n=7$) iken tuzlu su ön tedavisi yapılan grupta ise $215.7 \pm 6.4 \text{ g}$ ($n=7$) olarak ölçüldü. Bu sonuçlara göre mekanik pençe çekme testinde metiserjid ön tedavisi, CDP-kolin ile ortaya çıkan antihiperalezik etkiyi istatistiksel olarak anlamlı şekilde azalttı. Metiserjid ön tedavisi, tek başına mekanik pençe çekme yanıtı eşik değerlerini değiştirmedir (Şekil-22).



Şekil-22: Amigdala'ya intraCeA yolla uygulanan CDP-kolin'in CCI ile oluşturulmuş nöropatik ağrıdaki, mekanik pençe çekme testindeki antihiperalejik etkisinde Metiserjid ön tedavisinin etkisi

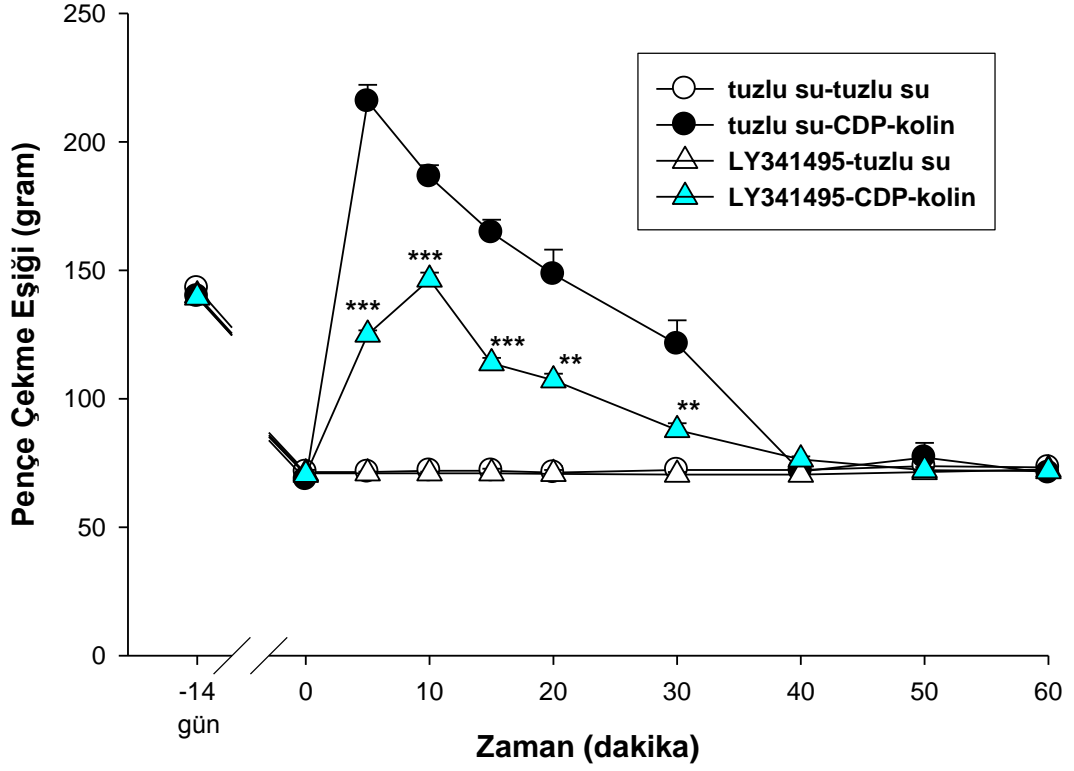
Mekanik pençe çekme testinde, CCI öncesi kontrol pençe çekme yanıtı eşik değerleri alındıktan sonra sol arka pençeye CCI yapıldı. 14 gün sonra kontrol pençe çekme yanıtı eşik değerleri alındı. Takiben metiserjid (5 µg / 0.5 µl; intraCeA) veya tuzlu su (0.5 µl; intraCeA) ön tedavileri uygulanmasını takiben 15 dakika sonra CDP-kolin (1 µmol/0.5 µl; intraCeA) ya da tuzlu su (0.5 µl; intraCeA) enjekte edildi. İkinci enjeksiyondan sonra bir saat boyunca pençe çekme yanıtı eşik değerleri ölçüldü. Değerler 5 sıçanın ortalama ± standart hatası olarak verildi. İstatistiksel değerlendirmeler tek yönlü ANOVA'yı takiben Student-Newman-Keuls testi ile yapıldı. *p<0.05, **p<0.01 ve ***p<0.001; kontrole göre anlamlı farkı göstermektedir.

9. CDP-kolin'in Nöropatik Ağrıdaki Antihiperalejik Etkisinde Amigdala'ya Uygulanan LY341495 Ön Tedavisinin Etkisi

Nöropatik ağrı modelinde amigdala'nın CeA nükleusuna uygulanan CDP-kolin'in meydana getirdiği antihiperalejik etkiye amigdalada yerleşmiş olan grup II metabotropik glutamaterjik reseptörlerin rolünün olup olmadığını araştırmak amacı ile metabotropik glutamat grup II reseptör antagonisti

LY341495 (5 µg / 0.5µl; intraCeA) veya tuzlu su (0.5 µl; intraCeA) enjekte edildi. Takiben 15 dakika sonra sıçanlara CDP-kolin (1 µmol/0.5 µl; intraCeA) veya tuzlu su (0.5 µl;intraCeA) uygulandı. Oluşturulan nöropatik ağrıdaki CDP-kolin'in antihiperalezik etkisi, sıçanlarda mekanik pençe çekme testli kullanılarak araştırıldı. Mekanik pençe çekme yanıtı eşik değerleri, ikinci enjeksiyondan sonra 60 dakika boyunca ölçüldü.

Deneye alınan bütün sıçanların CCI öncesi ortalama kontrol pençe çekme yanıtı eşik değerleri sol pençe için 140.4 ± 0.8 g ve sağ pençe için 138.7 ± 0.8 g (n=20) olarak bulundu. Aynı sıçanların CCI sonrası ortalama kontrol mekanik pençe çekme yanıtı eşik değerleri sol pençe için 70.1 ± 0.6 g ve sağ pençe için 139.9 ± 0.7 g (n=20) olarak ölçüldü. LY341495 ön tedavisini takiben CDP-kolin uygulanan sıçanlarda sol pençe çekme yanıtı eşik değerleri 5. dakikada 125.0 ± 1.6 g (n=5) iken tuzlu su ön tedavisi yapılan grupta ise 215.7 ± 6.4 g (n=7) olarak ölçüldü. Bu sonuçlara göre mekanik pençe çekme testinde LY341495 ön tedavisi, CDP-kolin ile ortaya çıkan antihiperalezik etkiyi istatistiksel olarak anlamlı şekilde azaltırken LY341495 ön tedavisi, tek başına mekanik pençe çekme yanıtı eşik değerlerini değiştirmede (Şekil–23).



Şekil-24: Amigdala'ya intraCeA yolla uygulanan CDP-kolin'in CCI ile oluşturulmuş nöropatik ağrıdaki, mekanik pençe çekme testindeki antihiperalezik etkisinde LY341495 ön tedavisinin etkisi

Mekanik pençe çekme testinde, CCI öncesi kontrol pençe çekme yanıtı eşik değerleri alındıktan sonra sol arka pençeye CCI yapıldı. 14 gün sonra kontrol pençe çekme yanıtı eşik değerleri alınmasını takiben LY341495 (5 µg/0.5 µl; intraCeA) veya tuzlu su (0.5 µl; intraCeA) ön tedavileri uygulandı. 15 dakika sonra CDP-kolin (1 µmol/0.5 µl; intraCeA) ya da tuzlu su (0.5 µl; intraCeA) enjekte edildi. İkinci enjeksiyondan sonra bir saat boyunca pençe çekme yanıtı eşik değerleri ölçüldü. Değerler 5 sıçanın ortalama ± standart hatası olarak verildi. İstatistiksel değerlendirmeler tek yönlü ANOVA'yı takiben Student-Newman-Keuls testi ile yapıldı. $p < 0.05$, $**p < 0.01$ ve $***p < 0.001$; kontrole göre anlamlı farkı göstermektedir.

TARTIŞMA ve SONUÇ

Çalışmamızdan elde edilen bulgular, amigdalanın santral nukleusu içine uygulanan CDP-kolin'in (1 µmol/0.5 µl) hem akut hem de nöropatik ağrı modellerinde zamana bağlı olacak şekilde analjezik ve antihiperalezik etki meydana getirdiğini göstermiştir (Şekil-14 ve 15). Nöropatik ağrı modelinde, intraCeA uygulanan eş molar dozda kolin, CDP-kolin'e benzer etki meydana getirirken (Şekil-16), eş molar dozda uygulanan sitidin ise daha hafif ama istatistiksel olarak anlamlı antihiperalezik etki oluşturmuştur (Şekil-16). Çalışmamızda CDP-kolin'in nöropatik ağrı modelinde meydana getirdiği antihiperalezik etki aynı bölgeye uygulanan mekamilamin, MLA, nalokson, CGP-35348, metiserjid ve LY341495 ön tedavileri ile azaltılırken (Şekil-17-23), atropin ön tedavisi CDP-kolin'in etkisini değiştirmemiştir (Şekil-19).

Çalışmamızda ilk olarak amigdalanın santral nukleusu içine uygulanan CDP-kolin'in analjezik etkisi akut ağrıda mekanik pençe çekme testi kullanılarak test edildi ve CDP-kolin (1 µmol/0.5 µl) akut ağrı modelinde analjezik etki meydana getirmiştir (Şekil-14). Kullanılan CDP-kolin dozu (1 µmol) farklı ağrı modellerinde CDP-kolin'in analjezik etkisinin değerlendirildiği daha önceki çalışmalardan seçilmiştir (11,12,137). Bu çalışmalarda CDP-kolin i.c.v yolla uygulanmıştır. Biz de çalışmamızda aynı dozu amigdalanın santral nukleusu içine uyguladık. Daha önceki çalışmalarla karşılaştırıldığında bizim bu çalışmamızda hem akut hem de nöropatik ağrı modelinde analjezik etkinin zaman profili daha önceki çalışmalara benzer bulunmuştur (11,13,137,178,179). Ayrıca çalışmamızdan elde ettiğimiz sonuçlar farklı kolinerjik agonistlerin amigdalaya enjeksiyonu ile elde edilen analjezik etkiler ile de uyumlu bulunmuştur (58,180). Amigdalanın akut ağrıdaki rolünü değerlendirdikten sonra aynı yolla uygulanan CDP-kolin'in antihiperalezik etkisi nöropatik ağrıda değerlendirilmiştir. Kronik siyatik sinir ligasyon metodu (CCI) kullanılarak oluşturulan nöropati modeli, yaygın olarak kullanılan bir nöropatik ağrı modelidir (181). Nöropatik ağrı modeli

kullanmamızın nedeni bu konuda daha önce yapılan çalışmalarda amigdalanın nöropatik ağrı regülasyonunda önemli rol oynadığının gösterilmesidir (62,71). Ayrıca yapılan çalışmalarda nöropatik ağrıda amigdalada belirgin yapısal değişiklikler de gözlenmiştir (5,62,63). Bu bulgular amigdalanın akut ağrıdan daha çok nöropatik ağrıda etkili bir yapı olduğunu desteklemektedir. Bu nedenle nöropatik ağrı modeli seçilmiş ve çalışmanın bundan sonraki aşamalarında bu model kullanılmıştır ve ilk olarak amigdalanın santral nukleusuna aynı dozda (1 µmol/0.5 µl) uygulanan CDP-kolin'in antihiperalezik etkisi hem CCI uygulanan nöropatili pençede ve hem de CCI uygulanmayan diğer pençede mekanik pençe çekme testi kullanılarak test edilmiştir ve elde edilen sonuçlara göre CDP-kolin daha önceki çalışmalarla uyumlu olacak şekilde nöropatili pençede antihiperalezik etki meydana getirmiş ancak kontralateral pençede bir etki görülmemiştir (12,179) (Şekil-15). Buna ek olarak çalışmamızdan elde edilen sonuçlara göre, amigdalanın santral nukleusu içine uygulanan CDP-kolin, akut ağrı modeli ile karşılaştırıldığında nöropatik ağrıda daha etkili bulunmuştur (Şekil-14 ve 15).

Dışarıdan uygulanan CDP-kolin'in sıçanlarda hızla hidrolize edilerek başlıca kolin ve sitidin metabolitlerine ayrıştığı bilinmektedir (138) ve CDP-kolin'in etkisinde rolü olan mekanizmaları aydınlatmak amacıyla ilk olarak bu metabolitler kullanılmıştır. CDP-kolin ile eş molar dozda (1 µmol) ve intraCeA olarak uygulanan kolin CDP-kolin'in antihiperalezik etkisine benzer etki göstermiştir ve mekanik pençe çekme testinde, pençe çekme yanıtı eşliğini kontrole göre anlamlı şekilde arttırmıştır (Şekil-16). Yapılan çalışmalar amigdalanın özellikle santral nukleusunun kolin asetiltransferaz immunoreaktivitesi gösteren liflerden yoğun olduğunu göstermiştir (182). Ayrıca amigdalaya yapılan karbakol mikroiinjeksiyonu da analjezik etki meydana getirmektedir (183). Buna ek olarak bu sonuç merkezi yolla uygulanan CDP-kolin'in analjezik ve antihiperalezik etkilerini araştırdığımız daha önceki çalışmalarımızla da uyumludur (11-13,137). Buna göre CDP-kolin kolinerjik mekanizmaların aktivasyonu ile antihiperalezik etki meydana getirmektedir ve CDP-kolin'in antihiperalezik etkisinin, seçici olmayan nikotinik kolinerjik reseptör antagonisti mekamilamin ile ortadan kaldırılması

da kolinerjik aktivasyonun CDP-kolin'in söz konusu etkisine aracılık ettiği görüşünü destekler niteliktedir (Şekil-18).

CDP-kolin'in diğer metaboliti olan sitidin de çalışmamızda eş molar dozda ve intraCeA yolla uygulanmış ve kolin kadar olmasa da istatistiksel olarak anlamlı bir antihiperalezik etki meydana getirmiştir (Şekil-16). Bu sonuç CDP-kolin'in analjezik ve antihiperalezik etkisinin farklı ağrı modellerinde araştırıldığı ve laboratuvarımızda yapılan daha önceki çalışmalarla da uyumlu bulunmuştur (11,12,18). Daha önce sıçanlarda nöropatik ağrı modeli kullanılarak yapılan çalışmada benzer sonuçlar bulunurken (12), akut ağrı modelleri kullanılarak merkezi yolla eşmolar dozda sitidin ve CDP-kolin uygulandığı çalışmada; sitidinin uygulamayı takiben bir miktar ağrı eşiğini yükselttiği, ancak istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik yapmadığı bulunmuştur (11). Buna ek olarak pürinerjik sistemin analjezideki rolü çeşitli çalışmalarda gösterilmiş, pürinerjik agonist uygulamasının nöropatik ağrı modellerinde antihiperalezik etki meydana getirmesinde pürinerjik reseptörlerin de rolünün olabileceği öne sürülmüştür (185-189). Ayrıca, periferel sitidin enjeksiyonu ile görülen analjezik etkide olası mekanizmaların periferel adenosin ve santral norepinefrinin katkıları ile olabileceği iddia edilmektedir (190).

Hem CDP-kolin'le yapılan önceki ağrı çalışmalarından hem de çalışmamızda eş molar dozdaki kolinle CDP-kolin'in benzer etki yaptığından yola çıkarak, CDP-kolin'in antihiperalezik etkisinde rol oynayan kolinerjik reseptör tiplerini belirlemek amacıyla, seçici olmayan nikotidik reseptör antagonisti mekamilamin ve seçici olmayan muskarinik reseptör antagonisti atropin ön tedavileri uygulanmıştır. CDP-kolin'in antihiperalezik etkisinde atropin ön tedavisi bir değişikliğe yol amazken (Şekil-19), mekamilamin ise etkiyi neredeyse kontrol seviyelerine kadar azaltmıştır (Şekil-17). Kullanılan atropin dozu daha önceki çalışmalardan faydalanılarak (152,191) muskarinik reseptörleri bloke etmek için yeterli olacak şekilde seğilmiştir. Elde edilen bu bulgu, CDP-kolin'in nöropatik ağrı modelindeki antihiperalezik etkisinde amigdalada yer alan nikotidik reseptörlerin rol oynadığını düşündürmektedir. Nikotin, sistizin, epibatidin ve alfa-bungarotoksin kullanılarak yapılan

radioaktif işaretli reseptör bağlama çalışmalarında amigdalanın hem santral nukleusunun hem de diğer medial, lateral ve basolateral nukleuslarının nikotinik reseptörlerden zengin olduğu ve özellikle α_7 nAChR subtipinin yoğun olarak bulunduğu gösterilmiştir (192). Biz de çalışmamızda CDP-kolin'in antihiperalezik etkisine aracılık eden nikotinik kolinerjik reseptör alt tiplerini belirlemek amacıyla spesifik antagonisti olan MLA ile ön tedavi uyguladık ve bu ön tedavinin CDP-kolin'in antihiperalezik etkisini tamamen önlediğini gördük (Şekil-18). Bununla birlikte atropin ön tedavisi CDP-kolin'in antihiperalezik etkisini değiştirmemiştir (Şekil-19). Sonuç olarak çalışmamızdan elde edilen bulgular amigdalanın santral nukleusuna uygulanan CDP-kolin'in antihiperalezik etkisinde başlıca α_7 nAChR'nin rol oynadığını ama söz konusu etkide amigdala da yer alan muskarinik reseptörlerin aracı olmadığını göstermektedir. Elde edilen bu sonuçlar merkezi yolla CDP-kolin uygulayarak yaptığımız daha önceki ağrı çalışmalarımız ile birebir uyumlu olmakla birlikte intraCeA uygulama açısından literatürde benzer nitelikte bir çalışmaya rastlanılmadığı için bu bulguların kendi konusunda elde edilen ilk bulgular olduğu düşünülmüştür. Bununla birlikte sıçanlarda karbakol ve neostigmin'in amigdalanın santral nukleusuna mikroiinjeksiyon yoluyla uygulanmasını takiben yapılan uyku çalışmasında etkinin daha çok muskarinik nitelikte olduğu gösterilmiştir (182).

Nöropatik ağrıda amigdalaya uygulanan CDP-kolin'in etkisinde, santral kolinerjik sistemin aktivasyonunun yanısıra diğer supraspinal nörotransmitter sistemlerin rolü de araştırılmıştır. Bu amaçla ilk olarak opioid reseptörlerin aracılığı incelenmiştir. Endojen analjezik sistemlerden opioid sistem, ağrı modülasyonunda, çeşitli seviyelerde önemli rol oynamaktadır. Korteks, talamus ve beyin sapı gibi ağrı iletiminde önemli rolü olan supraspinal bölgelerde opioid reseptörler gösterilmiştir (58,193). Ayrıca, amigdala endojen ağrı kontrolü ve opioid analjezisi ile ilgilidir. Opioid, opioid reseptör agonisti, enkefalinaz inhibitörleri, nörotensin ve kolinerjik agonistlerin amigdalaya mikroiinjeksiyonu analjezik etkiler oluşturur (48,49,60,74,76,194,195). Bu etkiler kısmen PAG aracılığı ile ilgilidir. Amigdala lezyonlarının morfin analjezisini azaltabildiği gösterilmiştir (32,196).

Literatüre bakıldığında opioidler ve kolinerjik sistemin birçok yönden birbiri ile ilişkili olarak ağrı modülasyonunda görev aldıkları anlaşılmaktadır. Örneğin nikotinin analjezik etkisinde, santral kolinerjik ve opioid reseptörlerin aracı olduğu ve nikotinin kolinerjik aktivasyon yaparak morfinin analjezik etkisini artırdığı belirlenmiştir (197,198). Opioid agonist uygulanmasını takiben, ACh'in beyin omurilik sıvısındaki derişiminin arttığı (199); sıçanlarda akut ağrı modelinde morfin ile fizostigmin kombinasyonunun analjezik etkide artış sağladığı gösterilmiştir (200). Supraspinal opioid reseptörlerin aktivasyonunun CDP-kolinin antihiperalezik etkisi ile ilişkisi nöropatik ağrı modelinde gösterilmiştir (12). Ek olarak supraspinal μ -opioid reseptörlerin nöropatik ağrıda rol aldığı gösterilmiştir (201,202) Nikotinik kolinerjik reseptörler ile μ -opioid reseptörleri, beyin ağrı kontrolü ile ilgili çeşitli bölgelerinde birlikte yerleşim göstermekte ve ağrı iletiminin kontrolünde beraber rol oynamaktadırlar (197-199). Buna ek olarak amigdalanın santral nükleusunun morfinin analjezik etkisine katkıda bulunduğu gösterilmiştir. Yapılan çalışmalar amigdala ile bağlantılı ön ve orta beyin bölgelerinde opioid reseptörlerin varlığını, özellikle de santral nükleus dinorfinlere oranla yüksek konsantrasyonda enkefalin ve opioid reseptörler içerdiğini göstermiştir (78,79). Bu nedenle amigdalanın morfin antinosisepsiyonunda mediatör rol oynadığı ileri sürülmüştür. Buna ek olarak intraCeA morfin mikroenjeksiyonunun bazı ağrı testlerinde analjezi oluşturduğu (75), diğer taraftan amigdala lezyonlarının sistemik uygulanan opioid agonistlerin analjezik etkilerini ortadan kaldırdığı gösterilmiştir (45). Yine başka bir çalışmada intraCeA nalokson mikroenjeksiyonunun, sistemik yolla verilen morfinin analjezik etkisini ortadan kaldırdığı ve amigdalanın özellikle de santral nükleusun yüksek konsantrasyonlarda opioid reseptörler içerdiği bilinmektedir (80). Bütün bu bulgular amigdala bulunan opioid reseptörlerin ağrı regülasyonunda önemli rol oynadığını destekler niteliktedir. Bununla birlikte amigdala uygulanan μ -opioid reseptör agonistinin paradoksal olarak hiperalezi yapabildiği, yani opioid sistemin uyarılmasının amigdala hem analjezik hem de hiperalezik etki oluşturabildiği iddia edilmektedir (203). Ayrıca amigdala karbakol

enjeksiyonunu takiben görülen analjezik etkinin aynı alana uygulanan nalokson ön tedavisi ile önlenmesi de bu bölgede kolinerjik-opioiderjik bir etkileşim olabileceğini desteklemektedir (204) ve kolinerjik transmisyon artışının amigdala santral nukleusunda yer alan opioidderjik internöronlardan endorfin/enkefalin salınımını aktive ettiği de gösterilmiştir (82).

Yukarıda verilen tüm bu delillerden yola çıkarak biz de çalışmamızda intraCeA yolla nalokson ön tedavisi yaparak, CDP-kolin'in antihiperalezik etkisinde amigdala da yer alan opioidderjik reseptörlerin aracılığını araştırdık. Kullandığımız nalokson dozunu (1 µmol), amigdalanın ağrıdaki etkisinde PAG'in rolünü gösteren ve etkili olduğu bulunan bir çalışmadan seçtik (172). Nalokson ön tedavisi mekanik pençe çekme testinde CDP-kolin'in antihiperalezik etkisini tamamen ortadan kaldırmakla birlikte (Şekil-20), ilerleyen dakikalarda hiperalezik etkiye de neden olmuştur. Ayrıca tek başına uygulanan nalokson da hiperalezik etki göstermiştir (Şekil-20). Çalışmamızdan elde ettiğimiz bu sonuç, nöropatik ağrı da amigdala da kolinerjik stimülasyonun meydana getirdiği antihiperalezik etkiye opioidderjik reseptörlerin aracılık ettiğinin gösterildiği araştırmalarla uyumlu olmakla birlikte ek olarak amigdala da mevcut opioidderjik tonusun genel ağrı regülasyonunda önemli olduğunu ve ortadan kaldırılması durumunda özellikle kronik ağrı durumlarında hiperalezik yanıtı yol açabileceğini göstermiştir.

Çalışmamızda daha sonra nöropatik ağrı da amigdala ya uygulanan CDP-kolin'in etkisinde GABAerjik sistemin rolünü araştırdık. Bilindiği gibi SSS boyunca yaygın olarak bulunan GABAerjik nöronlardan sentez edilerek ortama salınan GABA, ana inhibitör nörotransmitterdir ve GABAerjik sistem, analjezikleri de içeren çeşitli farmakolojik ajanlar için en önemli hedeflerden birisi olarak kabul edilmektedir (205,206). Yapılan araştırmalar GABAerjik ve kolinerjik nöronların SSS' de benzer dağılım gösterdiğini ve supraspinal nAChR aktivasyonunun sinir terminallerinden GABA salınımını arttırdığını göstermiştir (207,208). Amigdalanın özellikle bazal ve santral nukleuslarının yoğun şekilde GABAerjik internöronlara sahip olduğu ve bu nöronların kolinerjik nikotinic reseptörler içerdiğini gösteren çalışmalar bulunmaktadır

(209). Ayrıca SSS'de ağrı regülasyonunda rol oynayan PAG gibi merkezlerde bulunan GABAerjik nöronlar üzerinde α_7 nACh reseptörlerin varlığını gösterilmiş ve bu reseptörlerin aktivasyonunun GABA salıverilmesini artırdığı ortaya konmuştur (207,208) ve ACh ve kolin'in, α_7 nACh reseptörleri üzerinden GABAerjik iletiyi artırdığı gösterilmiştir (210). Laboratuvarımızda yapılan çalışmalarda (11,12,184) supraspinal GABA_B reseptörlerinin akut ve nöropatik ağrı modellerinde merkezi yolla uygulanan CDP-kolinin analjezik ve antihiperalezik etkisine aracılık ettiğini göstermiştir. Bu çalışmada da CDP-kolin'in antihiperalezik etkisi yine amigdalanın santral nükleusu içine uygulanan GABA_B reseptör antagonisti CGP-35348 ön tedavisi ile ortadan kaldırılmıştır (Şekil-21). Elde edilen bu bulguya göre nöropatik ağrı modelinde amigdalaya uygulanan CDP-kolin'in meydana getirdiği antihiperalezik etkide amigdalada yer alan GABAerjik mekanizmaların özellikle GABA_B reseptörlerinin rolü bulunmaktadır

Serotonerjik sistemin de ağrı modülasyonunda santral sinir sisteminde çeşitli seviyelerde rol oynadığı uzun zamandır bilinmektedir (92,211). Serotonin hem periferik hem de santral sisteminde yaygın olarak bulunan bir monoamindir ve SSS'de ağrı regülasyonunda rol oynayan merkezlerde serotonerjik reseptörlerin varlığı gösterilmiştir (92). Bununla birlikte bu reseptörlerin aktivasyonunun değişik ağrı modellerinde hem analjezik hem de aljezik etki meydana getirebildiği de uzun bir süreden beri bilinmektedir (85,92,212,213). Ayrıca amigdala dorsal raphe nükleusdan güçlü serotonerjik projeksiyonlar alır ve ağrılı uyaran verildiği durumlarda amigdalada serotonin salınımının arttığı, amigdalaya serotonin reseptör antagonisti uygulandığında serotoninin analjezik etkisinin ortadan kaldırıldığı gösterilmiştir. Buna ek olarak çeşitli deneysel ağrı çalışmalarında sistemik serotonin agonist enjeksiyonunun CCI ile nöropatik ağrı oluşturulmuş sıçanlarda hiperaleziyi azalttığı gösterilmiştir (214). Yapılan çalışmalarda beyinde bulunan presinaptik yerleşimli nikotinik asetilkolin reseptörlerinin serotoninini de içeren çeşitli nörotransmitterlerin salıverilmesinde rol oynadığı ve farklı nikotinik kolinerjik reseptör agonistlerinin beyinde serotonin salıverilmesinde artışa neden olduğu (215,216) gösterilmiştir. Buna ek olarak sıçan dorsal rafe

çekirdeğindeki serotonerjik nöronlarda α_7 nACh reseptör ekspresyonu gösterilmiştir ve amigdalaadaki nukleuslar da bu çekirdekten güçlü serotonerjik projeksiyonlar alırlar (217). Bu bilgilerden yola çıkarak biz de çalışmamızda intraCeA yolla uygulanan CDP-kolin'in nöropatik ağrı modelinde meydana getirdiği antihiperalezik etkide amigdalanın santral nukleusunda yer alan serotonerjik reseptörlerin rolünü araştırdık. Bu amaçla seçici olmayan serotonin reseptör antagonisti metiserjid, CDP-kolin'in intraCeA yolla uygulanmasından 15 dakika önce aynı yolla uygulandı ve metiserjid ön tedavisinin CDP-kolin'in antihiperalezik etkisini azalttı. Metiserjid dozu, ağrı çalışmalarında mikroenjeksiyon yolu ile serotonin reseptörlerini bloke etmek için kullanılan ve etkili olan dozlardan seçilmiştir (170,171). Metiserjid'in bu etkisi Hamurtekin ve Gurun'un akut ağrıda elde ettikleri sonuçla uyum içindedir (137) ve CDP-kolin'in analjezik ve antihiperalezik etkisinde hem supraspinal hem de amigdala içinde yerleşen serotonerjik reseptörlerin kısmen rolü olduğunu göstermiştir.

Nöropatik ağrıda amigdalaaya uygulanan CDP-kolin'in etkisinde rolünü araştırdığımız diğer bir sistem glutamaterjik sistemdir. Amigdalaadaki glutamat reseptörlerin aktivasyonunun, nöropatik ağrının duysal ve emosyonel komponentinin sürdürülmesine katkıda bulunduğu yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (218). Kronik ağrının amigdalanın santral nukleusunda plastisitede değişikliğe yol açtığı ve burada bulunan özellikle grup I ve grup 5 metabotropik glutamat reseptörlerinde grup II (mGLUR_{2/3}) upregülasyon olduğu gösterilmiştir (219). Gerçekten de amigdalaada yerleşen metabotropik glutamat reseptörlerinin ağrıyı ve ilişkili affektif davranışları kontrol ettiğine dair birçok kanıt bulunmaktadır (219,220). Ayrıca yapılan çalışmalarda amigdaloid glutamaterjik reseptörlerin aktivasyonunun da inflamatuvar (69,219) ve nöropatik (221,222) ağrının varlığında ağrılı durumu arttırdığı gösterilmiştir.

Biz de çalışmamızda amigdalanın santral nukleusuna uygulanan grup II mGluR antagonisti LY341495 ön tedavisinin CDP-kolin'in antihiperalezik etkisini değiştirip değiştirmediğini test ettik (Şekil-23). Daha önceki mikroenjeksiyon yapılan ağrı çalışmalarından seçilen dozda (169)

kullandığımız LY341495, CDP-kolin'in antihiperalezik etkisini istatistiksel olarak anlamlı ölçüde azaltmıştır (Şekil-23). Bildiğimiz kadarı ile nöropatik ağrıda amigdala da yer alan grup II mGLUR_{2/3} 'nin rolünü ve kolinerjik etkideki aracılığını gösteren bu bulgu literatürdeki ilk bulgudur.

Sonuç olarak; amigdalanın santral nukleusuna intraCeA olarak uygulanan CDP-kolin akut ve nöropatik ağrı modellerinde analjezik ve antihiperalezik etki meydana getirmektedir. CDP-kolin'in söz konusu etkisinde amigdala da yer alan α_7 nikotinik kolinerjik reseptörler üzerinden kolinerjik mekanizmaların aktivasyonu ile birlikte yine amigdala da bulunan GABA_B, serotonerjik, opioidderjik ve mGLUR_{2/3} reseptörlerinin aracılık ettiği, bununla birlikte kolinerjik muskarinik reseptörlerin rolünün olmadığı düşünülmüştür. Bu bulgular nöropatinin neden olduğu ağrılı durumlarda amigdalanın potansiyel önemini bir kez daha ortaya koyarken bu bölgeye uygulanan CDP-kolin'in güçlü antihiperalezik etkisinin ve etki mekanizmasının anlaşılması bundan sonra yapılacak kronik ağrı ile ilgili araştırmalara ışık tutacaktır.

KAYNAKLAR

1. Sah P, Faber ES, Lopez De Armentia M, Power J. The amygdaloid complex: anatomy and physiology. *Physiol Rev* 2003;83:803–34.
2. LeDoux JE. Emotion circuits in the brain. *Annu Rev Neurosci* 2000;23:155–84.
3. Davidson RJ. Anxiety and affective style: role of prefrontal cortex and amygdala. *Biol Psychiatry* 2002;51:68–80.
4. Zald DH. The human amygdala and the emotional evaluation of sensory stimuli. *Brain Res Rev* 2003;41:88–123.
5. Neugebauer V, Li W, Bird GC, Han JS. The amygdala and persistent pain. *Neuroscientist* 2004;10: 221–34.
6. Johnson WJ. Pain Mechanisms: Anatomy, Physiology, and Neurochemistry. Raj PP (editor). *Practical Management of Pain*. Third Edition, Mosby Missouri; 2005. 117-43.
7. Erdine S. Ağrı Mekanizmaları: Erdine S (editör). Ağrı. 2. Baskı, İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri; 2002. 20-9.
8. Vincler M. Neuronal nicotinic receptors as targets for novel analgesics. *Expert Opin Investig Drugs* 2005;14:1191–8.
9. Wang Y, Su DM, Wang RH, Liu Y, Wang H. Antinociceptive effects of choline against acute and inflammatory pain. *Neuroscience* 2005;132:49–56.
10. Damaj MI, Meyer EM, Martin BR. The antinociceptive effects of alpha7 nicotinic agonists in an acute pain model. *Neuropharmacology* 2000;39:2785–91.
11. Hamurtekin E, Gurun MS. The antinociceptive effects of centrally administered CDP-choline on acute pain models in rats: the involvement of cholinergic system. *Brain Res* 2006;1117: 92–100.
12. Bagdas D, Sonat FA, Hamurtekin E, Sonal S, Gurun MS. The antihyperalgesic effect of cytidine-5'-diphosphate-choline in neuropathic and inflammatory pain models. *Behav Pharmacol* 2011;22(5-6):589-98.
13. Gurun MS, Parker R, Eisenach JC, Vincler M. The effect of peripherally administered CDP-choline in an acute inflammatory pain model: the role of alpha7 nicotinic acetylcholine receptor. *Anesth Analg* 2009;108:1680–7.
14. Alheid GF, de Olmos JS, Beltramino CA. Amygdala and extended amygdala. In *The Rat Nervous System*. 2nd edition. Edited by Paxinos G. San Diego, CA: Academic; 1995. 495–578.
15. Pitkanen A. Connectivity of the rat amygdaloid complex. In: *The Amygdala: A Functional Analysis*, edited by Aggleton JP. Oxford, UK: Oxford Univ. Press; 2000. 31–115.
16. Price JL, Russchen FT, Amaral DG. *The Limbic Region. II: The Amygdaloid Complex*. New York: Elsevier Science; 1987.
17. Swanson LW, Petrovich GD. What is the amygdala? *Trends Neurosci* 1998;21:323–31.

18. Pitkanen A, Pikkarainen M, Nurminen N, Ylinen A. Reciprocal connections between the amygdala and the hippocampal formation, perirhinal cortex, and postrhinal cortex in rat. A review. *Ann N Y Acad Sci* 2000;911:369–91.
19. McDonald AJ. Cortical pathways to the mammalian amygdala. *Prog Brain Res* 1998;55:257–332.
20. Price JL, Amaral DG. An autoradiographic study of the projections of the central nucleus of the monkey amygdala. *J Neurosci* 1981;1(11):1242-59.
21. Neugebauer V. Subcortical processing of nociceptive information: basal ganglia and amygdala. In: Cervero F, Jensen TS (Eds), *Pain*. Elsevier, Amsterdam; 2006. 141–58.
22. Stefanacci L, Amaral DG. Topographic organization of cortical inputs to the lateral nucleus of the macaque monkey amygdala: a retrograde tracing study. *J Comp Neurol* 2000;421:52–79.
23. Davis M, Whalen PJ. The amygdala: vigilance and emotion. *Mol Psychiatry* 2001;6:13–34.
24. Pitkanen A, Savander V, Ledoux JE. Organization of intraamygdaloid circuitries in the rat: an emerging framework for understanding functions of the amygdala. *Trends Neurosci* 1997;20:517– 23.
25. McWilliams LA, Cox BJ, Enns MW. Mood and anxiety disorders associated with chronic pain: an examination in a nationally representative sample. *Pain* 2003;106:127–33.
26. Millan MJ. The induction of pain: an integrative review. *Progr Neurobiol* 1999;57:1–164.
27. Phelps EA, Ledoux JE. Contributions of the Amygdala to Emotion Processing: From Animal Models to Human Behavior. *Neuron* 2005;48:175–87.
28. Haythornthwaite JA, Sieber WJ, Kerns RD. Depression and the chronic pain experience. *Pain* 1991;46:177–84.
29. Rhudy JL, Meagher MW. Negative affect: effects on an evaluative measure of human pain. *Pain* 2003;104:617–26.
30. Tracey I, Mantyh PW. The Cerebral Signature for Pain Perception and Its Modulation. *Neuron* 2007;55:377–91.
31. Meagher MW, Arnau RC, Rhudy JL. Pain and emotion: effects of affective picture modulation. *Psychosom Med* 2001;63:79–90.
32. Carrasquillo Y, Gereau RW. Activation of the extracellular signal-regulated kinase in the amygdala modulates pain perception. *J Neurosci* 2007;27:1543–51.
33. Ji G, Fu Y, Ruppert KA, Neugebauer V. Pain-related anxiety-like behavior requires CRF1 receptors in the amygdala. *Mol. Pain* 2007;3:13–7.
34. Bernard JF, Alden M, Besson JM. The organization of the efferent projections from the pontine parabrachial area to the amygdaloid complex: A Phaseolus vulgaris leucoagglutinin (PHA-L) study in the rat. *J Comp Neurol* 1993;329:201–29.

35. Chow TW, Cummings JL. The amygdala and Alzheimer's disease. In: Aggleton JP (Editor), *The Amygdala: A Functional Analysis*. Newyork: Oxford University Press; 2000.
36. Bernard JF, Huang GF, Besson JM. Nucleus centralis of the amygdala and the globus pallidus ventralis: electrophysiological evidence for an involvement in pain processes. *J. Neurophysiol* 1992;68(2):551-69.
37. Ottersen OP, Ben-Ari Y. Afferent connections to the amygdaloid complex of the rat and cat. I. Projections from the thalamus. *J. Comp. Neurol.* 1979;187(2):401-24.
38. Yamano M, Hillyard CJ, Girgis S, Emson PC, MacIntyre I, Tohyama M. Projection of neurotensin-like immunoreactive neurons from the lateral parabrachial area to the central amygdaloid nucleus of the rat with reference to the coexistence with calcitonin gene-related peptide. *Exp Brain Res* 1988;71:603–10.
39. Sun N, Cassel MD: Intrinsic GABAergic neurons in the rat central extended amygdala. *J Comp Neurol* 1993;330:381–404.
40. Helmstetter FJ. The amygdala is essential for the expression of conditional hypoalgesia. *Behav Neurosci* 1992;106:518–28.
41. Helmstetter FJ, Bellgowan PS. Lesions of the amygdala block conditional hypoalgesia on the tail flick test. *Brain Res* 1993;612:253-7.
42. Watkins LR, Wiertelak EP & Maier SF. The amygdala is necessary for the expression of conditioned but not unconditioned analgesia. *Behavioral Neuroscience* 1993;107:402-5.
43. Fox RJ, Sorenson CA. Bilateral lesions of the amygdala attenuate analgesia induced by diverse environmental challenges. *Brain Research* 1994;648:215-21.
44. Manning B, Mayer DJ. The central nucleus of the amygdala contributes to the production of morphine antinociception in the rat tail-flick test. *Journal of Neuroscience* 1995;15:8199-213.
45. Manning BH, Mayer DJ. The central nucleus of the amygdala contributes the production of morphine antinociception in the formalin test. *Pain* 1995;63:141-52.
46. Helmstetter FA, Brozoski EL, Frost JÁ. Kappa opioid agonists produce hypoalgesia in the tail flick test after application to the amygdala. *Society for Neuroscience Abstracts* 1991;17:296.
47. Kalivas PW, Gau BA, Nemeroff CB, Prange AJ Jr. Antinociception after microinjection of neurotensin into the central amygdaloid nucleus of the rat. *Brain Res* 1982;243:279–86.
48. Klamt JG, Prado WA. Antinociception and behavioral changes induced by carbachol microinjected into identified sites of the rat brain. *Brain Research* 1991;549:9-18.
49. Oliveira MA, Prado WA. Antinociception and behavioral manifestations induced by intracerebroventricular or intra-amygdaloid administration of cholinergic agonists in the rat. *Pain* 1994;57:383–91.
50. File SE, Rodgers RJ. Partial anxiolytic action of morphine sulphate following microinjection into the central nucleus of the amygdala in rats. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* 1979;11:313-8.

51. Zhou ZF, Xuan YT, Han JS. Analgesic effect of morphine injected into ha benula, nucleus accumbens or amygdala of rabbits. *Acta Pharmacologica Sinica* 1984;5:150-3.
52. Ma QP, Yin GF, Ai MK, Han JS. Serotonergic projections from the nucleus raphe dorsalis to the amygdala in the rat. *Neuroscience Letters* 1991;134:21-4.
53. Lico MC, Hoffmann A, Covian MR. Influence of some limbic structures upon somatic and autonomic manifestations of pain. *Physiology and Behavior* 1974;12:805-11.
54. Sha L, Huang P, Ding W, Teng G. The inhibitory effects of stimulating AC, AL, BNST and AHL on visceral pain. *Chen Tzu Yen Chiu Acupuncture Research* 1993;18:37-3.
55. Han Y, Yu LC. Involvement of oxytocin and its receptor in nociceptive modulation in the central nucleus of amygdala of rats. *Neurosci Lett* 2009;454:101–4.
56. Jin WY, Liu Z, Liu D, Yu LC. Antinociceptive effects of galanin in the central nucleus of amygdala of rats, an involvement of opioid receptors. *Brain Res* 2010;1320:16–21.
57. Ortiz JP, Heinricher MM, Selden NR. Noradrenergic agonist administration into the central nucleus of the amygdala increases the tail-flick latency in lightly anesthetized rats. *Neuroscience* 2007;148:737–43.
58. Leite-Panissi CR, Brentegani MR, Menezes-de-Oliveira L. Cholinergicopioidergic interaction in the central amygdala induces antinociception in the guinea pig. *Braz J Med Biol Res* 2004;37:1571-9.
59. Manning BH, Martin WJ, Meng ID. The rodent amygdala contributes to the production of cannabinoid-induced antinociception. *Neuroscience* 2003;120:1157–70.
60. Pavlovic ZW, Bodnar RJ. Opioid supraspinal analgesic synergy between the amygdala and periaqueductal gray in rats. *Brain Res* 1998;779:158–69.
61. Gormsen L, Rosenberg R, Bach FW, Jensen TS. Depression, anxiety, health-related quality of life and pain in patients with chronic fibromyalgia and neuropathic pain. *Eur J Pain* 2010;14(2):127.
62. Neugebauer V, Galhardo V, Maione S, Mackey SC. Forebrain pain mechanisms. *Brain Res. Rev* 2009;60:226–42.
63. Ikeda R, Takahashi, Y, Inoue, K, Kato, F. NMDA receptor-independent synaptic plasticity in the central amygdala in the rat model of neuropathic pain. *Pain* 2007;127:161–72.
64. Kulkarni B, Bentley DE, Elliott R, et al. Arthritic pain is processed in brain areas concerned with emotions and fear. *Arthritis Rheum* 2007;56:1345–54.
65. Petrovic P, Ingvar M, Stone-Elander S, Petersson KM, Hansson P. A PET activation study of dynamic mechanical allodynia in patients with mononeuropathy. *Pain* 1999;83:459–70.
66. Bornhövd K, Quante M, Glauche V, et al. Painful stimuli evoke different stimulus-response functions in the amygdala, prefrontal,

- insula and somatosensory cortex: a single-trial fMRI study. *Brain* 2002;125(6):1326-36.
67. Paulson PE, Casey KL, Morrow TJ. Long-term changes in behavior and regional cerebral blood flow associated with painful peripheral mononeuropathy in the rat. *Pain* 2002;95(1-2):31-40.
 68. Gonçalves L, Silva R, Pinto-Ribeiro F, et al. Neuropathic pain is associated with depressive behaviour and induces neuroplasticity in the amygdala of the rat. *Exp Neurol*. 2008;213(1):48-56.
 69. Neugebauer V, Li W, Bird GC, Bhave G, Gereau RW 4th. Synaptic plasticity in the amygdala in a model of arthritic pain: differential roles of metabotropic glutamate receptors 1 and 5. *J Neurosci* 2003;23(1):52-63.
 70. Carrasquillo Y, Gereau RW. Hemispheric lateralization of a molecular signal for pain modulation in the amygdala. *Mol. Pain* 2008;4:24.
 71. Goncalves L, Dickenson AH. Asymmetric time-dependent activation of right central amygdala neurones in rats with peripheral neuropathy and pregabalin modulation. *Eur J Neurosci* 2012;36:3204–13.
 72. Veinante P, Yalcin I, Barrot M. The amygdala between sensation and affect: a role in pain *Journal of Molecular Psychiatry* 2013;1:9.
 73. Cassell MD, Freedman LJ, Shi C. The intrinsic organization of the central extended amygdala. *Ann N Y Acad Sci* 1999;877:217–41.
 74. al-Rodhan N, Chipkin R, Yaksh TL. The antinociceptive effects of SCH- 32615, a neutral endopeptidase (enkephalinase) inhibitor, microinjected into the periaqueductal, ventral medulla and amygdala. *Brain Research* 1990;520:123-30.
 75. Helmstetter FJ, Bellgowan PS, Tershner SA. Inhibition of the tail flick reflex following microinjection of morphine into the amygdala. *NeuroReport* 1993;4:471-4.
 76. Helmstetter FJ, Tershner SA, Poore LH, Bellgowan PSF. Antinociception following opioid stimulation of the basolateral amygdala is expressed through the periaqueductal gray and rostral ventromedial medulla. *Brain Res*. 1998;779:104-18.
 77. Narita M, Kaneko C, Miyoshi K, et al. Chronic pain induces anxiety with concomitant changes in opioidergic function in the amygdala. *Neuropsychopharmacology* 2006;31:739–50.
 78. Fowler CJ, Fraser GL. μ -, δ - and κ - opioid receptors and their subtypes. A critical review with emphasis on radioligand binding experiments. *Neurochem. Int*. 1994;24:401-26.
 79. Shin MS, Helmstetter FJ. Antinociception following application of DAMGO to the basolateral amygdala results from a direct interaction of DAMGO with Mu opioid receptors in the amygdala. *Brain Res*. 2005;1064(1-2):56-65.
 80. Sabetkasaei M, Masoudnia F, Khansefid N, Behzadi G. Opioid receptors of the central amygdala and morphine-induced antinociception. *Iran Biomed J*. 2007;11(2):75-80.
 81. Oliveira MA, Prado WA. Role of PAG in the antinociception evoked from the medial or central amygdala in rats. *Brain Res. Bull*. 2001;54(1):55- 63.

82. Leite-Panissi CR, Brentegani MR, Menescal-de-Oliveira L. Cholinergic-opioidergic interaction in the central amygdala induces antinociception in the guinea pig. *Braz J Med Biol Res* 2004;37(10):1571-9.
83. Varani AP, Balerio GN. GABAB receptors involvement in the effects induced by nicotine on anxiety-related behaviour in mice. *Behav. Pharmacol.* 2012;65:507-13.
84. Pedersen LH, Scheel-Kruger J, Blackburn-Munro G. Amygdala GABA-A receptor involvement in mediating sensory-discriminative and affective-motivational pain responses in a rat model of peripheral nerve injury. *Pain* 2007;127:17–26.
85. Bardin L. The complex role of serotonin and 5-HT receptors in chronic pain. *Behav. Pharmacol.* 2011;22,:390-404.
86. Grégoire S, Neugebauer V. 5-HT₂CR blockade in the amygdala conveys analgesic efficacy to SSRIs in a rat model of arthritis pain. *Mol Pain* 2013;9(1):41.
87. Merskey H, Bogduk N. *Classification of Chronic Pain*. 2nd edition. Seattle: I.A.S.P. Press; 1994.
88. Loeser JD, Melzack R. Pain: an overview. *Lancet* 1999;353:1607-9.
89. Mizumura K. Peripheral mechanisms of hyperalgesia – sensitization of nociceptors. *Nagoya J. Med. Sci.* 1997;60:69-87.
90. Loeser JD, Butler SH, Chapman CR, Turk DC (eds). *Bonica's Management of Pain*. 3rd edition. Lippincott Williams & Wilkins (LWW); 2001.
91. McMahon S, Koltzenburg M. *Wall and Melzack's Textbook of Pain*. 5th edition. Churchill Livingstone; 2005.
92. Millan MJ. Descending control of pain. *Prog Neurobiol.* 2002;66(6):355-474.
93. Wall P D, Melzack R. *Textbook of Pain*. 3rd edition. London: Chirchill Livingstone; 1994.
94. Jensen TS, Baron R. Translation of symptoms and signs into mechanisms in neuropathic pain. *Eur J Pharmacol* 2001;429:1-11
95. Dworkin RH. Advances in neuropathic pain: diagnosis, mechanisms and treatment recommendations. *Arch Neurol* 2003;60:1524-34.
96. Attal N, Bouhassira D. Mechanisms of pain in peripheral neuropathy. *Acta Neurol Scand* 1999;73:12-24.
97. De Vry J, Kuhl E, Franken-Kunkel P, Eckel G. Pharmacological characterization of the chronic constriction injury model of neuropathic pain. *Eur J Pharmacol.* 2004;491(2-3):137-48.
98. Xiong Y, Zhao X, Sun Q, Li R, Li C, Ye J. Antinociceptive mechanism of the spirocyclopiperazinium compound LXM-10 in mice and rats. *Pharmacol Biochem Behav.* 2010;95(2):192-7.
99. Corringer PJ, Le Novère N, Changeux JP. Nicotinic receptors at the amino acid level. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2000;40:431–58.
100. Freitas K, Ghosh S, Carroll FI, Lichtman AH, Damaj MI. Effects of alpha 7 positive allosteric modulators in murine inflammatory and chronic neuropathic pain models *Neuropharmacology* 2013;65:156-64.

101. Iwamoto ET. Characterization of the antinociception induced by nicotine in the pedunculopontine tegmental nucleus and the nucleus raphe magnus. *J Pharmacol Exp Ther* 1991;257:120–33.
102. Iwamoto ET. Antinociception after nicotine administration into the mesopontine tegmentum of rats: evidence for muscarinic actions. *J Pharmacol Exp Ther* 1989;251(2):412–21.
103. Aceto MD, Bagley RS, Dewey WL, Fu TC, and Martin BR. The spinal cord as a major site for the antinociceptive action of nicotine in the rat. *Neuropharmacology* 1986;25:1031–6.
104. Pedigo NW, Dewey WL, Harris LS. Determination and characterization of the antinociceptive activity of intraventricularly administered acetylcholine in mice. *J Pharmacol Exp Ther* 1995;193(3):845-52.
105. Ireson JD. A comparison of the antinociceptive actions of cholinomimetic and morphine-like drugs. *Br J Pharmacol.* 1970;40(1):92-101.
106. Yaksh TL, Grafe MR, Malkmus S, Rathbun ML, Eisenach JC. Studies on the safety of chronically administered intrathecal neostigmine methylsulfate in rats and dogs. *Anesthesiology* 1995 82(2):412-27.
107. Gurun MS, Leinbach R, Moore L, Lee CS, Owen MD, Eisenach JC. Studies on the safety of glucose and paraben-containing neostigmine for intrathecal administration. *Anesth Analg* 1997;85(2):317-23.
108. Rowbotham MC, Duan WR, Thomas J, Nothaft W, Backonja MM. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial evaluating the efficacy and safety of ABT-594 in patients with diabetic peripheral neuropathic pain. *Pain* 2009;146(3):245-52.
109. Bannon AW, Gunther K L, Decker W. Is Epibatidine Really Analgesic? Dissociation of the Activity, Temperature, and Analgesic Effects of (+)-Epibatidine. *Pharmacol Biochem Behav* 1995;51(4):693-8.
110. Gillberg PG, Aquilonius SM. Cholinergic, opioid and glycine receptor binding sites localized in human spinal cord by in vitro autoradiography. Changes in amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neurol Scand* 1985;72:299–306.
111. Wada E, Wada K, Boulter JIM, et al. Distribution of alpha 2, alpha 3, alpha 4, and beta 2 neuronal nicotinic receptor subunit mRNAs in the central nervous system: a hybridization histochemical study in the rat. *J Comp Neurol* 1989;284:314–35.
112. Séguéla P, Wadiche J, Dineley-Miller K, Dani JA, Patrick JW. Molecular cloning, functional properties, and distribution of rat brain alpha 7: a nicotinic cation channel highly permeable to calcium. *J Neurosci* 1993;13:596–604.
113. Lukas RJ, Changeux JP, Le Novère N, et al. International Union of Pharmacology. XX. Current status of the nomenclature for nicotinic acetylcholine receptors and their subunits. *Pharmacol Rev* 1999;51:397–401.
114. Shen JX, Yakel JL. Nicotinic acetylcholine receptor-mediated calcium signaling in the nervous system. *Acta Pharmacol Sin* 2009;30(6):673–80.

115. Feuerbach D, Lingenhoehl K, Olpe HR, et al. The selective nicotinic acetylcholine receptor alpha7 agonist JN403 is active in animal models of cognition, sensory gating, epilepsy and pain. *Neuropharmacology* 2009;56(1):254-63.
116. Xiao HS, Huang QH, Zhang FX, et al. Identification of gene expression profile of dorsal root ganglion in the rat peripheral axotomy model of neuropathic pain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2002;12:8360-5.
117. Wang, DW, Zhou RB, Yao YM. 2009. Role of cholinergic anti-inflammatory pathway in regulating host response and its interventional strategy for inflammatory diseases. *Chin. J. Traumatol.* 2009;12:355-64.
118. De Rosa, MJ, Dionisio L, Agriello E, Bouzat C, Esandi M. Alpha 7 nicotinic acetylcholine receptor modulates lymphocyte activation. *Life Sci* 2009;85:444-9
119. de Jonge WJ and Ulloa L. The alpha7 nicotinic acetylcholine receptor as a pharmacological target for inflammation. *Br J Pharmacol* 2007;151:915–29.
120. Rowley TJ, McKinsty A, Greenidge E, Smith W, Flood P. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of choline in a mouse model of postoperative pain. *Br J Anaesth* 2010;105:201–7.
121. Thomsen MS, Hansen HH, Timmerman DB, and Mikkelsen JD. Cognitive improvement by activation of alpha7 nicotinic acetylcholine receptors: from animal models to human pathophysiology. *Curr Pharm Des* 2010;16:323–43.
122. Cordero-Erausquin M, Changeux JP. Tonic nicotinic modulation of serotonergic transmission in the spinal cord. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:2803–7.
123. Cordero-Erausquin M, Pons S, Faure P, Changeux JP. Nicotine differentially activates inhibitory and excitatory neurons in the dorsal spinal cord. *Pain* 2004;109:308–18.
124. Marrero MB, Bencherif M, Lippiello PM, and Lucas R. Application of alpha7 nicotinic acetylcholine receptor agonists in inflammatory diseases: an overview. *Pharm Res* 2011;28:413–6.
125. Bertrand D, Gopalakrishnan M. Allosteric modulation of nicotinic acetylcholine receptors. *Biochem Pharmacol* 2007;74:1155–63.
126. Decker MW, Meyer MD, Sullivan JP. The therapeutic potential of nicotinic acetylcholine receptor agonists for pain control. *Expert Opin Investig Drugs* 2001;10:1819–30.
127. Hama A, Menzaghi F. Antagonist of nicotinic acetylcholine receptors (nAChR) enhances formalin-induced nociception in rats: tonic role of nAChRs in the control of pain following injury. *Brain Res* 2001;888:102–6.
128. Zhou M. Neuronal mechanism for neuropathic pain. *Mol. Pain* 2007;3:14.
129. Harden RN. Chronic neuropathic pain. Mechanisms, diagnosis, and treatment. *Neurologist* 2005;11:111-22.
130. Dray, Bevan. Inflammation and hyperalgesia: highlighting the team effort. *Trends Pharmacol. Sci.* 1993;14:287-90.

131. Sandkuhler J. Models and mechanism of hyperalgesia and allodynia. *Physiol.Rev.* 2009;89:707-58.
132. Miao FJ, Green PG, Benowitz N, Levine JD. Central terminals of nociceptors are targets for nicotine suppression of inflammation. *Neuroscience* 2004;123;777-84.
133. Pacini A, Di Cesare Mannelli L, Bonaccini L, Ronzoni S, Bartolini A, Ghelardini C. Protective effect of alpha7 nAChR: behavioural and morphological features on neuropathy. *Pain* 2010;150:542-9.
134. Westman M, Saha S, Morshed M, Lampa J. Lack of acetylcholine nicotine alpha 7 receptor suppresses development of collagen-induced arthritis and adaptive immunity. *Clin. Exp. Immunol.* 2010;162:62-7.
135. Ulloa L. The vagus nerve and the nicotinic anti-inflammatory pathway. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2005;4:673-84.
136. Alsharari SD, Freitas K, Damaj M. Functional role of alpha7 nicotinic receptor in chronic neuropathic and inflammatory pain: Studies in transgenic mice. *Biochem Pharmacol* 2013. (in press) doi: 10.1016/j.bcp.2013.06.018.
137. Hamurtekin E, Bagdas D, Gurun MS. Possible involvement of supraspinal opioid and GABA receptors in CDP-choline-induced antinociception in acute pain models in rats. *Neurosci Lett.* 2007;420(2):116-21.
138. Weiss GB. Metabolism and actions of CDP-choline as an endogenous compound and administered exogenously as citicoline. *Life Sci.* 1995;56:637-60.
139. Lopez-Coviella I, Agut J, Savcı V, Ortiz JA, Wurtman RJ. Evidence that 5' cytidinediphosphocholine can affect brain phospholipid composition by increasing choline and cytidine plasma levels. *J. Neurochem.* 1995;65:889-94.
140. Fresta M, Wehrli E, Pusglisi G. Enhanced therapeutic effect of cytidine-5'- diphosphate choline when associated with GM1 containing small liposomes as demonstrated in a rat ischemia model. *Pharm Res.* 1995;12(11):1769-74.
141. Galetti P, de Rosa M, Cotticelli MG, Morana A, Vaccaro R, Zappia V. Biochemical rationale for the use of CDPcholine in traumatic brain injury: pharmacokinetics of the orally administered drug. *J Neurol Sci.* 1991;103:19-25.
142. Savcı V, Cavun S, Goktalay G, Ulus IH. Cardiovascular effects of intracerebroventricularly injected CDP-choline in normotensive and hypotensive animals: the involvement of cholinergic system. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 2002;365(5):388-98.
143. Zeisel SH. Choline: essential for brain development and function. *Adv Pediatr.* 1997;44:263-95.
144. Zeisel SH. (2004) Nutritional importance of choline for brain development. *J Am Coll Nutr.* 2004; 23(6):621-6.

145. Cermak JM, Holler T, Jackson DA, Blusztajn JK. Prenatal availability of choline modifies development of the hippocampal cholinergic system. *FASEB J.* 1998;12(3):349-57.
146. Cohen EL, Wurtman RJ. Brain acetylcholine: increase after systemic choline administration. *Life Sci.* 1975;16(7):1095-102.
147. Ulus IH, Hirsch MJ, Wurtman RJ. Trans-synaptic induction of adrenomedullary tyrosine hydroxylase activity by choline: evidence that choline administration can increase cholinergic transmission. *Proc Natl Acad Sci USA* 1977;74(2):798-800.
148. Savci V, Gurun S, Ulus IH, Kiran BK. Intracerebroventricular injection of choline increases plasma oxytocin levels in conscious rats. *Brain Res.* 1996;709(1):97-102.
149. Savci V, Gurun MS, Ulus IH, Kiran BK. Effect of intracerebroventricularly injected choline on plasma ACTH and beta endorphin levels in conscious rats. *Eur J Pharmacol.* 1996;309(3):275-80.
150. Savci V, Ulus IH. Central choline reverses hypotension caused by alpha-adrenoceptor or ganglion blockade in rats: the role of vasopressin. *Eur J Pharmacol.* 1996;311:153-61.
151. G-Coviella IL, Wurtman RJ. Enhancement by cytidine of membrane phospholipid synthesis. *J Neurochem* 1992;59(1):338-43.
152. Cavun S, Savci V. CDP-choline increases plasma ACTH and potentiates the stimulated release of GH, TSH and LH: the cholinergic involvement. *Fundam Clin Pharmacol.* 2004;18(5):513-23.
153. Cavun S, Savci V, Ulus IH. Centrally injected CDP-choline increases plasma vasopressin levels by central cholinergic activation. *Fundam Clin Pharmacol.* 2004;18(1):71-7.
154. Savci V, Goktalay G, Cansev M, Cavun S, Yılmaz MS, Ulus IH. Intravenously injected CDP-choline increases blood pressure and reverses hypotension in haemorrhagic shock: effect is mediated by central cholinergic activation. *Eur J Pharmacol.* 2003;468(2):129-39.
155. Yılmaz MS, Yalcın M, Savci V. Cytidine 5'-diphosphocholine restores blood flow of superior mesenteric and renal arteries and prolongs survival time in haemorrhaged anaesthetized rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2006;33(5-6):415-20.
156. Matsuoka T, Kawanaka M, Nagai K. Effect of cytidine diphosphate choline on growth hormone and prolactin secretion in man. *Endocrinol Jpn.* 1978;25(1):55-7.
157. Gurun MS, Savci V, Ulus IH, Kiran BK. Centrally administered choline increases plasma prolactin levels in conscious rats. *Neurosci Lett.* 1997;232(2):79-82.
158. Amenta F, Parnetti L, Gallai V, Wallin A. Treatment of cognitive dysfunction associated with Alzheimer's disease with cholinergic precursors. Ineffective treatments or inappropriate approaches? *Mech Ageing Dev.* 2001;122(16):2025-40.
159. Cansev M, Wurtman RJ, Sakamoto T, Ulus IH. Oral administration of circulating precursors for membrane phosphatides can promote the

- synthesis of new brain synapses *Alzheimers Dement* 2008;4(1):153-68.
160. Adibhatla RM, Hatcher JF. Citicoline mechanisms and clinical efficacy in cerebral ischemia. *J Neurosci Res.* 2002;70(2):133-9.
 161. Centrone G, Ragno G, Calicchio G. Use of citicoline in high dosages in acute cerebrovascular disease. *Minerva Med.* 1986;77(11):371-3.
 162. Leon-Carrion J, Dominguez-Roldan JM, Murillo-Cabezas F, Del Rosario Dominguez-Morales M, Munoz-Sanchez MA. The role of citicholine in neuropsychological training after traumatic brain injury. *NeuroRehabilitation* 2000;14(1):33-40.
 163. Baskaya MK, Dogan A, Rao AM, Dempsey RJ. Neuroprotective effects of citicoline on brain edema and blood-brain barrier breakdown after traumatic brain injury. *J Neurosurg.* 2000;92(3):448-52.
 164. Teather LA, Wurtman RJ. Dietary cytidine (5')-diphosphocholine supplementation protects against development of memory deficits in aging rats. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2003;27(4):711-7.
 165. Eberhardt R, Birmaber G, Gerstenbrand F, Rainer E, Traegner H. Citicoline in the treatment of Parkinson's disease. *Clin Ther.* 1990;12(6):489-95.
 166. Campos EC, Schiavi C, Benedetti P, Bolzani R, Porciatti V. Effect of citicoline on visual acuity in amblyopia: preliminary results. *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol* 1995;233(5):307-12.
 167. Grieb P, Rejdak E R. Pharmacodynamics of citicholine relevant to the treatment of glaucoma. *J. Neurosci. Res.* 2002;67:143-8.
 168. Hamurtekin E, Gurun MS. The antinociceptive effect of centrally administered CDP-choline in rats. *Neuroanatomy, Abstract book* 2005;4(1):17.
 169. Richard JM, Berridge KC. Metabotropic glutamate receptor blockade in nucleus accumbens shell shifts affective valence towards fear and disgust. *Eur J Neurosci.* 2011; 33(4):736-47.
 170. Miyase CI, Kishi R, de Freitas RL, Paz DA, Coimbra NC. Involvement of pre- and post-synaptic serotonergic receptors of dorsal raphe nucleus neural network in the control of the sweet-substance-induced analgesia in adult *Rattus norvegicus* (Rodentia, Muridae). *Neurosci Lett* 2005;379(3):169-73.
 171. Freitas RL, Bassi GS, de Oliveira AM, Coimbra NC. Serotonergic neurotransmission in the dorsal raphe nucleus recruits in situ 5-HT(2A/2C) receptors to modulate the post-ictal antinociception. *Exp Neurol.* 2008;213(2):410-8.
 172. Oliveira MA, Prado WA. Role of PAG in the antinociception evoked from the medial or central amygdala in rats. *Brain Res Bull.* 2001;54(1):55-63.
 173. Thomas DA, Navarrete IM, Graham BA, McGowan MK, Hammond DL. Antinociception produced by systemic R(+)-baclofen hydrochloride is attenuated by CGP 35348 administered to the spinal cord or ventromedial medulla of rats. *Brain Res.* 1996;718(1-2):129-37.

174. Abe K, Kikuta J, Kato M, Ishida K, Shigenaga T, Taguchi K, Miyatake T. Effects of microinjected carbachol on the antinociceptive response to noxious heat stimuli. *Biol Pharm Bull* 2003;26(2):162-5.
175. Li GZ, Liang QC, Jin YH, et al. The effect of acetylcholine on pain-related electric activities in the hippocampal CA3 of rats *Journal of Neural Transmission* 2011;118(4):555-61.
176. Guimarães AP, Prado WA. Antinociceptive effects of carbachol microinjected into different portions of the mesencephalic periaqueductal gray matter of the rat. *Brain Res* 1994;647(2):220-30.
177. Nomikos GG, Hildebrand BE, Panagis G, Svensson TH. Nicotine withdrawal in the rat: role of alpha7 nicotinic receptors in the ventral tegmental area. *Neuroreport* 1999;10(4):697-702.
178. Hamurtekin E. CDP-kolin'in analjezik etkisi ve etkiye aracılık eden mekanizmalar (Tıpta Uzmanlık Tezi). Bursa: Uludağ Üniversitesi; 2007.
179. Bagdas D. Deneysel inflamatuvar ağrı modelinde CDP-kolin'in analjezik etkisi ve etki mekanizması(Doktora Tezi). Bursa: Uludağ Üniversitesi; 2008.
180. Ahn DK, Kim YS, Park JS. Central-amygdaloid carbachol suppressed nociceptive jaw opening reflex in freely moving rats. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 1999;23:685–95.
181. Bennett GJ, Xie YK. A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man. *Pain* 1998;33:87-107.
182. Sanford D, Yang L, Tang X, Dong E, Ross RJ, Morrison AR. Cholinergic regulation of The central nucleus of the amygdala in rats: Effect of local microinjections of cholinomimetics and cholinergic antagonists on arousal and sleep. *Neuroscience* 2006;141:2167–76.
183. Oliveira MA, Prado WA. Antinociception and behavioral manifestations induced by intracerebroventricular or intra-amygdaloid administration of cholinergic agonists in the rat. *Pain* 1994;57:383-91.
184. Kanat O. Sıçanlarda oxaliplatin' in neden olduğu nöropatik ağrıda CDP-kolin' in etkisi ve etki Mekanizması (Doktora Tezi). Bursa: Uludağ Üniversitesi; 2013.
185. Kenndy C. P2X receptors: targets for novel analgesics? *Neuroscientist* 2005;11(4):345–56.
186. Liu XJ, Salter MW. Purines and pain mechanisms: recent developments. *Curr Opin Investig Drugs* 2005;6(1):65–75.
187. Fukui M, Nakagawa T, Minami M, Satoh M. Antinociceptive effects of intracerebroventricularly administered P2 purinoceptor agonists in the rat. *Eur. J Pharmacol* 2001;419:25–31.
188. Fukui M, Nakagawa T, Minami M, Satoh M, Kaneko S. Inhibitory role of supraspinal P2₃/P2_{2/3} subtypes on nociception in rats. *Mol Pain* 2006;2:19.
189. Okada M, Nakagawa T, Minami M, Satoh M. Analgesic effects of intrathecal administration of P2Y nucleotide receptor agonists UTP and UDP in normal and neuropathic pain model rats. *J Pharmacol Exp Ther* 2002;303:66–73.

190. Yilmaz MS, Coskun C, Suzer O, Yalcin M, Mutlu D, Savci V. Hypotensive effects of intravenously administered uridine and cytidine in conscious rats: involvement of adenosine receptors. *Eur J Pharmacol* 2008;584:125–36.
191. Savci V, Cavun S, Goktalay G, Ulus IH. Cardiovascular effects of intracerebroventricularly injected CDP-choline in normotensive and hypotensive animals: the involvement of cholinergic system. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 2002;365(5):388-98.
192. Han ZY, Zoli M, Cardona A, Bourgeois JP, Changeux JP, Le Nove N. Localization of nicotine, cytosine, epibatidine, and bungarotoxin binding sites in the brain of macaca mulatta. *The Journal of Comparative Neurology* 2003;461:49–60.
193. Abe K, Ishida K, Kato M, Shigenaga T, Taguchi K, Miyake T. Effect of morphine-induced antinociception is altered by AF64A-induced lesions on cholinergic neurons in rat nucleus raphe magnus. *Acta Pharmacol Sin.* 2002;23(11):961-6.
194. Pavlovic ZW, Cooper ML, Bodnar RJ. Opioid antagonists in the periaqueductal gray inhibit morphine and beta-endorphin analgesia elicited from the amygdala of rats. *Brain Res.* 1996;741(1-2):13-26.
195. Tershner SA, Helmstetter FJ. Antinociception produced by mu opioid receptor activation in the amygdala is partly dependent on activation of mu opioid and neurotensin receptors in the ventral periaqueductal gray. *Brain Res.* 2000;865(1):17-26.
196. Manning BH. A lateralized deficit in morphine antinociception after unilateral inactivation of the central amygdala. *J Neurosci* 1998;18(22):9453-70.
197. Zarrindast MR, Nami AB, Farzin D. Nicotine potentiates morphine antinociception: a possible cholinergic mechanism. *Eur Neuropsychopharmacol.* 1996;6(2):127-133.
198. Zarrindast MR, Pazouki M, Nassiri-Rad S. Involvement of cholinergic and opioid receptor mechanisms in nicotine-induced antinociception. *Pharmacol Toxicol* 1997;81(5):209-13.
199. Bouaziz H, Tong C, Yoon Y, Hood DD, Eisenach JC. Intravenous opioids stimulate norepinephrine and acetylcholine release in spinal cord dorsal horn. Systematic studies in sheep and an observation in a human. *Anesthesiology* 1996;84(1):143-154.
200. Beiling B, Nemirovsky AY, Zeidela A, Maibord E, Zelman V, Katz RL. Systemic physostigmine increases the antinociceptive effect of spinal morphine. *Pain* 1997;70(2-3):217-21.
201. Wang JY, Zhao M, Yuan YK, Fan GX, Jia H, Tang JS. The roles of different subtypes of opioid receptors in mediating the nucleus submedius opioidevoked antiallodynia in a neuropathic pain model of rats. *Neuroscience* 2006;138:1319–27.
202. Zhao M, Wang JY, Jia H, Tang JS. mu- but not delta- and kappa-opioid receptors in the ventrolateral orbital cortex mediate opioid-induced antiallodynia in a rat neuropathic pain model. *Brain Res* 2006;1076:68–77.

203. Terashvili M, Wu HE, Schwasinger E, Tseng LF. Paradoxical hyperalgesia induced by mu-opioid receptor agonist endomorphin-2, but not endomorphin-1, microinjected into the centromedial amygdala of the rat. *Eur J Pharmacol.* 2007;554(2-3):137-44.
204. Ahn DK, Kim YS, Park JS. Central-amygdaloid carbachol suppressed nociceptive jaw opening reflex in freely moving rats. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*1999;23(4):685-95.
205. Enna SJ, McCarson KE. The role of GABA in the mediation and perception of pain. *Adv Pharmacol.* 2006;54:1-27.
206. Sawynok J, Labella FS. On the involvement of GABA in the analgesia produced by baclofen, muscimol and morphine. *Neuropharmacology* 1982;21(5):397-403.
207. Alkondon M, Pereira EF, Eisenberg HM, Albuquerque EX. Choline and selective antagonists identify two subtypes of nicotinic acetylcholine receptors that modulate GABA release from CA1 interneurons in rat hippocampal slices. *J Neurosci.* 1999;19(7):2693-705.
208. Maggi L, Sher E, Cherubini E. Regulation of GABA release by nicotinic acetylcholine receptors in the neonatal rat hippocampus. *J Physiol.* 2001;536(1):89-100.
209. Finnegan TF, Chen SR, Pan HL Pan. mü-Opioid Receptor Activation Inhibits GABAergic Kv1.1/1.2 Channels Inputs to Basolateral Amygdala Neurons Through. *J Neurophysiol* 2006;95:2032-41.
2010. Alkondon M, Braga MF, Pereira EF, Maelicke A, Albuquerque EX. alpha7 nicotinic acetylcholine receptors and modulation of gabaergic synaptic transmission in the hippocampus. *Eur J Pharmacol.* 2000;393(1-3):59-67.
211. Galeotti N, Ghelardini C, Bartolini A. 5-HT1A agonists induce central cholinergic antinociception. *Pharmacol Biochem Behav.* 1997;57(4):835-4.
212. Kayser V, Bourgoïn S, Viguier F, Michot B, Hamon M. Toward deciphering the respective roles of multiple 5-HT receptors in the complex serotonin-mediated control of pain. In: Beaulieu P, Lussier D, Porreca F, Dickenson AH (eds.). *Pharmacology of Pain.* Seattle: IASP Press; 2010. 185-206.
213. Suzuki R, Rygh LJ, Dickenson AH. Bad news from the brain: descending 5-HT pathways that control spinal pain processing. *Trends Pharmacol Sci* 2004;25:613-7.
214. Viguier F, Michot B, Kayser V, et al. GABA, but not opioids, mediates the anti-hyperalgesic effects of 5-HT7 receptor activation in rats suffering from neuropathic pain. *Neuropharmacology* 2012;63:1093–110.
215. Mitchell SN, Brazell MP, Joseph MH, Alavijeh MS, Gray JA. Regionally specific effects of acute and chronic nicotine on rates of catecholamine and 5-hydroxytryptamine synthesis in rat brain. *Eur J Pharmacol.* 1989;167(3):311-22.
216. Reuben M, Clarke PB. Nicotine-evoked [3H]5-hydroxytryptamine release from rat striatal synaptosomes. *Neuropharmacology* 2000;39(2):290-9.

217. Bitner RS, Nikkel AL. Alpha-7 nicotinic receptor expression by two distinct cell types in the dorsal raphe nucleus and locus coeruleus of rat. *Brain Res.* 2002;938(1-2):45-54.
218. Ansah OB, Bourbia N, Gonçalves L, Almeida A, Pertovaara A. Influence of amygdaloid glutamatergic receptors on sensory and emotional pain-related behavior in the neuropathic rat. *Behav Brain Res* 2010;209(1):174-8.
219. Li W, Neugebauer V. Differential roles of mGluR1 and mGluR5 in brief and prolonged nociceptive processing in central amygdala neurons. *J Neurophysiol* 2004;91(1):13-24.
220. Neugebauer V. Glutamate receptor ligands. *Handb Exp Pharmacol* 2007;(177):217-49.
221. Viisanen H, Pertovaara A. Influence of peripheral nerve injury on response properties of locus coeruleus neurons and coeruleospinal antinociception in the rat. *Neuroscience* 2007;146(4):1785-94.
222. Ansah OB, Gonçalves L, Almeida A, Pertovaara A. Enhanced pronociception by amygdaloid group I metabotropic glutamate receptors in nerve-injured animals. *Exp Neurol* 2009;216(1):66-74.

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimimin başladığı ilk günden bugüne kadar bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan, tezimin hazırlanmasında desteklerini hiçbir koşulda esirgemeyen değerli hocam Prof. Dr. Mine Sibel GÜRÜN'e ve başta Anabilimdalı Başkanı Prof. Dr. R. Levent BÜYÜKUYSAL olmak üzere Prof. Dr. Vahide SAVCI, Prof. Dr. Sinan ÇAVUN, Doç. Dr. Gökhan GÖKTALAY, Doç. Dr. Mehmet CANSEV, Doç. Dr. M. Sertaç YILMAZ'a, tezimin histolojik doğrulamalarında desteğini esirgemeyen Histoloji ve Embriyoloji Anabilimdalı öğretim üyelerinden Prof. Dr. Özhan EYİGÖR'e ve asistanı Arş. Gör. Duygu GÖK'e, tezimin özellikle mikroenjeksiyon aşamasına destek olan ve farmakoloji serüvenim süresince deneyimlerini bizimle paylaşan Kimyager Sami AYDIN'a asistanlığımın ilk günlerinden bu yana hep yanımda olan ve en ümitsizliğe kapıldığım anlarda güç toplamamı sağlayan arkadaşım Uzm. Dr. Deniz BAĞDAŞ'a, asistanlık eğitimim esnasında beraber çalıştığım, hayatı büyük bir aile gibi paylaştığım değerli doktora ve yüksekisans öğrencisi arkadaşlarım Tıbbi Biyolog Çiğdem SEVİM, Biyolog Mesut TÜRKYILMAZ, Ecz. Zülfiye GÜL'e, yakın zamanda uzman olup aramızdan ayrılan Uzm. Dr. Sema BÜYÜKUYSAL'a aynı laboratuvarı paylaştığım, neşe kaynağım Ecz. Merve GÜRBÜZOĞLU'na, ve hayatıma yeni bir boyut kazandıran yol arkadaşım Dr. Fulya ORHAN'a teşekkür ederim. Ayrıca hayat yoldaşım, eşim Şener ÖZBÖLÜK'e, yaşama sevincim ve umudum oğuşlarım Berkant Umut ve Bahadır'a, büyük emeklerle beni yetiştiren ve aldığım her kararda beni destekleyen anneme, babama ve kardeşlerime sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışma Uludağ Üniversitesi BAP [HDP(T)-2012/8] tarafından desteklenmiştir.

ÖZGEÇMİŞ

5 Ağustos 1976 yılında Nevşehir’de doğdum. İlköğrenimimi Nevşehir İstiklal İlkokulu’nda, orta öğrenimimi Nevşehir Anadolu Lisesi’nde ve lise öğrenimimi Kayseri Fen Lisesi’nde tamamladım. Tıp eğitimimi, 1994-2000 yılları arasında Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi’nde aldım. Nevşehir ve Bursa’ da pratisyen hekimlik yaptım. 2009 Nisan dönemi Tıpta Uzmanlık Sınavı ile uzmanlık eğitimi hakkı kazandığım Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilimdalı’nda araştırma görevlisi olarak çalışmaktayım. Evliyim ve iki erkek çocuk annesiyim.