



**HİSTAMİN'İNDORSAL KÖK GANGLİON
NÖRONLARINDA HCN KANALLARINA ETKİSİ**

Yüksek Lisans Tezi

Ecz. Mehmet Hakan AKCAN

Eskişehir 2022

**HİSTAMİN'İN DORSAL KÖK GANGLİON
NÖRONLARINDA HCN KANALLARINA ETKİSİ**

Ecz. Mehmet Hakan AKCAN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**Farmakoloji Anabilim Dalı
Danışman: Prof. Dr. Yusuf ÖZTÜRK**

**Eskişehir
Anadolu Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü
2022**

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Ecz. Mehmet Hakan AKCAN'ın “Histamin’in Dorsal Kök Ganglion Nöronlarında HCN Kanallarına Etkisi” başlıklı tezi, 11/05/2022 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından değerlendirilerek, “Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği”nin ilgili maddeleri uyarınca Sağlık Bilimleri Enstitüsü Farmakoloji Anabilim dalında Yüksek Lisans tezi olarak değerlendirilmiş ve kabul edilmiştir.

Üye (Tez Danışmanı) : Prof. Dr. Yusuf ÖZTÜRK
Üye : Prof.Dr. V. Melih ALTAN
Üye : Doç.Dr. Nurcan BEKTAŞ-TÜRKMEN

Enstitü Müdürü

Prof.Dr. Gülşen AKALIN-ÇİFTÇİ

ÖZET

HİSTAMİN'İN DORSAL KÖK GANGLİON NÖRONLARINDA HCN KANALLARINA ETKİSİ

Ecz. Mehmet Hakan AKCAN

Farmakoloji Anabilim Dalı

Anadolu Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Mayıs 2022

Danışman: Prof. Dr. Yusuf ÖZTÜRK

Santral Sinir Sistemi, insan ve diğer hayvanların yaşamsal tüm faaliyetleri kontrol eder. Yaşamsal faaliyetler duyu organlarımızla algılanıp sinir sistemi ile impulsar ile beyine iletilmektedir. Sinir Sisteminin en önemli bölümlerinden biri spinal kolondur. Spinal kolonundaki dorsal kök ganglionları sinir sisteminin bir bölümüdür. Dorsal Kök Ganglionları gelen iletileri beyine iletirler.

Dorsal kök ganglionlarını dış uyaranlar dışında, endojen ve eksojen kimyasal maddeler de uyarmaktadır. Histamin vücudumuzda bulunan endojen maddelerden birisidir. Histamin, beyin ve bağırsak sisteminde bulunmaktadır. Etkisini histamin reseptörleri aracılığıyla göstermektedir. Genelde allerjenik ve patolojik durumlarda ortaya çıkmaktadır.

Çalışmamızda histaminin omurilik dorsal kök ganglionlarında HCN kanal aracılığı ile farmakolojik etkileri araştırılmıştır. Bu amaçla, Patch-clamp tekniği ile deneyler yapılmış ve bu yapılan deneylerden sonuçlar elde edilmiştir.

Anahtar Sözcükler: Dorsal Kök Ganglionu, Histamin, Patch-clamp, HCN kanalları.

ABSTRACT

EFFECT OF HISTAMINE ON HCN CHANNELS IN DORSAL ROOT GANGLION NEURONS

Pharm. Mehmet Hakan AKCAN

Department of Pharmacology

Anadolu University, Institute of Health Sciences, May 2022

Supervisor: Prof. Dr. Yusuf ÖZTÜRK

The Central Nervous System controls all vital activities of humans and other animals. Vital activities are perceived by our sensory organs and transmitted to the brain by impulses through the nervous system. One of the most important part of the nervous system is the spinal cord. Dorsal root ganglia in the spinal cord are a part of the nervous system. Dorsal root ganglia transmit incoming messages to the brain.

In addition to external stimuli, endogenous and exogenous chemicals inside and outside the body stimulate the dorsal root ganglia. Histamine is one of the endogenous compounds found in the body. Histamine is found in the brain and intestinal system. It shows its effect through histamine receptors. It usually occurs in allergenic and pathological conditions.

In our study, the pharmacological effects of histamine in spinal cord dorsal root ganglia via HCN channels were investigated. For this purpose, experiments were carried out with the Patch-clamp technique and results were obtained from these experiments.

Keywords: Dorsal root ganglion, histamine, patch-clamp, HCN channels.

TEŞEKKÜR

Bu tez çalışmamda ve Farmakoloji yüksek lisans eğitimimde ve Farmakoloji biliminde gelişmeye ve eğitime sebep olan, bilgi, deneyim ve desteğini esirgemeyen, değerli danışman hocam Prof. Dr. Yusuf Öztürk'e ve çalışmamda yapılması gerekenlerde bilgisi ve yardımlarını esirgemeyen Araş. Gör. Dr. Feyza Alyu hanımefendiye çok teşekkür ederim. Bunun yanında, Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürümüz Prof. Dr. Gülşen Akalın Çiftçi ve Jüri üyelerim Prof. Dr. V. Melih Altan ve Doç. Dr. Nurcan Bektaş Türkmen'e çok teşekkür ediyorum. Ayrıca Sağlık Bilimleri Enstitüsü Öğrenci İşleri personeline de her zaman yardımlarını esirgemedikleri için teşekkür ederim. Ve tabi ki, benim bu çalışmamda her zaman yanımda olan ve destekleyen eşim Uzm. Ecz. Hayriye Özben Akcan'a çok teşekkür ediyorum.

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ

Bu tezin bana ait, özgün bir çalışma olduğunu, çalışmamın hazırlık, veri toplama, analiz ve bilgilerin sunumu olmak üzere tüm aşamalarında bilimsel etik ilke ve kurallara uygun davrandığımı, bu çalışma kapsamında elde edilen tüm veri ve bilgiler için kaynak gösterdiğimi ve bu kaynaklara kaynakçada yer verdiğimi, bu çalışmanın Anadolu Üniversitesi tarafından kullanılan “bilimsel intihal tespit programı”yla tarandığını ve hiçbir şekilde “intihal içermediğini” beyan ederim. Herhangi bir zamanda, çalışmamla ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması durumunda, ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçları kabul ettiğimi bildiririm.

.....

Ecz. Mehmet Hakan AKCAN

STATEMENT OF COMPLIANCE WITH ETHICAL PRINCIPLES AND RULES

I hereby truthfully declare that this thesis is an original work prepared by me; that I have behaved in accordance with the scientific ethical principles and rules throughout the stages of preparation, data collection, analysis and presentation of my work; that I have cited the sources of all the data and information that could be obtained within the scope of this study, and included these sources in the references section; and that this study has been scanned for plagiarism with “scientific plagiarism detection program” used by Anadolu University, and that “it does not have any plagiarism” whatsoever. I also declare that, if a case contrary to my declaration is detected in my work at any time, I hereby express my consent to all the ethical and legal consequences that are involved.

.....

Pharm. Mehmet Hakan AKCAN

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
BAŞLIK SAYFASI	i
JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI	ii
ÖZET	iii
ABSTRACT	iv
TEŞEKKÜR	v
ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ	vi
İÇİNDEKİLER	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
GÖRSELLER DİZİNİ	xi
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xii
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Dorsal Kök Ganglionu (DKG)	3
1.2. İyon Kanalları	9
1.2.1. HCN kanalları	11
1.2.2. Na kanalları	14
1.2.3. K kanalları.....	15
1.3. Histamin	17
1.4. Patch-Clamp Yöntemi	23
2. GEREÇ VE YÖNTEM	26
2.1. Gereçler	26
2.2. Hayvanlar	26
2.3. DKG Diseksiyonu	26
2.4. Voltaj-clamp Kayıt Yöntemi	27
2.5. Voltaj-clamp Kayıt Yöntemi Solüsyonları	28
2.6. İstatistiksel Analiz	29
3. BULGULAR	30
3.1. Histaminin K ⁺ Tepe Akımı Kayıtları	30

3.2. Histamin Voltaj-clamp Kayıtları	31
4. TARTIŞMA	32
5. SONUÇ	36
KAYNAKÇA	37
ÖZGEÇMİŞ	



ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 1.1. Omurilik, kökler, ganglionlar ve onları çevreleyen zarların şematik çizimi....	5
Şekil 1.2. Dorsal kök gangliyonunun anatomisi ve bariyerleri.....	5
Şekil 1.3. DKG’lerde sinyal iletim şeması.....	7
Şekil 1.4. İyon Kanal Çeşitleri.....	10
Şekil 1.5. Hiperpolarizasyonla aktive olan siklik nükleotid kapılı kanalların yapısı ve işlevleri.....	13
Şekil 1.6. Patch-clamp deneysel düzeneğin şematik diyagramı.....	25
Şekil 3.1. DKG nöronlarına 100 μ M Histamin modülasyonu ile oluşan I-V ve K^+ tepe akımı eğrisi	30
Şekil 3.2. 100 μ M histamin uygulamasının -40 ila -130 mV arasındaki hiperpolarize voltaj basamakları ve -70 mV'de tutma potansiyeli üzerindeki etkileri.....	31
Şekil 3.3. HCN kanallarının incelenmesinde kullanılan protokol.....	31

GÖRSELLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Görsel 1.1. İnsan Omurilik ve Sinirleri.....	2
Görsel 1.2. Omurilik kesiti ve kökleri.....	4
Görsel 2.1. DKG Diseksiyonu görüntüleri.....	27
Görsel 2.2. Voltaj-clamp Yöntemi uygulaması görüntüsü.....	28



SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

AP	: Aksiyon Potansiyeli
ATP	: Adenosin Triphosphate
cAMP	: Cyclic Adenosine Monophosphate
CGRP	: Calcitonin Gene-Related Peptide (Kalsitonin Geni İle İlişkili Peptid)
CNBD	: Cyclic Nucleotide Binding domain (Siklik Nükleotid Bağlama Alanı)
ÇSS	: Çevresel Sinir Sistemi
DKG	: Dorsal Kök Ganglion
EPN	: Epinerium
FRR	: Fiber Rich Region (Lif bakımından Zengin Bölge)
GABA	: Gama Amino Bütirik Asit
GRP	: Gastrin Releasing Peptide (Gastrin Salan Peptit)
hDKG	: Human Dorsal Root Ganglion (İnsan Dorsal Kök Ganglionu)
HR	: Histamin Reseptörü
IB4	: Isolectin B4 (İzolektin B4)
Kv	: Voltage Gated Potassium Channel (Voltaj Kapılı Potasyum Kanalı)
IR	: immünoreaktif
LO	: Lipoxygenase
mDKG	: Mouse Dorsal Root Ganglion (Fare Dorsal Kök Ganglionu)
MSS	: Merkezi Sinir Sistemi
Nav	: Voltage Gated Sodium Channels (Voltaj Kapılı Sodyum Kanalları)

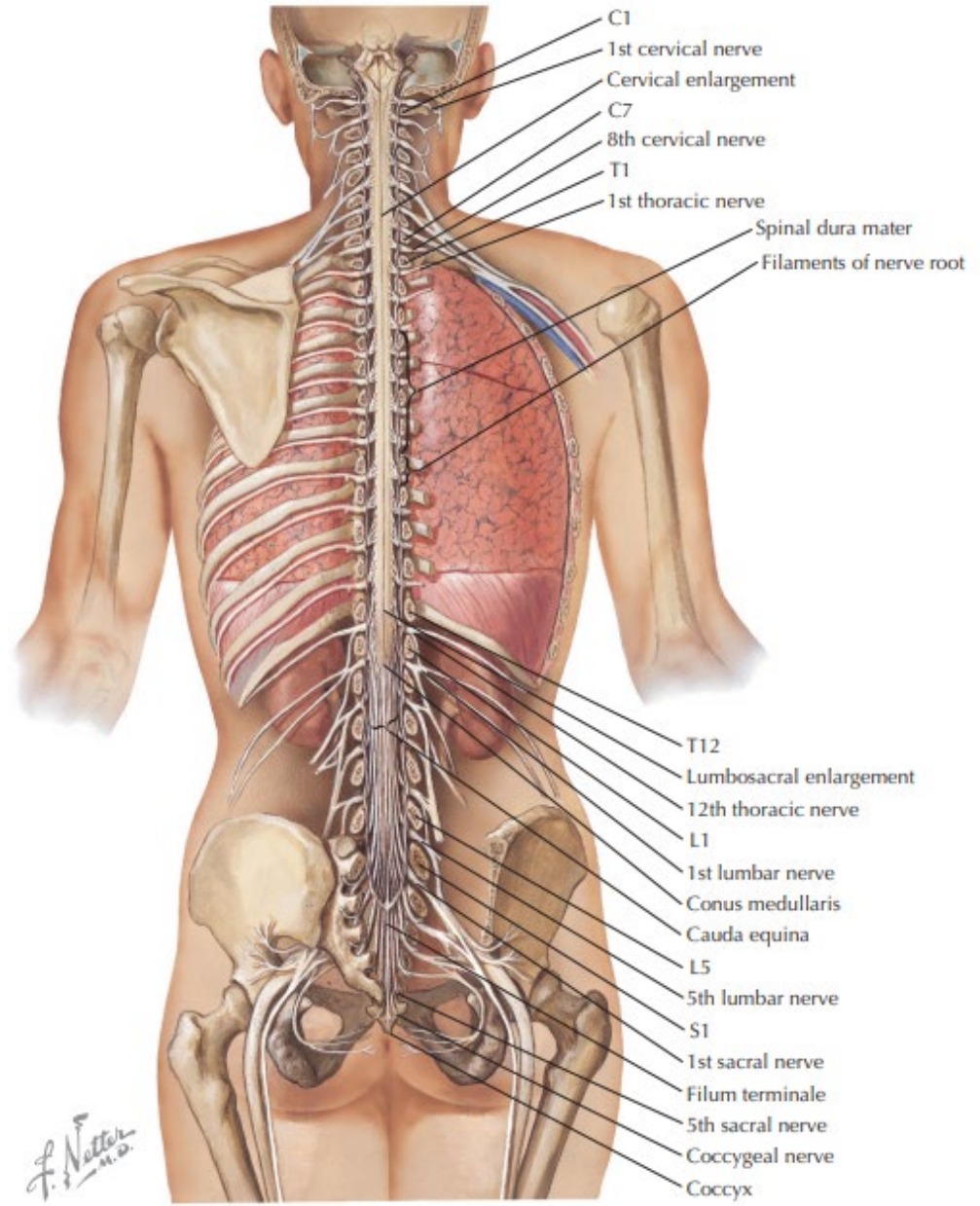
NANC	: Nonadrenergic Noncholinergic (adrenerjik olmayan kolinergik olmayan)
NGF	: Nerve Growth Factor (Sinir Büyüme Faktörü)
NMB	: Nöromedin B
Nppb	: Natriüretik polipeptit b
NRR	: Neuron Rich Region (Nöronca Zengin Bölge)
PGE2	: Prostaglandin E2
PLA2	: Phospholipases A2
PLC β 3	: Phospholipase- β -3
PSS	: Periferik Sinir Sisteminin
STOC	: Spontaneous Transient Outward Currents (Spontane Geçici Dışa Akımları)
STT	: Somatostatin
TNF	: Tumor Necrosis Factor
TRPV	: Transient Receptor Potential Vanilloid (Geçici Reseptör Potansiyeli Vanilloid)
TTX	: Tetrodotoksin
VGSC	: Voltage Gated Sodium Channels (Voltaj Kapılı Sodyum Kanalları)
V _m	: Membran Potansiyeli

1. GİRİŞ

İnsan beyni, milyarlarca hücre, nöron ve bağlantılardan oluşan bir sistemdir. Ayrıca, vücudun tüm bölgelerine bilgi üretmek, saklamak ve iletmek için kompleks kapasiteye sahiptir. İnsan sinir sistemi, vücudun hareketlerini ve yaşamsal faaliyetlerini kontrol etmek için, yüksek bir hızla anatomik ve fizyolojik birim olarak işlev görür. Vücudun kontrolünü, kimyasal ve elektriksel sinyaller biçiminde, bilgileri alma, işleme ve iletmeye yeteneği ile ayarlar ve düzenleme yapar ve vücudumuzun bir bütün olarak hareket etmesini sağlar (Rogers, 2011, s. 19).

Canlı organizmalar kimyasal ve fiziksel uyaranlara tepki vermektedir. Oluşan tepki bir hareket veya hücrelerde farklı fizyolojik olaylar olabilmektedir. Tek hücreli organizmalarda ve basit çok hücreli hayvanlarda, algılama, motor ve salgı işlevleri tek bir hücrede olmaktadır. Diğer hayvan türlerinde ise hücreler arası iletişim kurularak, hücre tarafından bir uyarının alınması diğer hücrelerin hareketlenmesine veya salgı hareketine neden olmaktadır. Nöronlar veya sinir hücreleri, bilgileri bir hayvanın vücudunun bir bölümünden diğerine hızla aktarırlar. Bir organizmanın tüm nöronları, destekleyici hücreleriyle birlikte sinir sistemini oluşturur, sinirler de, farklı organ ve dokulara bağlanan sinir lifi demetleridir (Kiernan ve Rajakumar, 2014, s.3; Minett ve Ginesi, 2020, s. 159).

İnsan sinir sistemi, merkezi sinir sistemi ve çevresel sinir sistemi olmak üzere iki ana kısma ayrılır. Merkezi sinir sistemi (MSS), beyin ve omurilikten oluşur. Çevresel sistemi (ÇSS), merkezi sinir sistemi dışında kalan ve vücudun geri kalanına bağlanan tüm sinir ağından oluşan, kranial ve omurilik sinirlerinden ve bunlarla ilişkili gangliyonlardan ibaret periferik sinir sistemidir (Greenstein ve Greenstein, 2000, s.2; Minett ve Ginesi, 2020, s. 160; Rogers, 2011, s. 19). Periferik sinir sisteminde, kafatasındaki delikler (açıklıklar) yoluyla beyne terk eden 12 çift kranial sinir ve vertebral delikler yoluyla omuriliğe terk eden 31 çift omurilik siniri (Sekiz servikal, 12 torasik, beş lomber, beş sakral ve bir koksigeal çift spinal sinir) vardır. Omurilik sinirleri; afferent sinirleri MSS'ye taşıyan dorsal (arka) sinir kökleri ve efferent sinirleri ve MSS'den periferiye taşıyan ventral (anterior) sinir kökleri ile korda bağlıdır. Afferent liflere duyu lifleri de denir ve hücre gövdeleri dorsal kökteki şişlikler veya ganglionlarda bulunur. Ventral ve dorsal kökleri eşleştiren otuz bir çift spinal sinir bu segmentlerden çıkar ve intervertebral foramenlerden vertebral kolonu terk eder (Greenstein ve Greenstein, 2000, s.2; Sengul ve Watson, 2012a, s. 190).



Görsel 1.1. İnsan Omurilik ve Sinirleri (Felten,2016)

Omurilik, simetrik kelebek şeklindeki hücresel gri madde matrisinin çevresine yerleştirilmiş uzun miyelinli sinir liflerinden (beyaz madde olarak bilinir) oluşur. Gri madde; hücre gövdeleri, miyelinsiz motor nöron lifleri ve kordun iki tarafını veya dorsal ve ventral ganglionları birbirine bağlayan inter nöronları içerir. İnternöron çoğu kısa aksonlara sahiptir, bazılarının da spinal segmente uzanan aksonları vardır. Bazı internöronlar sinyalleri modüle edebilir veya değiştirebilirken, bazıları iletimde ve reflekslerde rol oynar (Rogers, 2011, s. 41). Sistem olarak omurilik; deriden ve iç organlardan bilgi alır, beyne ve beyinden uyarı şeklinde bilgileri iletir, hareketleri kontrol

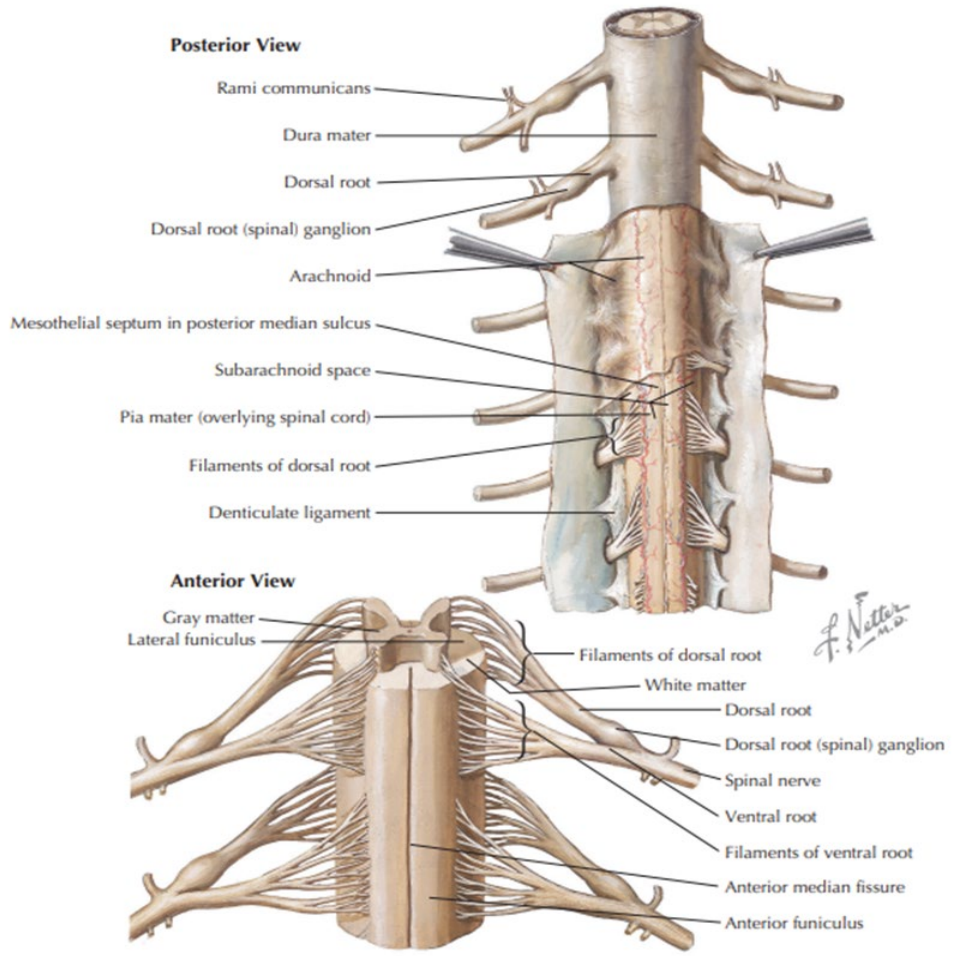
eden ve iç organların faaliyetlerini düzenleyen motor sinirleri taşır, omurilik reflekslerinde rol oynar (Minett ve Ginesi, 2020, s. 161).

1.1. Dorsal Kök Ganglionu (DKG)

Vücutta, eklem, tendon ve kas reseptörlerinden ve iç organlardan gelen duysal girdiler omuriliğin dorsal köklerinden geçer. Omurilikteki motor hücrelerden gelen lifler ventral kökler yoluyla çıkar ve periferik hedeflerine (otonom ganglionlar veya iskelet kası) gider. Periferik sinir sisteminin temel yapısal ve işlevsel birimi olan spinal sinirler, bir dorsal kök ile bir ventral kökün birleşmesinden oluşur (Rogers, 2011, s. 53).

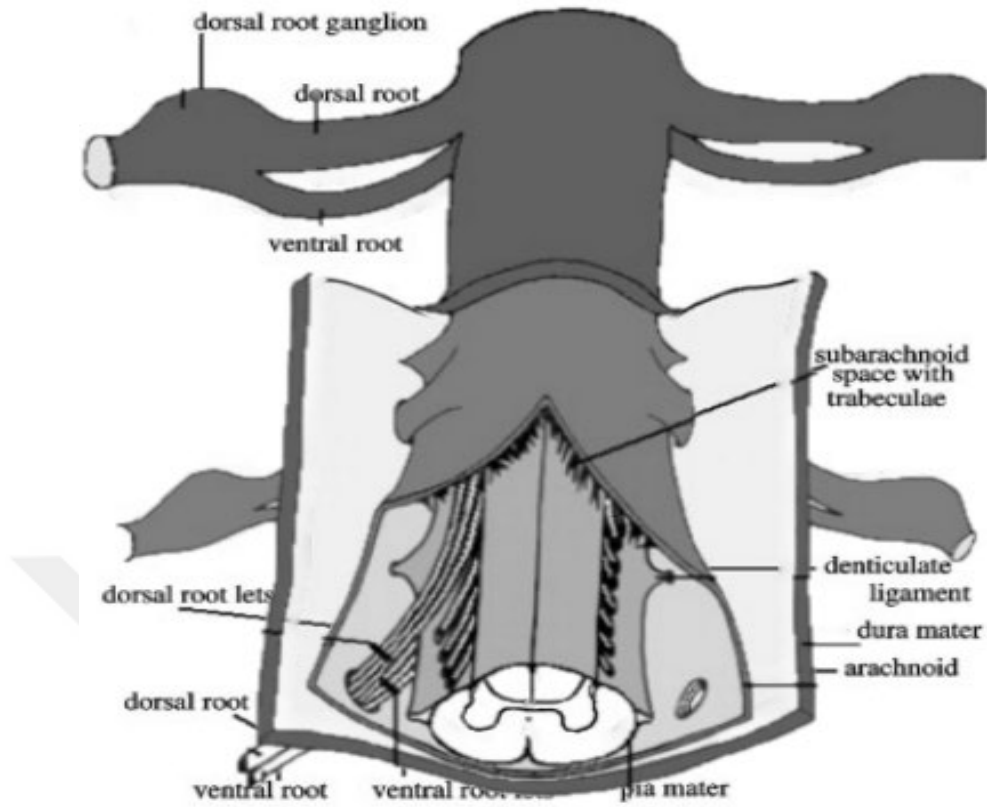
Periferik nöronların hücre gövdeleri genellikle gangliyon adı verilen kümeler halinde gruplandırılmış olarak bulunur. Ganglionlarda bulunan sinir hücresi gövdelerinin tipine göre duysal veya motor olarak sınıflandırılabilirler. Duysal gangliyonlar, spinal sinirlerin dorsal köklerinde ve bazı kraniyal sinirlerin köklerinde bulunan, spinal ganglion veya primer afferent liflerin hücre gövdelerinin yığıntısını içeren, periferik sinir sisteminin önemli bir yapısı olan dorsal kök ganglionu (DKG) adı verilen uzun bir kalınlaşma içeren oval şişliklerdir (Doran vd., 2015, s. 1; Feirabend ve Marani, 2003, s. 28; Gong, Ohara, Jasmin, 2016, s. 1; Parker vd., 2020, s. 2; Rogers, 2011, s. 50; Sengul ve Watson, 2012a, s. 190). Hücre gövdelerinin dorsal kök ganglionunda kümelenmesi, dorsal kökün genişlemesini açıklar (Rogers, 2011, s. 157).

Dorsal kökler omuriliğe girdi sağlar (Felten, O'Banion, Maida, 2016, s. 72) ve DKG'ler, intervertebral forameni içinde vertebral kolon boyunca bulunur. Birinci ve ikinci servikal sinirlerin DKG'leri, atlas ve eksenin vertebral arkları üzerinde uzanır ve ikinci ve beşinci sakral sinirlerin ve koksigeal sinirin DKG'leri, vertebral kanal içinde bulunur. Uçlardaki DKG'ler, dorsal kökle birlikte çok küçüktür veya yok gibidir (Sengul ve Watson, 2012a, s. 190). DKG omurların kemiği tarafından korunur (Webb, 2003, s. 194) ve afferent duyu sinirlerinin hücre gövdelerini içerir Ganchingco vd. 2019, s. 1).



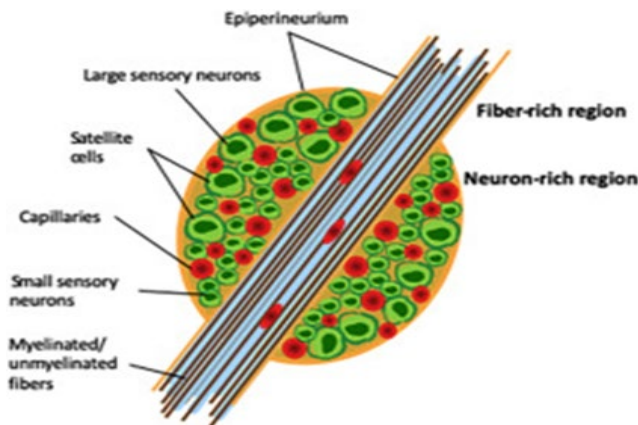
Görsel 1.2. Omurilik kesiti ve kökleri (Felten, 2016)

DKG hücreleri, epinerium ve perineriumun çevreleyerek sardığı periferik sinirlerin birikerek kalınlaşması ile oluşan, tüm periferik sinir sisteminin (PSS) üzerine uzanan ve omuriliğin leptomening'lerinin bir devamı olan ve sinir sistemi ile çevre arasındaki duyusal bağlantıyı oluşturan birincil duyu nöronlarının kümelenmiş yığıntıdır (Feirabend ve Marani, 2003, s. 28; Marani ve Lakke, 2012, s. 90; Reinhold ve Rittner, 2020, s. 1).



Şekil 1.1. Omurilik, kökler, ganglionlar ve onları çevreleyen zarların şematik çizimi (Feirabend ve Marani, 2003)

DKG duyuşal sinirlerin ve nosiseptif nöronların somatalarını içerir. Nöronca zengin bölge (NRR) ve lif bakımından zengin bölge (FRR) ve bunları saran epinerium/perinerium (EPN) 'den oluşur (Şekil 1.2) (Reinhold ve Rittner, 2020, s. 2).



Şekil 1.2. Dorsal kök ganglionunun anatomisi ve bariyerleri (Reinhold ve Rittner, 2020)

DKG hücreleri, gebelikten sonra yaklaşık 4 haftalık nöral krest göçünde gelişir ve ventral olarak göç etmeye başlar (Ashwell ve Waite, 2012, s. 21). DKG'da piknotik

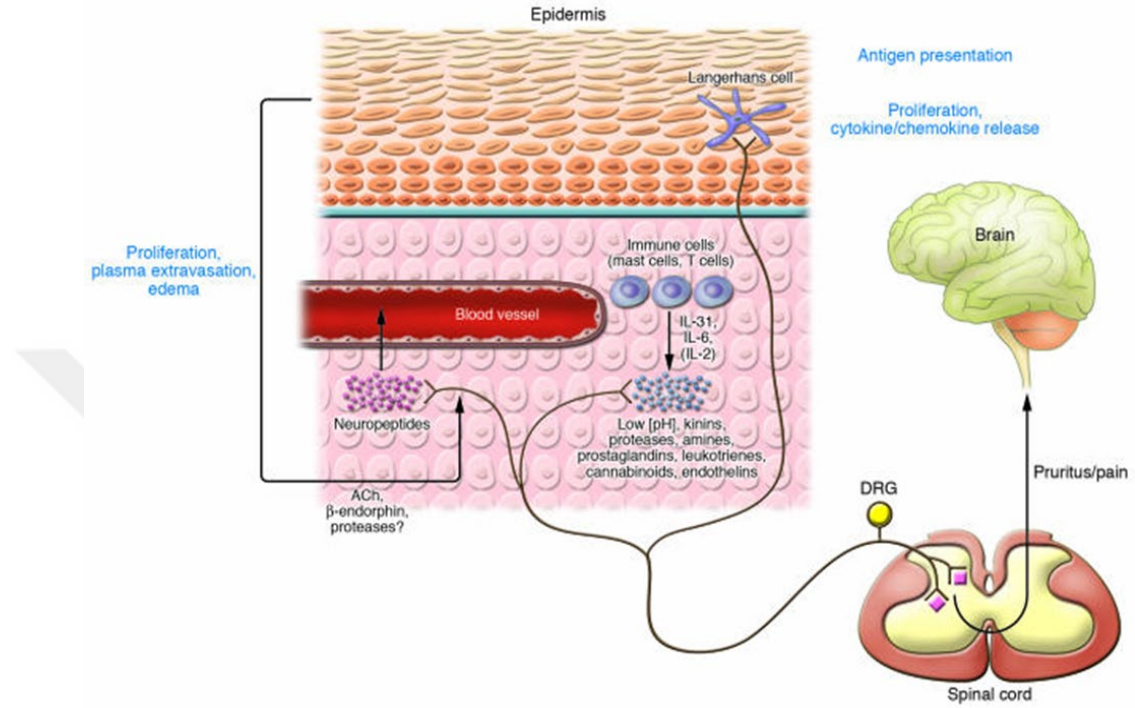
çekirdeklere sahip oval hücreler yaklaşık 8. haftada görülmeye başlar (Ashwell ve Waite, 2012, s. 22). Somatosensoriyel sistemlerin araştırılmasında ilerleme, birincil duyu nöronlarının gelişimini düzenleyen moleküllerin keşfi ile olmuştur. Fare ve sıçandaki DRG nöronlarının yaklaşık %80'i, tüm küçük nöronlar dahil olmak üzere embriyonik gelişim sırasında hayatta kalmak için sinir büyüme faktörü NGF'ye ihtiyaç duyar (Molliver vd., 1997, s. 849).

Farelerde de, her dorsal spinal kök, ganglionik bir şişlik şeklindedir. Bazı DKG'ler bitişik ganglionlarla kaynaşmıştır ve bazı durumlarda hem dorsal hem de ventral kökler bir DKG'ye girebilir. DKG, somatosensoriyel sistemin birincil afferentlerinin hücre gövdelerini içerir (Graham ve Callister, 2012, s. 593). DKG nöronları, insanlarda da farelerde de, dokunma, ağrı, basınç, sıcaklık ve kimyasallar dahil olmak üzere çeşitli uyarıları algılar ve periferik ve dokulardan merkezi sinir sistemine çeşitli duyu bilgileri iletirler (Graham ve Callister, 2012, s. 593; Han, Mancino, Simon, 2006, s. 691; Ho ve O'Leary, 2011, s. 159; Westlund ve Willis, 2012, s. 1173; Zhang, Donnelly, LaMotte, 1998, s. 97).

Farede, C5'ten C8'e kadar her DKG'de yaklaşık 4.000 nöron ve L3 DKG'de yaklaşık 6.000 nöron vardır. Stereolojik yöntemlerle yapılan tespitlerde, C57 BL/6J farelerinde 12.000 L5 DKG nöronu olduğunu tahmin edilmektedir (Sengul ve Watson, 2012b, s. 428).

DKG hücrelerinin çoğu çalışması kemirgenler üzerinde yapılmıştır (Westlund ve Willis, 2012, s. 1147). Kemirgen ve insan fizyolojisi arasındaki biyolojik farklılıklar, hayvan modellerindeki keşiflerden elde edilen çok sayıda umut verici tedavi sonucu, klinik deneylerde veri karşılaştırması için önemli engeller oluşturmaktadır. Bu olumsuzlukların olası nedenleri olarak, hayvanlar ve insanlar arasındaki temel hücresel ve moleküler düzeydeki farklılıkların yer aldığı çeşitli faktörler olduğu öne sürülmüştür. Bu riski en aza indirmek için, kemirgenlerde yapılan gözlemleri doğrudan canlı insan duyu nöronlarında doğrulamak önemli bir stratejidir. Bununla birlikte, yetişkin donörlerden sağlıklı insan DKG (hDKG) elde etmek sınırlayıcı bir faktör olmuştur. Bunun yerine, öncelikle gangliyonektomize edilmiş duyu nöronları çalışılmıştır. Bundan dolayı bazı çalışmalarda, daha verimli sonuçlar elde etmek için insan dokularının ve/veya hücrelerinin doğrudan incelenmesi yoluyla, hDKG nöronları üzerinde doğrudan çeşitli temel histokimyasal ve elektrofizyolojik parametreleri araştırılarak laboratuvar çalışmaları yapılmaya çalışılmıştır (Davidson vd., 2014, s. 1861; North vd., 2019, s. 1216).

Eksojen veya endojen araçlar, birincil afferent nöronların (pruriseptörler) periferik sinir uçlarının spesifik alt tiplerini uyarır. Pruritojenik araçlar için yüksek afiniteli reseptörler, uyarıyı hücre içi sinyal yoluyla periferden DKG ve omuriliğe iletir. Omurilikte kaşıntı sinyalleri modüle edilebilir (Paus vd., 2006, s. 1175).



Şekil 1.3. DKG'lerde sinyal iletim şeması (Paus vd., 2016)

Çok sayıda kanıt, DKG nöronlarının birkaç kolinerjik sistem bileşenini ifade ettiğini göstermiştir (Tata vd., 2000, s. 1). DKG nöronları, kısa bir seyirden sonra periferik ve merkezi bir dala ayrılan tek bir aksone sahip pseudo-unipolar nöronlardır (Rogers, 2011, s. 50; Sengul ve Watson, 2012a, s. 191). İnsanlarda, L5 DKG 11000 büyük, 32000 orta ve 25000 küçük nöron içerir (Sengul ve Watson, 2012a, s. 191).

DKG nöronları, hücre gövdelerinin boyutuna, aksiyon potansiyellerinin (AP) süresi ve genliğine, miyelinleşmenin boyutuna, nörofilamentlerin ekspresyonuna ve aksonal iletim hızlarına göre sınıflandırılmıştır (Ho ve O'Leary, 2011, s. 159). Sitokimyasal verilere ve elektrofizyolojik özelliklere dayanarak, DKG hücreleri, C, Aδ ve Aβ lifleriyle ilişkili küçük, orta ve büyük olmak üzere 3 tipte sınıflandırılır (Han, Mancino, Simon, 2006, s. 691; Zhang, Donnelly, LaMotte, 1998, s. 97).

DKG küçük ila orta çaplı nöronların, peptiderjik ve peptiderjik olmayan iki alt gruba ayrılacağı bildirilmiştir; bir sınıf trkA reseptörlerini eksprese eder ve nöropeptitleri içerir ve diğeri glial hücre dizisinden türetilen nörotrofik faktöre bağlıdır

ve birkaç nöropeptit içerir ve izolektin B4 (IB4)'ü bağlar (Kajihara vd., 2010, s. 295; McCoy vd., 2012, s. 1; Michael ve Priestley, 1999, s. 1851). Peptiderjik nöronların en yaygın tanınan belirteçleri CGRP ve P maddesidir (McCoy vd., 2012, s. 1).

DKG nöronları; glutamat reseptörleri, TNF alfa reseptörleri, transient receptor potential cation channel subfamily V member (TRPV) kanalları (TRPV1, TRPV2, TRPV4), sodyum kanalları, vb. gibi reseptörleri ve iyon kanallarını içerir (Djouhri vd., 2003, s. 565; Gong, Ohara, Jasmin, 2016, s. 1; Kittaka, Tominaga, 2017, s. 23).

Natriüretik polipeptit b (Nppb), DKG nöronlarının küçük bir alt kümesinde bulunmuş ve farelerde, kaşıntı hissinde rolü olduğu düşünülmektedir (Kittaka, Tominaga, 2017, s. 23; Mishra ve Hoon, 2013, s. 968). DKG nöronlarında, GABA, ligand kapılı klorür kanallarının GABAA sınıfını aktive etmektedir (Vlachova vd., 2001, s. 725).

DKG nöronları, CGRP, enkefalin, IB4, nöropeptid Y, dopamin, nörotensin, P maddesi, somatostatin (STT), tirozin hidroksilaz ve vazoaaktif bağırsak polipeptidi immünoreaktivitesi içerebilir (Sengul ve Watson, 2012a, 2012, s. 209; Sengul ve Watson, 2012b, s. 429).

DKG, hasar gördüğünde çok çeşitli nöronal eksikliklere neden olabilmektedir. DKG lerdeki bir arıza, aksonal taşımanın yanı sıra hücrel metabolizmayı da etkileyebilir (Tomaszewski ve Büsselberg, 2008, s. 959). Nöronların çoğu zararlı termal, mekanik ve kimyasal uyaranlara veya ısınma ve soğuma gibi zararsız uyaranlara tepki verir (McCoy vd., 2012, s. 1).

DKG' de duyu nöronlarının aktivasyonu, akut ve kronik ağrı ve kaşıntı dahil olmak üzere farklı somatosensasyon süreçlerinde rol oynar (Bennett vd., 2019, s. 1079; Liu vd., 2009, s. 1355; Webb, 2003, s. 193). Omurga disklerinin, omurga kökleri üzerindeki olası sıkışması, VGSC' lerdeki değişiklikler ve modifikasyonları, duyu nöronların duyarlılaşmasına ve dorsal köklerde, şiddetli ağrıya neden olabilmektedir (Bennett vd., 2019, s. 1079; Felten, O'Banion, Maida, 2016, s. 78).

Nöropatik ağrı ile ilgili yapılan çalışmalarda, DKG' ye özgü iyon kanallarının fare ve sıçan nöropatik ağrı modellerinde ve insan nöropatik ağrısından farklı şekilde etkilediği gösterilmiş olsa da istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar tespit edilmemiştir (North vd., 2019, s. 1221). Son zamanlardaki çalışmalarda nöropatik ağrıya etkili olduğu düşünülen miogabalin, güçlü ve uzun süreli analjezik etkilerini, sıçan DKG kültür nöronlarında $\alpha 2 \delta$ -1 alt birimlerine güçlü ve seçici bağlanma şeklinde, N-tipi kalsiyum

kanal akımlarının fonksiyonel inhibisyonunu takiben gerçekleştirdiği düşünülmektedir (Kitano vd., 2018, s. 147).

Farelerde kaşıntı hissi oluşumu, DKG'lerden omuriliğe giden çok sayıda nöronal yolu kullanabileceğini göstermektedir (Wheeler vd., 2019, s. 1135). DKG'de bulunan birincil duyu nöronları, derideki periferik aksonları aracılığıyla pruritojenik uyarımları tespit ederek ve merkezi aksonları aracılığıyla sinyalleri omuriliğe göndererek kaşıntı oluşturmada önemli rol oynarlar (Wang vd. 2021,s. 2). Farelerde, kutanöz kaşıntılı bir tehdit üzerine DKG'den omurilik sinapslarına Nppb, STT, nöromedin B (NMB) ve gastrin salınan peptit (GRP) nöropeptitleri salınır (Sun ve Chen, 2007, s. 700; Wheeler vd., 2019, s. 1131).

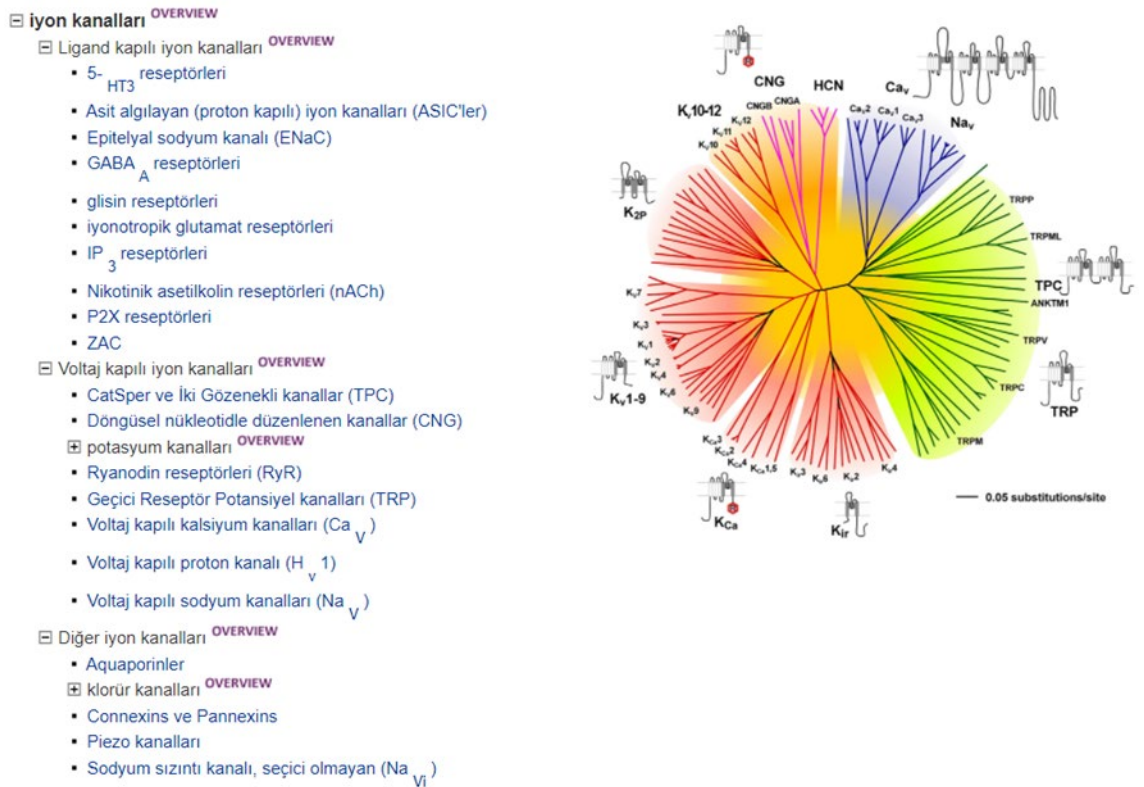
1.2. İyon Kanalları

Hücreler, canlı organizmanın temel birimlerini oluşturur ve organizmalarda tüm dokularda ve hücre tiplerinde, hücreler arası iletişim, homeostazı ve çeşitli fonksiyonlarının gerçekleştirilmesinde hücre membranında bulunan reseptörler ve iyon kanalları önemli görevleri yerine getirir (Bagal, 2013, s. 594; Düzgün Ergün ve Dursun, 2018, s. 94; Kurachi ve North, 2004, s. 246; Sigg, 2014, s. 7). Hücreler ve hücre içi organeller, biyolojik zarlarla çevrilidir (Wang ve Yule, 2018, s. 1698). İyon kanalları, yaşamın tüm yönleri için temel olan biyoelektriksel sinyallerin kaynağı, zarlarda gözenek oluşturan ve iyonların hücre zarlarından akışını düzenleyen transmembran proteinlerin kompleksleridir (Hille, 1978, s. 283; Moiseenkova-Bell, Delemotte, Minor, 2021, s. 1; Santoro vd., 1997, s. 14815; Sigg, 2014, s. 7; Wang ve Yule, 2018, s. 1698). Hücre zarında olduğu kadar mitokondri, endoplazmik retikulum ve çekirdek dahil hücre içi bölümlerin zarında da bulunan çok çeşitli bir protein grubu oluştururlar (Restrepo-Angulo, De Vizcaya-Ruiz, Camacho, 2010, s. 497). İyon kanalları, iyonların zarlardan pasif taşınması için bir iletkenlik yolu sağlar. Bu fonksiyonel moleküller, biyolojik sistemlerde tüm fizyolojik fonksiyonları etkiler ve nöronal sinyalleşme, kas kontrolü, algılama, kan basıncının düzenlenmesi, kardiyovasküler sistemde kalp atımı ve kasılması, ağrı, sıcaklık algılama, insülin salınımı gibi temel görevlerde kritik rol oynar (Bagal, 2013, s. 594; Düzgün Ergün ve Dursun, 2018, s. 94; Maffeo vd., 2012, s. 6250; Reiß, Koert, 2013, s. 2773; Restrepo-Angulo, De Vizcaya-Ruiz, Camacho, 2010, s. 497). Modülasyonları, kalp rahatsızlıkları, nörolojik belirtiler, böbrek yetmezliği, ağrı algısı ve körlüğü içeren çok çeşitli hastalıklarla ilişkilendirilmiştir (Bagal, 2013, s. 594). İyon kanalları, kronik ağrı,

depresyon, bağışıklık sistemi sorunları, aritmiler ve kanseri kapsayan rahatsızlıklar için ilaç hedefleridir (Moiseenkova-Bell, Delemotte, Minor, 2021, s. 1).

Spesifik iyon kanallarının insan DRG nöronlarında spontan aktiviteye katkıda bulunduğuna dair açık kanıtlar vardır (North vd., 2019, s. 1224). İyonların zarlardaki gözeneklerden taşınması hücre biyolojisi için temel öneme sahiptir. İyon kanallarının etkisi, canlılarda ses, koku, görme, tat ve dokunma biçiminde gerçeklik olarak algıladığımız şeylerin çoğundan sorumludur (Maffeo vd., 2012, s. 6250). Kanalların temel işlevleri, geçitlerin açılma ve kapanma ve hangi iyonların geçebileceğine karar vermedir (Moiseenkova-Bell, Delemotte, Minor, 2021, s. 1).

İyon kanallarının yapısı birçok bakımdan salgı yolunda üretilen diğer proteinlerinkine benzer olsa da, önemli farklılıklar görülmektedir. Bu farklılıkların bir nedeni, iyon kanallarının büyük ve karmaşık proteinler dizisini ifade etmesidir. (Green ve Millar, 1995, s. 280; Green, 1999, s. 163). İyon kanalları, insan genomunun dizilimi, 400'den fazla varsayılan iyon kanalı tanımlanmıştır (Bagal, 2013, s. 593).



Millar, 1995, s. 280; Moran vd., 2015, s. 515). İyon kanalları, zar potansiyelindeki değişikliklere duyarlı (çoğu Na, K, Ca ve bazı Cl kanalları gibi) voltaj kapılıdır, diğerleri (belirli K ve Cl kanalları, TRP kanalları, ryanodin reseptörleri gibi) nispeten voltaja duyarsızdır ve hücre zarında, hücre içi ve/veya hücre dışı araçlar tarafından aktive edilebilen seçici gözenekli yapılardır. İyon kanalları ve ligand kapılı kanallar arasındaki farklarla ilgili sınırlar çok belirgin değildir (Alexander vd., 2021, s. 158; Tomaszewski and Büsselberg, 2006, s. 50).

İyon kanallarından geçişler; moleküler sinyallerin tanınması (ligand geçişi), membran potansiyelindeki değişiklik (voltaj geçişi), mekanik/konformasyonel değişiklikler (mekaniğe duyarlı kanallar) ve (geçici olarak) kovalent modifikasyon yoluyla gerçekleşir (Reiß, Koert, 2013, s. 2774). Gözenekler, ya hep ya hiç prensipine göre çalışır (Hille, 1978, s. 283).

Dinlenme halindeki sinir hücreleri, sinirin iç kısmının dışa göre elektrik potansiyeli olarak tanımlanan bir AP korur. Dinlenme AP negatiftir ve genellikle -40 ila -95 mV aralığındadır. Sinir hücrelerinin aksonları, iletişim için kullanılan sinyallerin pozitif AP iletimini destekler (Maffeo vd., 2012, s. 6251). Akson ve kas zarlarının elektriklerle uyarılması, Na⁺, K⁺ ve Ca²⁺ iyonlarına geçici geçirgenlik artışlarına neden olur (Hille, 1978, s. 283). Yapılan araştırmalarda AP'nin depolarizasyon fazının sodyum geçirgenliğindeki artışa bağlı olduğu, AP yükselişini takip eden repolarizasyon ve hiperpolarizasyonun ise potasyum geçirgenliğindeki artıştan kaynaklandığı bulunmuştur (Catterall, 1992, s. 15).

İyon kanallarının arızalanması, hücre içi yollar için ciddi sonuçlara ve hücresel işlev bozukluğuna yol açabilir (Tomaszewski and Büsselberg, 2006, s. 50).

1.2.1. HCN kanalları

Somatik duyuda birçok DKG nöronu Hiperpolarizasyonla aktive olan siklik nükleotid kapılı (HCN) kanalları içerir (Benarroch, 2013, s. 308). HCN kanalları, gözenek halkası katyon kanallarının geniş üst ailesi içindeki siklik nükleotid kapılı katyon kanallarının alt grubu bir protein ailesini oluşturur. Memelilerde, HCN kanal ailesi, diğer gözenek döngüsü kanalları gibi, merkezi gözenek etrafında düzenlenmiş 4 alt birim şeklinde, kalp ve sinir sisteminde bulunan dört üyeden (HCN1-4) oluşan komplekslerdir (Benarroch, 2013, s. 304; Biel vd., 2009, s. 847; Herrmann, Schnorr, Ludwig, 2015, s. 1430; Lee ve MacKinnon, 2017, s. 112).

HCN kanalları omurgalılarından ve birkaç omurgasızdan klonlanmıştır, ancak *Caenorhabditiselegans*, maya ve prokaryotlarda yoktur (Biel vd., 2009, s. 851). HCN kanalları, kalpte kardiyak dokuda ve merkezi ve periferik sinir sistemlerinde nöronal dokularda olmak üzere çeşitli dokulardan biyofiziksel özelliklere sahip farklı homotetramerler veya heterotetramerlerden oluşan dört farklı izoform (HCN1–4) olarak klonlanmıştır (Altomare vd., 2003, s. 347; Atherton vd., 2010, s. 16025; Benarroch, 2013, s. 304; Chaplan vd., 2003, s. 1169; DiFrancesco ve DiFrancesco, 2015, s.1).

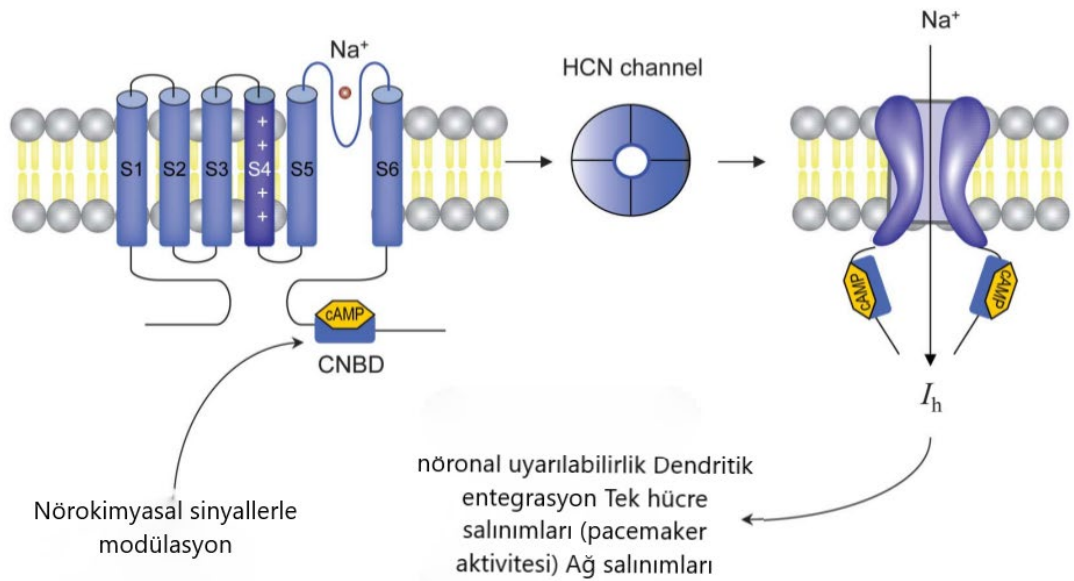
HCN1, immünoreaktivite, neokorteks, hipokampus, superior kollikulus ve serebellumda yoğun olarak ağırlıklı olarak kortikal dağılım gösterir ve neokorteks, hipokampus, beyin sapı, omurilik ve DKG’de eksprese edilir (Benarroch, 2013, s. 304; Notomi ve Shigemoto, 2004, s. 241). DKG’de, HCN1 en çok bulunandır (Chaplan vd., 2003, s. 1169). İnsan HCN2 geni, HCN kanalını kodlayan tanımlanan ilk memeli genidir (Vaccari vd., 1999, s. 421). HCN2, talamus, beyin sapı çekirdekleri olmak üzere beyin boyunca ve küçük nosiseptif DKG nöronlarında en yüksek ekspresyonla, yaygın bir dağılıma sahiptir. HCN3, hipotalamusta bulunur, olfaktör bulbus ve hipotalamus dışında MSS’de çok düşük seviyelerde eksprese edilir ve HCN4, medial habenula, talamus, talamik çekirdeklerde, ventral koklear çekirdekte ve koku soğancığında güçlü bir şekilde eksprese edilir (Benarroch, 2013, s. 304; Notomi ve Shigemoto, 2004, s. 241). Nöronlarda, HCN kanalları, bazı durumlarda heterojen bir dağılımla, dendritlerde ve akson terminallerinde de eksprese edilir (Benarroch, 2013, s. 304). Farklı dokulardaki hiperpolarizasyonla aktive olan kanalların özellikleri arasındaki farklar uzun zamandır bilinmektedir (Altomare vd., 2003, s. 356)

HCN Kanallarının İşlevsel Rollerini üç gruba ayırırlar: uyarıcı, engelleyici ve modülatör işlevler (Kase ve Imoto, 2012, s. 2). HCN kanalları, sinir sistemindeki nöronal uyarılabilirliğin ve ağ aktivitesinin kontrolünde temel bir rol oynar (DiFrancesco ve DiFrancesco, 2015, s.7). HCN kanalları nöronal aktiviteye çeşitli şekillerde katkıda bulunur; nöronal uyarılabilirlik, sinaptik potansiyellerin dendritik entegrasyonunu, sinaptik plastisite ve hafıza, talamokortikal ritimler, somatik duyum mekanizmaları, sinaptik iletimi ve bireysel nöronlarda ve nöronal ağ işlerinde ritmik salınım aktivitesinin üretimi ve modülasyonu ve plastisite fenomeni, motor öğrenme, tekrarlayan ateşleme üretimi dahil birçok hücre fonksiyonunda ve bunun gibi bir dizi önemli nöronal fonksiyonda rol sahibi olarak hizmet eder (Atherton vd., 2010, s. 16025; Baruscotti vd., 2010, s. 405; Benarroch, 2013, s. 304; DiFrancesco ve DiFrancesco, 2015, s.1).

Hiperpolarize potansiyellerde içe doğru akım oluşturan hiperpolarizasyonla aktive olan akım, ilk olarak kalp hücrelerinde, kalp pili akımlarının temelini oluşturmuş ve daha sonra birincil afferent DKG nöronları dahil çeşitli nöronlarda tanımlanmıştır (Gao vd., 2012, s. 4692; Lee ve MacKinnon, 2017, s. 111).

HCN kanalları kusurlu olması, insanlarda nörolojik bozuklukların nedeni olarak potansiyel aday görülmektedirler. HCN kanallarının yokluk nöbetlerinin, ateşli nöbetler ve Parkinson hastalığı olmak üzere beyin bozukluklarına neden olduğu görülmüştür. Birçok epilepsi modelinde status epileptikus oluşumunu takiben azalmış, işlevsizleşmiş HCN kanal aktivitesi rapor edilmiştir. Azalmış HCN kanal aktivitesinin, Parkinson hastalığının kemirgen modellerinde globus pallidusun dış segmentindeki patogenezinde potansiyel rolü çıkmıştır (DiFrancesco ve DiFrancesco, 2015, s.1; Kase ve Imoto, 2012, s. 5).

Her bir HCN kanalı alt birimi 3 ana yapısal modülden oluşur: transmembran çekirdek ve sitozolik amino (N)-terminal ve karboksi (C)-terminal alanları. Transmembran çekirdek, geçit mekanizması ve pozitif yüklü bir voltaj sensörü (S4) ve S5 ile S6 arasındaki iyon ileten gözenek bölgesi dahil olmak üzere 6 transmembran segmentinden (S1–S6) oluşur. Sitozolik C-terminal alanının yakın proksimal kısmı, siklik nükleotitler tarafından modülasyona aracılık eden siklik nükleotit bağlama alanı (CNBD) ve CNBD'yi transmembran çekirdek (C-bağlayıcı) ile bağlayan peptitten oluşur (Benarroch, 2013, s. 304; Biel vd., 2009, s. 852).



Şekil 1.5. Hiperpolarizasyonla aktive olan siklik nükleotid kapılı kanalların yapısı ve işlevleri (Benarroch, 2013)

HCN kanalları, voltaja bağlı K^+ (K_v) kanalları K_v10 ila K_v12 ile bağlantılıdır (Lee ve MacKinnon, 2017, s. 112).

HCN kanalları, hem K^+ hem de Na^+ için geçirgendir ve depolarizasyonların altında yatan ritmik AP'ler oluşumunu modüle eder. HCN kanalları, -50 mV'a kadar negatif voltajlarda hiperpolarizasyon ile aktive edilen katyon kanallarıdır (Atherton vd., 2010, s. 16025; Benarroch, 2013, s. 304; Biel vd., 2009, s. 848; Chaplan vd., 2003, s. 1169; Kase ve Imoto, 2012, s. 1; Lee ve MacKinnon, 2017, s. 111). HCN kanalları, membran hiperpolarizasyonu üzerine açılır ve hücre içi cAMP tarafından aktive edilir. HCN kanal ailesi içinde, HCN1, cAMP tarafından en hızlı kinetik ve en zayıf modülasyona sahip alt tiptir; hem HCN2 hem de HCN4, cAMP tarafından güçlü bir şekilde modüle edilir (Atherton vd., 2010, s. 16025; Benarroch, 2013, s. 305; DiFrancesco, 1999, s. 367). cAMP, doğrudan HCN kanallarının CNBD bağlanır ve aktivasyon eğrilerini daha pozitif voltajlara kaydırır, böylece kanal aktivitesini artırır (Alexander vd., 2021, s. 191; Biel vd., 2009, s. 849).

HCN kanalları, periferik sinir sisteminde geniş ölçüde ifade edilir ve son kanıtlar, ağrının iletilmesinde HCN2 izoformunun önemini vurgulamış, Nav1.8 eksprese eden nosiseptif DRG nöronlarıyla sınırlı seçici HCN2 delesyonunun, prostaglandin E2 (PGE2) gibi proinflatuar uyaranlar tarafından tetiklenen ısı hiperaljezisini önlediği tespit edilmiştir. Buna karşılık HCN2 ekspresyonu, cAMP üretimini artıran PGE2 gibi inflammatuar araçlara yanıt olarak AP'nin oluşumunu modüle etmede önemli bir role sahiptir (Benarroch, 2013, s. 308; Benarroch, 2013, s. 309; DiFrancesco ve DiFrancesco, 2015, s.1).

1.2.2. Na kanalları

Sodyum kanalları iki gruba ayrılabilir: voltaj kapılı (VGSC) ve voltaj kapılı olmayan sodyum kanalları (Restrepo-Angulo, De Vizcaya-Ruiz, Camacho, 2010, s. 498). Voltaj kapılı sodyum (Nav) kanalları, nöronlar gibi uyarılabilir hücrelerde, uyarının ilk iletimi, AP'nin başlatılmasında ve yayılmasında, AP'nin elektrojenez ve duyu nöron terminallerinden nörotransmitter salınımı için gereklidirler ve analjeziklerin ana hedefleridir (Bennett vd., 2019, s. 1079; Chang vd., 2018, s. 4; Restrepo-Angulo, De Vizcaya-Ruiz, Camacho, 2010, s. 498; Zhang vd., 2017, s. 1). VGSC'ler, işlevsel bir kanalın tüm temel özelliklerinden sorumlu α alt biriminden ve kanal yoğunluğunu ve/veya geçitleme özelliklerini etkileyen β alt biriminden oluşur. Dokuz Nav alt türü (Nav1.1 – Nav1.9) tanımlanmıştır; her alt tip, ayrı bir fizyolojik rol oynar ve ayrıca DKG

nöronlarında farklı ekspresyon modelleri sergiler. Nav 1.7, 1.8 ve 1.9 DKG'de yüksek oranda ifade edilir (Bennett vd., 2019, s. 1079; Chang vd., 2018, s. 4; Ho ve O'Leary, 2011, s. 159; Smith, 2020 s. 9; Zhang vd., 2017, s. 1). Voltaj geçişli sodyum kanalları (VGSC'ler), Nav1.7, Nav1.8 ve Nav1.9 ile yetişkin duyuşal nöronlara elektriksel uyarılabilirlik kazandırır (Doran vd. 2015,s. 9).

Memeli DKG nöronlarında iki farklı sodyum akımı ifade edilir ve TTX'e dirençli Na^+ artışlarını desteklediğı bilinmektedir. Biri hızla etkinleştirilen TTX'e duyarlı (TTX-S) sodyum akımı, diğeri yavaş yavaş etkinleştirilen TTX'e dirençli (TTX-R) sodyum akımıdır. Nav1.7, DRG nöronlarındaki TTX-S Na^+ akımlarının ana kanalıdır. Öncelikle C-tipi birincil afferent liflere sahip küçük DKG nöronlarının somasında bulunur. TTX-R sodyum akımları ağırlıklı olarak nosiseptif mekanizmalarda önemli olan küçük kapsaisine duyarlı C- ve A δ -nöronlarında ifade edilir (Fjell vd., 1999, 267; Ho ve O'Leary, 2011, s. 160; Kim vd., 2000, s. 191; Li vd., 2022, s. 700; Rizzo, Kocsis, Waxman, 1994, s. 2797; Zhang vd., 2019, s. 4).

VGSC alt tipi Nav1.7, periferik nosiseptif nöronlarda yaygın olarak eksprese edilen bir transmembran proteinidir. Özellikle son genetik çalışmalar, Nav1.7'nin, insanlarda, periferik sinir sistemi yoluyla AP'nin başlatılmasında, iletilmesinde ve ağrı hissinde kritik bir rol oynadığını göstermiştir. Yapılan çalışmalarda hDKG'nin fare DRG (mDKG) 'ye kıyasla yüksek Nav1.7 oranına ve düşük Nav1.8 oranına sahip olduğunu bulunmuştur (Armstrong ve Hollingworth, 2021, s. 757; Chang vd., 2018, s. 5; Ho ve O'Leary, 2011, s. 160; Salvatierra vd., 2018, s. 5434; Zhang vd., 2019, s. 2). Nav1.7'nin farmakolojik blokajının, metilglukokal veya streptozotosin kaynaklı diyabetik farelerde indüklenen kaşıntıyı azalttığı, bu da Nav1.7'nin tip 1 diyabetli bir fare modelinde kaşıntıda önemli bir rol oynadığını bildirdiğı bildirilmiştir (Zhang vd., 2019, s. 2).

VGSC'ler, yeni terapötiklerin geliştirilmesi için bir hedef olmuştur, bu kanalların biyofiziksel özelliklerindeki, dağılımındaki ve/veya ekspresyonundaki değişikliklerin nöronal uyarılabilirliğin düzenlenmesine katkıda bulunduğı da kabul edilmektedir (Zhang vd., 2017, s. 1). Nöropatik ağrının aktivitesinin bir kısmı, voltaj kapılı Na^+ kanallarının ve HCN kanalların modülasyonu, artan aktivitesi ve/veya ekspresyonundan kaynaklanmaktadır (Smith, 2020, s. 1).

1.2.3. K kanalları

Potasyum kanalları hem uyarılabilir hem de uyarılabilir olmayan hücrelerde bulunan çeşitli ve her yerde bulunan, sinir sistemindeki elektriksel sinyal ağlarının temel

bileşenleri olan membran proteinleridir (Maffeo vd., 2012, s. 6254; Restrepo-Angulo, De Vizcaya-Ruiz, Camacho, 2010, s. 500). K^+ kanalları, kalp hızının düzenlenmesi, kasılması, insülin, prolaktin, büyüme hormonu ve kolesistokinin gibi hormonların salgılanmasında, epitelyal elektrolit taşınması, hücre hacminin düzenlenmesi ve hücre proliferasyonu dahil olmak üzere çok çeşitli fizyolojik süreçlerde, ayrıca nörotransmitter salınımı, nöronal uyarılabilirlik gibi nöronal fonksiyonların etkilediği epilepsi, demans, anksiyete, ağrı, depresyon ve felç gibi MSS bozukluklarını kontrol etmek için önemlidir. Bu nedenle, K^+ kanalları multipl skleroz dahil birçok hastalıkta potansiyel terapötik ilaç hedefleri olarak kabul edilmiştir. Bugün 80'den fazla K^+ kanalı ve K^+ kanalla ilgili genler tanımlanmış ve birçok önemli doğal K^+ akımının moleküler bileşim anlaşılmasına başlamıştır (Maffeo vd., 2012, s. 6254; Smith, 2020, s. 10; Wickenden, 2002, s. 157).

DKG'de ifade edilen K^+ kanalları arasında gecikmeli düzelticiler ($Kv1.1$, 1.2), A kanalları ($Kv1.4$, 3.3 , 3.4 , 4.1 , 4.2 ve 4.3), KCNQ veya M kanalları ($Kv7.2$, 7.3 , 7.4 ve 7.5), ATP'ye duyarlı kanallar ($Kir6.2$), Ca^{2+} ile aktive olan K^+ kanalları ($KCa1.1$, 2.1 , 2.2 , 2.3 ve 3.1), Na^+ ile aktive olan K^+ kanalları ($KCa4.1$ ve 4.2) ve iki gözenekli alan sızıntı kanalı ($K2p$; TWIK ile ilgili kanallar) bulunur (Smith, 2020, s. 1).

Potasyum kanalları açık olduklarında, K^+ iyonlarını difüzyon sınırına (saniyede yaklaşık 108 iyon) oldukça yakın hızlarda iletirler (Maffeo vd., 2012, s. 6254). Bazı voltaj kapılı K^+ (Kv) kanalları, membran potansiyelindeki bir değişikliğe tepki olarak aktive edilir. Bu kanallar hücre üzerindeki depolarize edici etkilere karşı hareket eder ve AP'ni repolarize etmede önemlidir. Diğer K^+ kanallar, hücre içi Ca^{2+} 'daki (Ca^{2+} aktive edilmiş K^+ kanalları) yükselmelerle aktive edilir. Ca^{2+} , spontane geçici dışa akımları (STOC)'leri vermek için lokalize potasyum kanallarını uyarır. STOC'ler zarı hiperpolarize ederek gevşemeye yol açar (Berridge, 1997, s. 297). Bu kanallar aşırı Ca^{2+} girişini önler ve kas gevşemesinde ve nörotransmitter salınımının inhibisyonunda rol oynar (Wickenden, 2002, s. 158).

K^+ kanallarının iletkenliği, seçicilik kanalına bağlanan Na^+ iyonları tarafından bloke edilebilir (Maffeo vd., 2012, s. 6281). AP güçlenerek akson boyunca yayılır. Voltaj bağımlı K kanalları; sodyum kanalları inaktive edildikten sonra V_m 'yi dinlenmeye getirmek için açılırlar ve AP'ni tamamlarlar (Armstrong ve Hollingworth, 2021, s. 757).

$Kv7.2$, 7.3 ve 7.5 kanalları, DKG nöronlarının somaları ve aksonları, periferik ve merkezi terminalleri dahil olmak üzere ağrı yolunun tüm seviyelerinde eksprese edilir (Djoughri, Zeidan, Abd El-Aleem, 2020, s. 2). DKG'lerde K^+ kanalının sadece bir alt

tipindeki bozulmanın in vivo ağrı belirtileri üretebileceği vurgulanmaktadır. Nöropatik ağrının başlangıcında ve devamında K⁺ kanal disfonksiyonu olduğuna dair kanıtlar vardır (Smith, 2020, s. 1).

1.3. Histamin

Histamin, nöronal ve nöronal olmayan kaynaklar tarafından salınan, merkezi ve periferik dokularda çok sayıda işlevi yerine getirmek için kimyasal bir haberci olarak çalışan önemli bir fizyolojik amindir (Bachert, 2002, s. 287; Cannon vd., 2007, s. 1; Oda vd., 2000, s. 36781). Biyojenik amin olan histamin, MSS'de termo ve immünoregülasyon, gıda alımı, hipereksitabilite, ağrı iletimi, uyarılma, ödül, hafıza ve duygusal tepkiler dahil olmak üzere sinir sisteminde transmitter ve bağırsakta, deride ve bağışıklık sisteminde bir sinyal molekülü gibi çeşitli biyolojik fonksiyonlarda yer alan önemli bir nörotransmitter ve nöromodülatördür. Memeli beyinde histamin sentezlenir ve histaminerjik sistemin temel organizasyonu ve fonksiyonel düzenini sağlar (Ennaceur vd. 2012, s. 59; Shibuya vd., 2012, s. 22).

Periferik sinirlerde histamin bulunduğu biyokimyasal çalışmalarla gösterilmiştir. Histaminin varlığı ve ontogenetik dağılımı, periferik sinir sisteminde incelendiğinde, Histamin immünreaktivitesi (IR) ilk olarak periferik sinirlerde embriyonik 14. günde ortaya çıktığı ve omurilik ve ganglionlarındaki birçok duyuşal nöronunda, periferik sinir uçlarında gözlenmiştir. Embriyonik 14. günde başlayan gelişim sırasında, servikal, torasik ve lomber seviyelerde omuriliğin ventral boynuzlarındaki motonöronlar ve DKG'lardaki nöronlarda ve sinir liflerinde histamin IR tespit edilmiştir. Histamin immünoreaktif sinirlerin sayısı ve yoğunluğu, embriyonik günler 16-18'de en yüksek seviyede olduğu gözlenmiştir (Happola vd., 1991, s. 112; Heron vd., 2001, s. 167).

Histamin nöronlarının, hem uyarıcı hem de baskılayıcı eylemlerle MSS üzerinde ikili bir etkiye sahip olduğu öne sürülmektedir. Bir uyarıcı olarak nöronal histamin, dikkati uyaran ve uyanıklığı sürdüren en önemli sistemlerden biridir. Beyinde histamin aynı zamanda biyolojik korumada çeşitli zararlı ve olumsuz konvülsiyon, ilaç duyarlılığı, denervasyon aşırı duyarlılığı, iskemik lezyonlar ve stres duyarlılığı uyaranlarının baskılayıcısı olarak işlev görür (Shibuya vd., 2012, s. 22). Beyinde histamin uyanıklığı teşvik eder ve farklı davranışları ve homeostatik işlevleri düzenler. Son kanıtlar, beyindeki anormal histamin sinyalinin, bağımlılık yapan davranışlarda ve Parkinson hastalıkları ve multipl skleroz gibi dejeneratif hastalıklarda da önemli bir faktör olabileceğini düşündürmektedir (Passani, Panula, Lin, 2014, s. 4). Uyarılmayı ve dikkati

teşvik eden ve normal hayvanlarda öğrenmeyi geliştiren histaminergic nöronların aktivasyonu, dikkat eksikliği hiperaktivite bozuklukları ve Alzheimer hastalığı gibi insan dikkat ve yaşlanma bozukluklarında semptomatik bir terapötik yaklaşım olarak önerilmiştir (Morisset vd., 2000, s. 863). Ayrıca, histamin ile DKG nöronlarının uyarılması, STT miktarında önemli bir artışa neden olur (Wheeler vd., 2019, s. 1134).

Omuriliğin dorsal boynuzunda histamin, kaşıntı ve ağrı için histamin seçici lamina I somastatin (STT) nöronları, spesifik olarak karşılık gelen birincil afferent lif tipinden girdi alarak, periferik C lifleri tarafından aktive edildiği bulunmuştur (Andrew ve Craig, 2001, s. 73; Green ve Dong, 2016, s. 157).

Histamin, iltihaplanma, alerjik aşırı duyarlılık ve kaşıntı gibi çevresel duyuşal bilgilere aracılık etmede önemlidir. Periferik dokudaki aktif mast hücrelerinden salınan, lokal iltihaplanma, alerjik aşırı duyarlılık ve kaşıntıya neden olan histamin, çevresel duyuşal bilginin işlenmesinde rol oynar. Histamin, iltihaplanma bölgelerinde salınarak kan akışını ve damar geçirgenliğini artırır ve hiperemi ve ödem üretiminde önemli bir faktördür. Oluşan ödem, sıcaklık, eritem ve ağrıya neden olur ve granüositlerin kan damarlarından iltihaplanma bölgelerine geçişini kolaylaştırır. Son araştırmalar periferik iltihaplanmanın duyuşal alımda, duyuşal yapı ve duyuşal iletimde estetik değişikliklere neden olduğunu göstermiştir (Amano vd., 2001, s.204; Rowley ve Benditt, 1956, s. 399; Yue vd., 2014, s. 891; Wells vd., 2015, s. 26).

Kaşıntı, bazı açılardan ağrıya benzeyen, ancak içsel duyuşal kalitesi ve kaşıma dürtüsü açısından farklı olan, karmaşık, hoş olmayan bir kutanöz duyumdur (Roberson vd., 2013, s. 2). Kronik kaşıntı, yaşam kalitesini düşüren ağır bir klinik problemdir. Histaminin kaşıntıya neden olur ve böcek ısırıkları gibi birçok kaşıntıyı indükleyen uyaranlara aracılık eden en iyi endojen ajan olarak bilinmektedir (Akiyama vd., 2012, s. 1; Green ve Dong, 2016, s. 155; Kajihara vd., 2010, s. 292; Li vd., 2022, s. 700; Min vd., 2014, s. 1; Shim ve Oh, 2008, s. 1). Histaminin C liflerinin bir alt kümesini uyardığı ve derideki aktiveleştirilmiş mast hücrelerinden salınan histaminin kaşıntı hissine neden olduğu bilinmektedir (Kim vd. 2004, s. 159; Yu vd., 2013, s. 649). Nöropeptit salınımını takip eden alevlenme, histamin kaynaklı kaşıntının ayırt edici özelliğidir (Green ve Dong, 2016, s. 156). Ancak, kronik kaşıntıda birincil role sahip değildir (Akiyama vd., 2012, s. 1; Roberson vd., 2013, s. 2). Histaminin ayrıca kaşıntıya neden olmayan (örneğin mekanik) uyaranların ürettiği kaşıntı hissi ve aloknezi indüklediği bildirilmiştir (Amano vd., 2001, s.204). DKG hücrelerinin çoklu kaşıntı araçlarına tepkisi yaşla birlikte

azalmakta, histamine de tepki veren klorokin tepkili DKG hücrelerinin yüzdesi, genç farelerde yetişkin farelere göre daha fazla olduğu görülmüştür (Akiyama vd., 2012, s. 6).

Histamin reseptörlerine etki eden histamin çeşitli kimyasal uyarılarla indüklenir. Histamin veya diğer olası kaşıntılı araçlar, esas olarak derideki duyu liflerine yakın bulunan kutanöz mast hücrelerinden ve dokulardan ovomukoid tarafından salınır (Han, Mancino, Simon, 2006, s. 691; Rowley ve Benditt, 1956, s. 399; Yue vd., 2014, s. 884). Keratinositler, nöronlar ve enflamatuvar koşullar altında mast hücreleri histamin üretebilir (Doran vd. 2015, s. 11; Green ve Dong, 2016, s. 155; Kajihara vd., 2010, s. 292). Histamin, polimodal C-lif nosiseptörlerinin bir alt popülasyonunu uyarabilir (Han, Mancino, Simon, 2006, s. 691). Histidin dekarboksilaz (HDC, L-histidin karboksilaz), L-histidinin histamine dekarboksilasyonunu katalize eder, histamini oluşturan tek enzimdir (Watanabe vd., 1991, s. 145).

Histamin, kaşıntı mekanizması hem fosfolipaz C β 3 (PLC β 3)'ün hem de TRPV1 kanalının işlevini ihtiyaç duymaktadır (Imamachi vd., 2009, s. 11330; Mishra ve Hoon, 2013, s. 968; Roberson vd., 2013, s. 2).

Ca²⁺ görüntüleme çalışmaları, mast hücre aktivatörü olan bileşik 48/80'in, seçici bir H1 agonisti olan histamin-triflorometil-toluidin ve PLC β 3'ün kültürlenmiş duyu nöronlarında IB4⁺ nöronları olan periferik C-fiber nosiseptörlerinin bir alt kümesinde, histamin H1 reseptörü aracılığıyla histamin kaynaklı kalsiyum tepkilerine tepki vererek kaşıntı hissine aracılık ettiğini ortaya koymuştur (Han, Mancino, Simon, 2006, s. 691; Imamachi vd., 2009, s. 11330; Jang vd., 2015, s. 257; Liu vd., 2009, s. 1355). Ayrıca, histaminin PLA2 ve LO'yu uyararak Ca²⁺'de artışa neden olduğu tespit edilmiştir (Kim vd. 2004, s. 161).

Intradermal histamin enjeksiyonları üçlü reaksiyon üretir (nörojenik inflamasyonun üçlü yanıtı); kızarıklık, ödem, akson refleksi sonucu eritemin genişlemesidir. Dolaşıma daha fazla miktarda histamin girerse şoka neden olmaktadır (Grundmann ve Ständer, 2011, s. 4; Lewis, 1926, s. 62). Histaminin boyun ensesinin içine 0.4 ila 100 nmol'lük intradermal enjeksiyondan sonraki ilk 5-10 dakika içinde maksimum kaşıma meydana gelmiş ve 20 ila 30 dakika içinde azalmıştır (Akiyama vd., 2012, s. 2; Shim vd., 2007, s. 2334). Mast hücrelerini histamin salmak üzere degranüle eden 48/80 bileşiğinin de (100 mg/50 ml) intradermal enjeksiyonu, 30 dakika içinde şiddetli kaşınma davranışına neden olmaktadır (Dunford vd., 2007, s. 180; Han, Mancino, Simon, 2006, s. 696; Sun ve Chen, 2007, s. 701). Bunun yanında deneysel bir histamin kaşıntısına karşı insanda on iki lokal

anestezik denenmiş. Elde edilen verilere göre, kaşıntıyı önlemek için intradermal anesteziklerin nispeten yüksek konsantrasyonlarının gerekli olduğunu görülmüştür (Shelley ve Melton, 1950, s. 300).

Serbest sinir uçlarının (nosiseptörler) uyarılması, ağrı hissine yol açar. Histamin, salınımı nosiseptörleri hassaslaştırabilir ve/veya aktive edebilir ve ağrı iletimini kolaylaştırır (Kajihara vd., 2010, s. 292; Roberson vd., 2013, s. 11; Wells vd., 2015, s. 557; Yu vd., 2013, s. 649). Histaminin nöropatik ağrının gelişiminde bir aracı olabileceğini düşünülmektedir (Yue vd., 2014, s. 884). Birçok kanıt, bir enflamatuar aracı ve diğer kimyasal ajanların bir düzenleyicisi olan histaminin ağrı modülasyonuna katıldığını göstermesinin yanında, akut ağrıdaki rolü tartışmalıdır (Yu vd., 2013, s. 649).

Ayrıca intradermal olarak enjekte edilen P maddesi (SP) histamin salgılar ve kaşıntıya neden olur (Grundmann ve Ständer, 2011, s. 4). C-liflerinin aktivasyonu, histamin H reseptörleri ile etkileşerek, afferent iletimin yanı sıra, muhtemelen lokal akson refleksleri yoluyla P maddesi salınımına neden olmaktadır (Ohkubo vd., 1995, s. 87).

Mast hücreleri, eozinofilik granülositler ve T-lenfositler başta olmak üzere inflammatuar hücrelerde histaminin 4 reseptörü bulunmaktadır (Grundmann ve Ständer, 2011, s. 4; Kajihara vd., 2010, s. 292). Histamin, nörotransmitter ve lokal mediatör olarak biyolojik etkilerini, histamin reseptör (HR) alt tiplerine (H1 reseptör (H1R), H2 reseptör (H2R), H3 reseptör (H3R), ve H4 reseptör (H4R)) bağlanarak göstermektedir (Cannon vd., 2007, s. 2; Shibuya vd., 2012, s. 22; Strasser vd., 2013, s. 13).

Histamin, beyinde özellikle uyarılabilirlik ve plastisitenin kontrolü gibi birçok fonksiyona hizmet eder. H1 ve H2 reseptör aracılı eylemler çoğunlukla uyarıcıdır, H3 reseptörleri ise inhibitör oto ve heteroreseptörler olarak işlev görür (Shibuya vd., 2012, s. 22). Histamin H4 Reseptörleri, TRPV1 ve PLC ile kaşıntıya katılmaktadır (Jang vd., 2015, s. 261; Jian vd., 2016, s. 1).

Histamin, duyu sinir liflerinde ve endotel damar duvarlarında eksprese edilen H1R'e bağlanır (Grundmann ve Ständer, 2011, s. 4). Histamin ile uyarılan H1R beyinde, çoğu düz kas hücresinde, endotel hücrelerinde, adrenal medullada ve kalpte dağılmıştır. H1R, alerjik durumlarla yakın ilişkisi olan düz kas kasılması, nitrik oksit oluşumunun uyarılması, endotel hücre kasılması, vazodilatasyon ve kızarma, mukus salgılanması ve vasküler geçirgenliğinin artmasında rol oynar (Bachert, 2002, s. 288; Oda vd., 2000, s. 36781). H1R'nin aktivasyonu, faredeki kaşıntı sinyalini iletmek ve duyu nöronları açması ve uyarması için fosfolipaz A2/lipoksijenaz (PLA2/lo) yolları aracılığıyla TRPV1

kanallarını uyarır (Kajihara vd., 2010, s. 292; Wang vd. 2021, s. 5). Sinir hasarından sonra nosisepsiyon aracılı afferent nöronlarda H1R artar (Yue vd., 2014, s. 884).

Bununla birlikte, histamin, H2R aracılı yolak yoluyla primer afferent nöronlarda Nav1.8 ekspresyonunu arttırmakta ve orada nöropatik ağrıya katkıda bulunduğunu görülmüştür (Yue vd., 2014, s. 883). H2R, mide hücrelerinde, kalp dokularında ve düz kas hücreleri ve bağışıklık hücreleri gibi hücrelerde işlev gördüğü ve aktivasyonunun gastrik asit salgılanmasına neden olduğu bulunmuştur. H3R, merkezi sinir sistemindeki nörotransmitter salınımına dahil olduğu çeşitli doku tiplerinde eksprese edilmiştir (Green ve Dong, 2016, s. 155; Oda vd., 2000, s. 36781).

H3R'lerin çoğu beyinde yer almasına rağmen, H3R mRNA deri, sırt kök gangliyonları, mide, bağırsaklar ve kahverengi yağ dokusu dahil olmak üzere çeşitli beyin dışı dokularda da bulunur (Cannon vd., 2007, s. 2). Histamin H3 reseptörünün kobayda in vivo olarak adrenerjik olmayan kolinerjik olmayan (NANC) nöral bronkokonstriksiyonu modüle ettiği gösterilmiştir (Bachert, 2002, s. 288; Ohkubo vd., 1995, s. 83). H3R agonistlerinin uygulanması, kalp, akciğer ve derideki duyuşal liflerden nöropeptid salınımını inhibe ettiği ve H3R'lerin peptiderjik C lifleri üzerinde bulunduğu hipotezini öne sürmüştür. Araştırmalar H3R agonistlerinin anti-inflamatuar ve bazı antinosiseptif özelliklere sahip olduğunu ortaya koymuştur (Cannon vd., 2007, s. 2). Histamin H3R, P maddesi salınımının önceden düzenlenmesindeki rolü nedeniyle, inflammatuar yanıtın kontrolünde önemli olabileceği düşünülmektedir (Ohkubo vd., 1995, s. 87).

H4R'nin güçlü ve seçici ligandlarını kullanarak bu reseptörün hematopoietik hücrelerdeki işlevinden bağımsız olarak farelerde kaşıntılı tepkilerde rol oynadığı gösterilmiştir. Bazı kanıtlar, H4R antagonistlerinin (JNJ 777120) fare kaşıntı modellerinde diğer antihistaminiklerden daha etkili olduğunu ve inflammatuar hastalıkların tedavisinde bazı erken başarıları göstermiş ve anti-inflamatuar etkileri yeni farmakolojik ajanların inflammatuar kaşıntılı hastalığın tedavisi için alternatif ve etkili tedaviler sağlayabileceğini öne sürmüştür (Dunford vd., 2007, s. 182; Green ve Dong, 2016, s. 155).

Duyuşal nöronlarda histamin kaynaklı Ca^{2+} 'i artışına hangi reseptörün aracılık ettiğini belirlemek için, histamin reseptör antagonistleri kullanılarak deney yapılmış ve yalnızca H1R antagonisti mepiramin (1 mM), histamin kaynaklı Ca^{2+} influx değerini

önemli ölçüde azalttığı, simetidin ve thioperamide histaminin neden olduğu Ca^{2+} influx değerini azaltmada başarısız olduğu bulunmuştur (Kim vd. 2004, s. 161).

Yetişkin sıçanlarda histamin en çok mide duvarı ve mast hücre tümörlerinde üretilir, ayrıca köpek mast hücreli tümöründe de histamin oluşumu gözlenmiştir (Kahlson, Rosengren, White, 1960, s. 135). Histaminin sıçanda hiperemi ve ödem üretiminde önemli bir faktör olabileceğini tespit edilmiştir (Rowley ve Benditt, 1956, s. 399). Heparin, indüklenen histamin salınımı üzerinde inhibitör etki üretir. Heparinin histamin salınımı üzerindeki inhibitör etkisi hızlı olur ve böylece mast hücrelerinden histamin salınımını etkiler (Inase, Schreck, Lazarus, 1993, s. 387). Histamin, H2R baskılayıcı hücreler üzerinde aktivasyonu ile bağışıklık sistemini baskılayarak tümörün ilerlemesini kolaylaştırdığı düşünülmektedir. Histamin için böyle bir immünosupresan rolü, histamin H2R antagonisti simetidin, baskılayıcı hücre fonksiyonunun inhibe edilmesinin bir sonucu olarak tümör metastazlarını azalttığı tespit edilmiştir (Bartholeyns ve Bouclier, 1984, s. 645).

H1R antagonistlerinin kullanımı, kronik inflamatuvar ağrının tedavisine yönelik yaklaşımlardan biridir, H2R antagonistleri ise genellikle midede koruma ve tedavisine yönelik kullanılmaktadır. Öte yandan, kronik inflamatuvar ağrıda Nav1.8 yukarı regülasyonunun rolü kanıtlanmıştır. Histaminin aynı zamanda kronik inflamatuvar durum altında Nav1.8'in yukarı regülasyonuna katkıda bulunduğundan dolayı, yan etkilerin en aza indirilmesi açısından ve tedavi perspektifinde H2R antagonistlerinin kombinasyonunu kullanılması gerektiği düşünülmektedir (Yue vd., 2014, s. 891). Ayrıca, H2R antagonistleri, nöropatik ağrısı olan hastalar için potansiyel olarak analjezik olarak kullanılabilir (Yue vd., 2014, s. 883).

Histamin-duyarlı primer afferentlerin elektriksel olarak susturulması, kaşıntıyı bloke eder (Roberson vd., 2013, s. 11). Ürtikerli hastalarda olduğu gibi histamin aracılı kaşıntı, histamin reseptör antagonistleri kullanılarak etkili bir şekilde tedavi edilebilir (Akiyama vd., 2012, s. 1). H4R ve H1R antagonizminin bir kombinasyonunun, alerjik hastalıklarla ilgili kaşıntıyı tedavi etmek için yeni bir strateji olabileceğini düşündürmektedir. Bununla birlikte, normal dozlardaki antihistaminikler, çeşitli kronik kaşıntı formlarında zayıf etkinliğe sahiptir (Grundmann ve Ständer, 2011, s. 4). Antihistaminik ilaçlar ve mast hücre stabilizatörü, termal hiperaljezinin gelişimini inhibe etmektedir (Yue vd., 2014, s. 884). Histaminin PLA2/LO yolunu uyardıktan sonra TRPV1'i aktive ederek duyuşal nöronların uyarılmasına yol açmasından dolayı TRPV1

antagonistleri potansiyel kaşıntı önleyici ilaçlar olarak düşünülmektedir (Kim vd. 2004, s. 159).

H3R agonisti R-(-)- α metilhistaminin subkutan perfüzyonunun, sıçan duyu sinirlerinden antidromik elektriksel uyarılarla artan P maddesi salınımını inhibe edildiği ve bu inhibisyonun H3R antagonisti tioperamid tarafından bloke edildiği görülmüştür. Bu sonuç, histamin₃ reseptörünün, NANC sinirlerinin uyarılmasına yanıt olarak taşıkininlerin salınımı üzerinde inhibitör bir etkiye sahip olabileceği olasılığını ortaya koymaktadır (Ohkubo vd., 1995, s. 87). Histamin H3R antagonistleri/ters agonistlerinin, parkinson, alzheimer hastalığı, dikkat eksikliği hiperaktivite sendromu, şizofreni, obezite, ağrı, epilepsi, narkolepsi, madde bağımlılığı vb. dahil olmak üzere MSS'nin çeşitli hastalık durumlarını tedavi etme olasılığını ortaya çıkarmıştır (Morisset vd., 2000, s. 863; Vohora ve Bhowmik, 2012, s. 65).

1.4. Patch-Clamp Yöntemi

Patch-clamp kayıt teknikleri, Erwin Neher, Bert Sakmann, Owen Hamill ve Fred J. Sigworth tarafından geliştirilmiştir. Günümüzde patch-clamp yönteminin en yaygın kullanılan konfigürasyonlarından biri tüm hücre kayıt tekniğidir (Kornreich, 2007, s.26; Petersen, 2017, s. 1267). Patch-clamp kayıt tekniği, kanalların veya reseptörlerin aktivitelerini incelemek için güçlü bir yöntemdir. Bu tekniğin DRG nöronları üzerinde uygulanmasıyla çok sayıda çalışma yapılmıştır. DRG'ler nöronlarından yapılan patch-clamp çalışmaları, periferik sinir sistemi hakkında bilgi sağlamaktadır (Gong, Ohara, Jasmin, 2016, s. 1). Patch-clamp teknikleri, normal ve sinir hasarlı hayvanlarda DRG hücrelerinin elektrofizyolojik özellikleri ve/veya hücresel özellikleri üzerine yapılan çalışmalarda kapsamlı bir şekilde uygulanır (Zhang, Donnelly, LaMotte, 1998, s. 97).

Tek kanallı akım kayıt teknolojisi olarak da bilinen patch-clamp, iyon kanalının akımını ve iletkenliğini tespit etmek ve kaydetmek için hücre zarını kapatmak için cam mikro elektrot kullanan bir teknolojidir. Bu teknoloji, küçük hücrelerin voltajla sıkıştırılması, membranın içindeki ve dışındaki çözeltinin bileşiminin değiştirilmesi ve hücreye ilaç uygulanması için avantajlıdır (Ma vd., 2021, s. 521).

Otomatik patch-clamp deneyleri için, ölçülebilir akımlar elde etmek ve yüksek bir başarı oranı sağlamak için tercihen ilgilenilen iyon kanalını ifade eden hücreler kullanılır (Rotordam vd., 2021, s. 4). Elektrofizyolojik ve optik yöntemlerle, nöronların AP'nin hücresel yapısı hakkında bilgiler sağlayarak, aynı anda çok sayıda nörondan kayıt yapmak için geliştirilmiştir (Petersen, 2017, s. 1266).

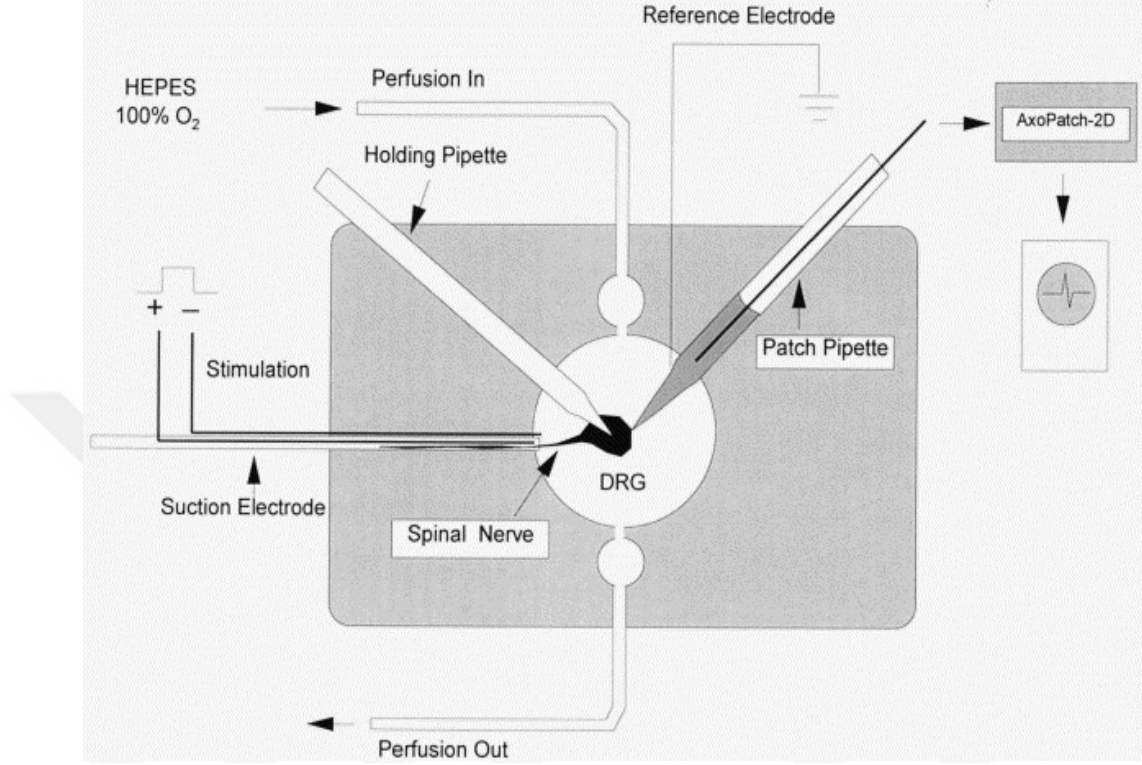
AP, membran potansiyeli (V_m) eşikin üstünde depolarize olduğunda harekete geçer (Petersen, 2017, s. 1266). Aksonun ilk segmenti, depolarizasyon üzerine açılan çok sayıda voltaj kapılı sodyum kanalına sahiptir, bu nedenle depolarizasyon dalgası bu bölgeye ulaşır ve VGSC'yi aktive ederek büyük bir sodyum akışına izin verir ve AP başlatır. Voltaj kapılı potasyum kanalları açıldıkça ve sodyum kanalları inaktive olurken, dışa doğru potasyum akımı, zar potansiyelinin tersine çevrilmesine neden olur ve onu dinlenme zar potansiyeline geri döndürür (Restrepo-Angulo, De Vizcaya-Ruiz, Camacho, 2010, s. 498).

İdeal bir numune hazırlamak için birkaç temel unsur vardır. İlk olarak, kullanılacak hayvanlar uygun anestezi kullanılarak dekapitasyon yapılır. DRG, gangliona yakın dorsal kökler ve spinal sinir kesilerek nöronlara zarar vermeden epineriesumu dikkatlice çıkarılır. DRG'lerden nöronları açığa çıkarmak için ve kalan bağ dokusunu sindirmek için sindirim enzimlerine yerleştirilir. Bozulmamış DRG'ler, 6 ila 8 saat boyunca canlılığı koruyacaktır ve bu süre boyunca stabil bir şekilde kaydedilebilir. Kayıt için seçilen hücreler yuvarlak, 18-25 μm (küçük) apta ve sıkıştırma için uygun olmalıdır. Hazırlanan sağlam DRG'ler (yaklaşık 30 dakika), in vivo koşullara daha yakın sonuçlar sağlamaktadır (Fjell vd., 1999, 269; Gong, Ohara, Jasmin, 2016, s. 1; Ho ve O'Leary, 2011, s. 160; Rizzo, Kocsis, Waxman, 1994, s. 2798).

Kayıtlar bir amplifikatör ve bir kayıt programı ile yapılır. Kayıt elektrotları (genelde 0.8–2 M Ω), kılcal cam (genelde 1,65 mm) kullanılır. Tutma potansiyelleri, genelde -80 mV dır. Uygun oranlarda hazırlanan pipet solüsyonları ve banyo solüsyonları kullanılır (Fjell vd., 1999, 269; Ho ve O'Leary, 2011, s. 160; Chaplan vd., 2003, s. 1169; Kajihara vd., 2010, s. 293; Renganathan, Cummins, Waxman, 2001, s. 630).

Mevcut hazırlığın bazı sınırlamaları vardır. Uydu glial hücrelerin oluşturduğu bariyerin varlığı, nöronların yamalanmasını zorlaştırır ve nöronlara ulaşan ilaç konsantrasyonunu sınırlayabilmektedir. Bu nedenle, hazırlıkta nörona erişmek için, uydu glial hücre tabakasına nüfuz etmeye yardımcı olmak için pipeti pozitif basınç altında tutmak önemlidir. Diğer bir sınırlama, DRG'yi ayırmak için dorsal köklerin ve omurilik sinirlerinin düzgün kesilememesidir. Bununla birlikte, periferik veya merkezi aksonlar soma ile aynı voltaja kenetlenemeyebileceğinden, kalan aksonun varlığı dikkate alınmalıdır, bu da voltaj kısıkcısı iletildiğinde potansiyel kayıt hatasına veya parazite neden olabilir (Gong, Ohara, Jasmin, 2016, s. 7). Hücreler kültürde ilk 48 saat boyunca incelenmelidir, çünkü daha sonraki zamanlarda çoğu hücrede voltaj-clamp kayıtlarının

niceliksel olarak güvenilirmez olmasına neden olan geniş bir nöritik büyümeye sahip olmaktadır (Rizzo, Kocsis, Waxman, 1994, s. 2798).



Şekil 1.6. Patch-Clamp deneysel düzeneğinin şematik diyagramı (Zhang, Donnelly, LaMotte, 1998)

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Gereçler

Tüm standart kimyasallar Sigma Aldrich'ten satın alındı. Histamin stok çözeltisi %100 dimetilsülfoksit (DMSO) içinde çözüldü ve 4° C'de saklandı. Tüm ilaçların nihai gerekli konsantrasyonu, DMSO oranının %0,3'ten az olduğu hücre dışı çözeltide (pH 7.4) günlük olarak taze olarak hazırlandı.

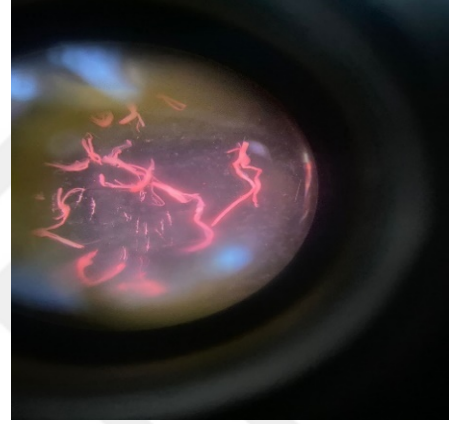
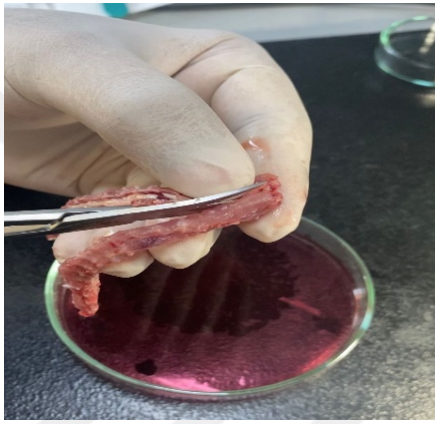
2.2. Hayvanlar

150-200 g ağırlığında ve 8-12 haftalık Sprague Dawley erkek sıçanları kullanıldı. Hayvanlar, 25 ± 1°C'de, 12 saat aydınlık ve 12 saat karanlık döngüsüne ve bağıl neme (%54 ± 5) ayarlanmış, iyi havalandırılan odalarda barındırıldı. Besleme amacıyla standart yem peletleri ve musluk suyu verildi.

2.3. DKG Diseksiyonu

Hayvana anestezi uygulamak için, sırasıyla ketamin ve ksilazin karışımları 90 mg/kg ila 10 mg/kg oranında yapıldı ve 1ml/kg (i.p.) enjekte edildi. Anestezi altındaki hayvana 5-8 dakika sonra dekapitasyon işlemi gerçekleştirildi. Daha sonra sırt derisi tüyleri tıraş edildi ve sırt omur hizası kesilerek açıldı ve inzisyondan sonra bir bütün olarak çıkarılan vertebral kolon kas dokusundan ayrıldı (Gong, Ohara, Jasmin, 2016, s. 2; Ho ve O'Leary, 2011, s. 160; Zhang, Donnelly, LaMotte, 1998, s. 98). Dokulardan arındırılmış vertebral kolon soğuk PBS içeren falcon tüpte 5 dakika tutuldu. Bundan sonraki işlemler laminar akış kabini altında yapıldı. Vertebral kolon, 4 °C'de Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) solüsyonu içeren petri kabına yerleştirildi ve iris makası kullanılarak ortasından simetrik iki parçaya ayrıldı (Görsel 2.1). Çıkarılan omurilik bölgesinden saç yaylı cımbız kullanılarak DKG'nin toplanmasına başlandı ve toplanan DKG'ler DMEM ve penisilin-streptomisin içeren bir petri kabına yerleştirildi ve sonra cerrahi lanset kullanılarak DKG'ler bağlı dokulardan temizlendi. Temizlenmiş hücreler, 1 ml DMEM ve penisilin-streptomisin içinde 2 mg kollajenaz tip IV (sigma) içeren bir Eppendorf tüpüne taşındı ve 45 dakika Eppendorf tüpünün ağzı açık şekilde her 10 dakikada bir çalkalanarak %95 O₂ ve %5 CO₂ ile 37°C'de inkübatörde tutuldu. Daha sonra hücreler, 30 saniye boyunca santrifüjleme ile üç kez PBS ile yıkandı ve her seferinde süpernatant ayrıldı. Ardından, 1 ml DMEM+Penisilin-Streptomisinli hücrelere 100 µl %0.25 tripsin+EDTA ilave edildi ve her 3 dakikada bir tüp sallanarak 6 dakika inkübe edildi. Sonrasında, 45 ila 60 saniye boyunca santrifüjleme ile DMEM ile 3 kez yıkandı ve her yıkamanın sonunda süpernatant atıldı. Eppendorf tüpündeki hücrelere 1

ml DMEM ilave edildi ve hücreler, 1 ml DMEM içeren 15 ml'lik falkon tüpe taşınarak toplamda 2 ml'lik çözelti elde edildi. Sonra mavi uçlu kesik pipet ile dakikada 4 kez olmak üzere 5 dakika boyunca yavaşça pipetleme yapıldı. Ardından hücreler, 5 dakika daha kesilmemiş mavi uçlu pipetle ve insülin şırıngasından 3 kez çok yavaş bir şekilde geçirildi. Hücrelerin 12.5 ml DMEM+penisilin-streptomisin+PBS çözeltisi içinde süspanse edilmesi ile hazırlama işlemi tamamlandı (Görsel 2.1). Elde edilen hücreler ile 1 ila 2 saat sonra çalışılmaya başlandı (Gong, Ohara, Jasmin, 2016, s. 2; Ho ve O'Leary, 2011, s. 160; Zhang, Donnelly, LaMotte, 1998, s. 98).



Görsel 2.1. DKG Diseksiyonu görüntüleri

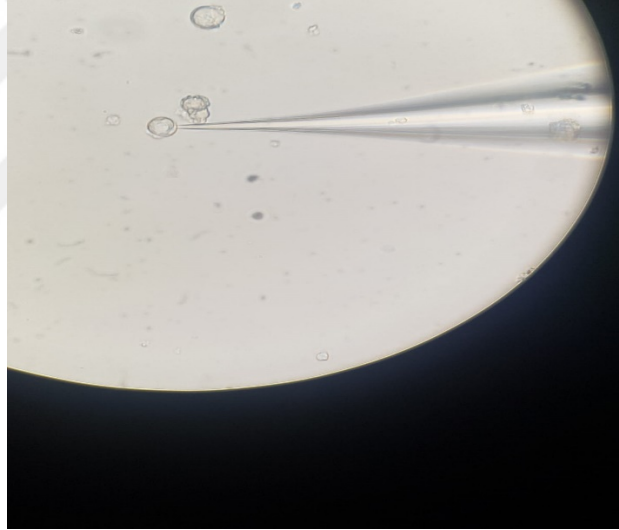
2.4.Voltaj-clamp Kayıt Yöntemi

Voltaj-clamp kayıtları, DKG hücrelerinden iyon akımlarını kaydetmek için, oda sıcaklığında, ekstrasellüler ortam solüsyonunda (mM olarak; NaCl 140, KCl 3, MgCl₂ 1, CaCl₂ 1, glukoz 10 ve HEPES ASİT 10. NaOH, 320 mOsm kullanılarak pH 7.3'e ayarlandı) yıkanmış, tüm-hücre voltaj-clamp konfigürasyonunda yapıldı. Voltaj-clamp kayıtları mikropipeti için, P-97 Mikropipet Çekici (Sutter Instrument) tarafından 2-5 MΩ'luk pipet direncine çekilen pipetler hazırlandı. İntrasellüler ortam solüsyonla (KCl 140, NaCl 10, MgCl₂ 2, CaCl₂ 0.1, EGTA 1.1, HEPES ASİT 10, D glukoz 3, KOH ile titre edilmiş pH 7.2, 310 mOsm) doldurulmuş, filamentli ince duvar borosilikat cam pipetler (Sutter Instrument BF150-110-10) kullanılarak, GΩ-sealleri (mühürleri) oluşturuldu.

Ağız yoluyla veya 1 ml'lik şırınga kullanılıp negatif basınç uygulanarak tüm-hücre (Whole-cell) konfigürasyonuna geçiş yapıldı ve seri dirençte yaklaşık 10 MΩ'a kadar büyük bir düşüş ve membran kapasitansının artması ile belirlenleştirildi. Kayıtlar oda

sıcaklığında yapıldı. Membran potansiyeli -60 mV'a kenetlendikten sonra 300 ms için 0 mV'ye depolarize edici atımlar yapıldı. Akım-voltaj ilişkileri (IV-eğrisi), -60 mV'den +60 mV'a 10 mV'lik artışlarla depolarizasyon adımları elde edildi. Test kimyasalı, 0 mV'a kadar çoklu depolarizasyon adımlarına yanıt olarak kararlı bir dışa doğru akım elde edildikten sonra uygulandı.

Windows®10 kurulu olan, SutterPatch® Veri Toplama ve Analiz Yazılımının (SutterPatch 2.0.4) kullanıldığı, voltaj-clamp modunda ayarlanmış Integrated Patch Amplifier (IPA;Sutter Instrument) ve kullanılarak akımlar kaydedildi. Veriler 25 kHz'de denendi ve IPA'nın yerleşik filtresi kullanılarak 5 kHz'de filtrelendi. Yazılımdaki otomatik kompanzasyon seçeneği kullanılarak elektrot kompanzasyonu ve seri direnç kompanzasyonu otomatik olarak uygulandı. Veriler aynı yazılım kullanılarak analiz edildi (SutterPatch 2.0.4).



Görsel 2.2. *Voltaj-clamp Yöntemi uygulama görseli*

2.5.Voltaj-clamp Kayıt Yöntemi Solüsyonları

İç pipet solüsyonu içeriği (mM cinsinden): KCl 140, NaCl 10, MgCl₂ 2, CaCl₂ 0.1, EGTA 1.1, HEPES ASİT 10, D glukoz 3. pH'ı 310 mOsm KOH ile 7.2'ye ayarlandı (tümü Wisent, Inc.'den).

Hücre dışı (banyo) solüsyonu oluşumu (mM olarak): NaCl 140, KCl 3, MgCl₂ 1, CaCl₂ 1, glukoz 18 ve HEPES ASİT 10. NaOH, 320 mOsm kullanarak pH'ı 7,3'e ayarlandı (tümü Wisent, Inc.'den).

Etkileri test etmek için histamin, 100 μ M final konsatrasyonunu verecek şekilde mediuma ilave edildi. Histamin ile ölçüm öncesi 3 dakika inkübasyon sağlandı. Kontrol olarak aynı konsantrastonda DMSO verildi.

2.6. İstatistiksel Analiz

OriginPro 2012 (64-bit),9.8.0.200 (Learning Edition), telif hakkı ©1991-2020 OriginLab şirketi ve GraphPad InStat programı da kullanılmıştır. Elektrofizyolojik veriler ortalama $\pm$ ortalamanın standart hatası olarak verildi. IV ölçümlerde eşleştirilmiş Student t testi ve gerektiğinde (karşılaştırmalar) tek yönlü ANOVA prosedürü kullanıldı. $p < 0,05$ değeri anlamlı kabul edildi.

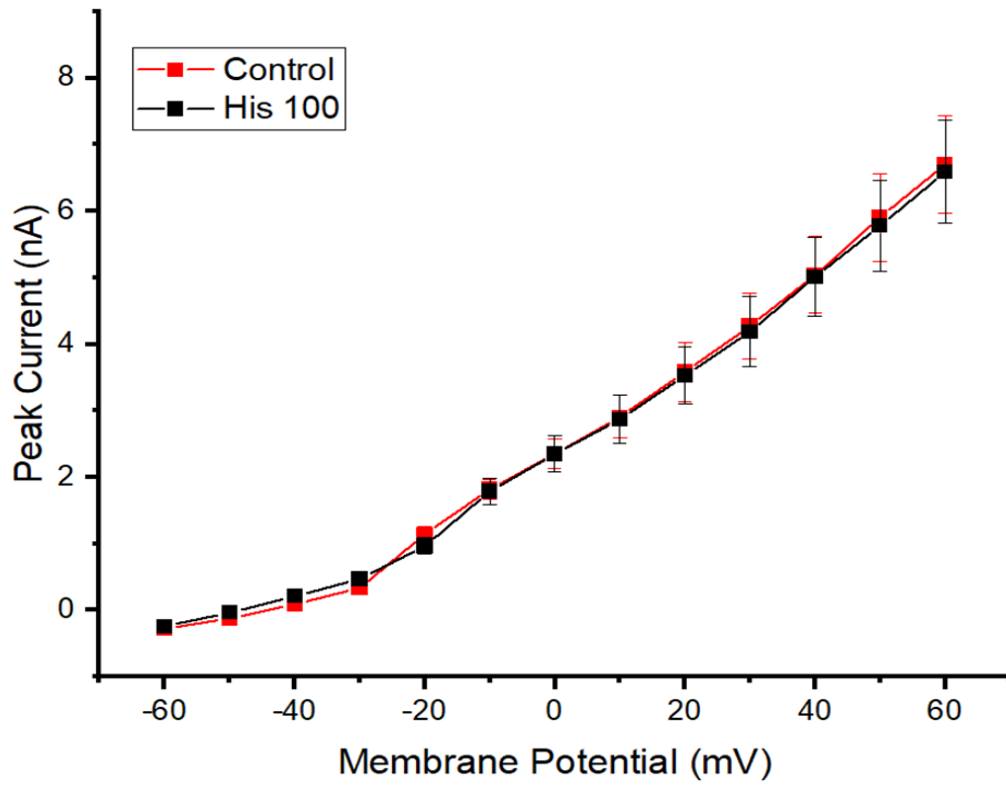


3. BULGULAR

3.1. Histaminin K^+ Tepe Akımı Kayıtları

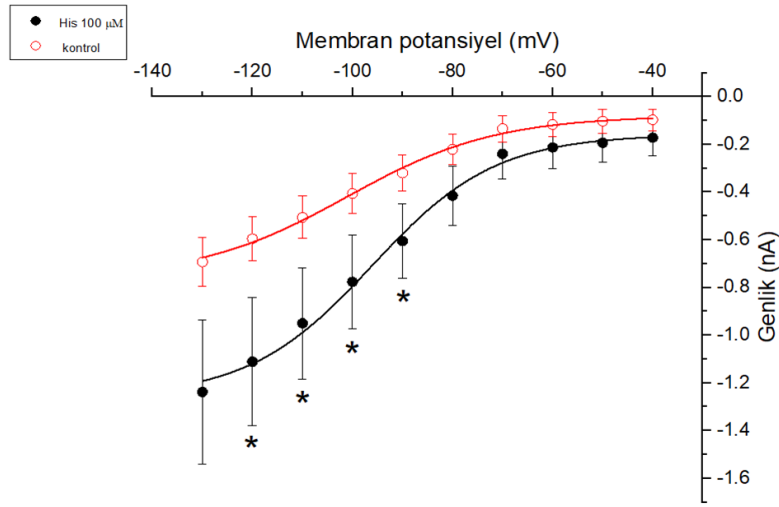
Histaminin K^+ Tepe Akımı üzerindeki etkisini tespit ettik;

Hücreler, gösterilen akımlara neden olmak için 10 mV'lık artışlarla -60 mV ila +60 mV arasında değişen potansiyelde değişikliklere maruz bırakılmıştır. Uygulanan konsantrasyonda histamin (100 μ M) ile akım sonuçlarında anlamlı bir değişiklik olmamıştır (Şekil 3.1)

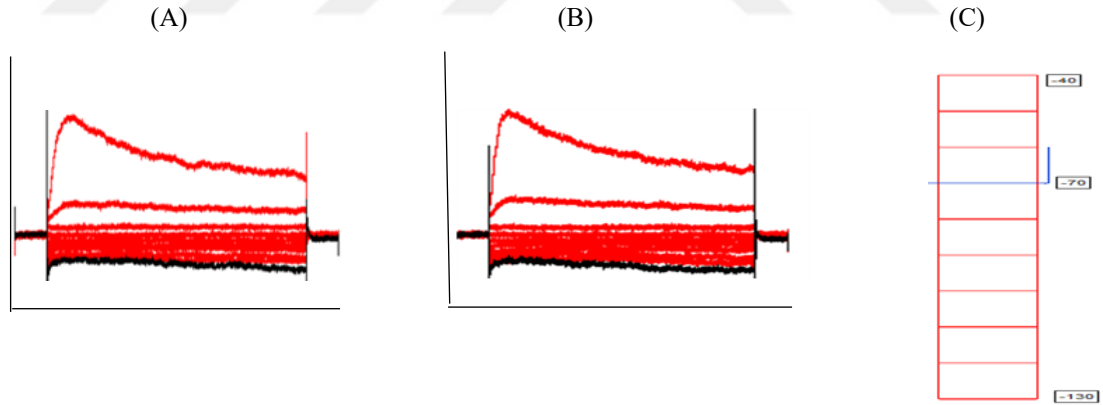


Şekil 3.1. DKG nöronlarına 100 μ M Histamin modülasyonu ile oluşan I-V ve K^+ tepe akımı eğrisi.

3.2. Histamin Voltaj-clamp Kayıtları



Şekil 3.2. 100 μ M histamin uygulamasının -40 ila -130 mV arasındaki hiperpolarize voltaj basamakları ve -70 mV'de tutma potansiyeli üzerindeki etkileri. Veriler OriginPro 2021 ve GraphPad Prism 8.0.2 ile analiz edilmiştir. * p, 0.05'ten küçük anlamına gelmektedir ve bu değerde olduğunda istatistik olarak anlamlı kabul edilmiştir (n= 8).



Şekil 3.3. HCN kanallarının incelenmesinde kullanılan protokol; Kayıtlar voltaj-clamp modunda gerçekleştirildi. Hücreler için -70 mV tutma potansiyeli kullanıldı, ardından -130'dan -40 mv'ye kadar 300 ms süreli depolarizasyon adımları uygulandı. Tüm hücre akımı kaydedildi ve analiz edildi. (A) Kontrol akım yoğunluk kayıtları, (B) 100 μ M histamin uygulamasının ardından akım yoğunluk kayıtları, (C) akım potansiyelini ortaya çıkarmak için yürütülen voltaj protokolü.

4. TARTIŞMA

Çalışmamızda, DKG'da HCN kanalları üzerinde histamin etkisi değerlendirilmiş, DKG nöronlarında çoğu iyon kanallarının spontan aktiviteye katkıda bulunduğuna dair açık kanıtlar olmasına rağmen bazı kanal ve uyaranların farklı etkiler gösterdiği görülmüştür.

DKG'lerdeki çalışmalara dayanarak, çeşitli uyaranların membran depolarizasyonunu etkileyen bir dizi iyon kanalı içerdiği bilinmektedir (Graham ve Callister, 2012, s. 594). Histaminin de DRG nöronlarında depolarizasyona ve aktivasyona neden olduğunu gösteren elektrofizyolojik kanıtlar vardır (Amanoa vd., 2001, s.201). DKG'da yer alan H1R, H3R ve H4R aracılığıyla histaminin kaşıntıya neden olduğu bilinmektedir (Kajihara vd., 2010, s. 292; Patel vd., 2011, s. 1; Rossbach ve Baumer, 2014, s. 12; Yu vd., 2004, s. 1051).

Histamin, hücre içinde elektrofizyolojik tepkiler üretmek için DKG nöronlarını in vitro olarak doğrudan aktive edebilir (Patel vd., 2011, s. 1). Araştırmalar, kültürlenmiş DKG nöronlarında histaminin, H1 reseptörünün aktivasyonu yoluyla histaminin Ca^{2+} arttırdığını göstermektedir (Han, Mancino, Simon, 2006, s. 694; Kim vd., 2004, s. 161; Wheeler vd., 2019, s. 1134).

DKG nöronlarının kaşıntı üreten pruritojenlere ve ağrı üreten algojenlere karşı örtüşen tepkileri vardır (Roberson vd., 2013, s. 2). Histamin gibi endojen ağrıya neden olan maddeler, dorsal kök ve ganglionda depolarizasyonlara neden olmaktadır (Abe vd., 1999, s. 340).

DKG nöronlarında, AP başlatılmasını ve iletilmesini, güçlenmesini, sodyum geçirgenliğini artırarak Na^{+} 'nın akson zarının içine akmasına ve depolarize olmasına izin veren VGSC'ler sağlamaktadır (Armstrong ve Hollingworth, 2021, s. 757; Ho ve O'Leary, 2011, s. 160; Salvatierra vd., 2018, s. 5434). DKG'lerde Nav1.7, Nav1.8 oranından daha yüksek olduğu bilinmektedir. Nav1.7'nin, insanlarda, periferik sinir sistemi yoluyla AP'nin başlatılmasında, iletilmesinde ve ağrı hissinde, Nav1.8'in de primer afferent nöronlarda, sinir yaralanması veya inflamasyondan sonra, ağrı aşırı duyarlılığında etkili oynadığı görülmüştür (Chang vd., 2018, s. 5; Yue vd., 2014, s. 889; Zhang vd., 2019, s. 2). VGSC ve HCN kanalları modülasyonu ile nöropatik ağrının aktive olduğu düşünülmektedir (Smith, 2020, s. 1).

Bazı çalışmalarda, H1 reseptörlerinin histamin tarafından aktivasyonunun, histamine bağlı kaşıntıya katkıda bulunan DRG nöronlarındaki Protein kinaz C yoluyla

Nav1.7 kanallarını duyarlı hale getirdiğini göstermektedir. Bunun yanında, histamin, DRG nöronlarında TTX-S Na^+ akımlarının aktivasyon voltajını hiperpolarize membran potansiyellerini arttırmış, ama inaktivasyonunda etkisi olmadığı görülmüş, TTX-R Na^+ akımlarının da aktivasyonu veya inaktivasyonunda önemli bir etki göstermediği görülmüştür (Li vd., 2022, s. 702).

Sinir hasarı, DKG hücre gövdeleri de dahil periferik ve merkezi sinir sisteminin uzak bölgelerine yayılan aktiviteyi içermektedir (Zimmermann, 2001, s. 23). Nöropatik veya periferik sinir yaralanmasının ardından periferik sinir duyarlılığının ve ağrının başlangıcında ve devamında, anormal spontan aktiviteden kaynaklandığı ve bununda DKG ve sinir aksonlarından kaynaklandığı düşünülmektedir (Abdulla ve Smith, 2001, s. 644; Park vd., 2003, s. 256; Smith, 2020 s. 3). DKG nöronlarında yapılan bazı çalışmalar, ağrıda artan DKG duyarlılığının rolünü desteklemektedir. Ayrıca HCN kanalları ayrıca sinir yaralanmasını takiben artan aktivite gösterir (Chaplan vd., 2003, s. 1169; Smith, 2020 s. 9). Bunun yanında periferik nöropatik ağrının kısmen DKG nöronlarının anormal aşırı uyarılabilirliğinden kaynaklandığı bilinmektedir. Bunun da HCN kanallarının ekspresyonu ve/veya işlevindeki değişiklikleri ile nöronun istirahat zar potansiyelinin yakınında aktif olan ve zar potansiyelini aksiyon potansiyeli üretim eşiğine doğru depolarize eden uyarıcı akım ile olabileceği düşünülmektedir (Smith vd., 2015, s. 90). HCN kanallarının ağrı sinyalizasyonundaki rolüyle uyumlu olarak, HCN blokerlerinin hem inflamatuvar hem de nöropatik ağrı modellerinde mekanik allodiniyi inhibe etmesi, bu kanalların ağrı modelinde etkinliğini düşündürmektedir (Matsuyoshi vd., 2006, s. 120; Waxman ve Zamponi, 2014, s. 160; Weng vd., 2012, s. 912).

Siyatik sinirin kronik daralması sonucu DKG voltaj kapılı potasyum kanalı α genlerinin aşağı regüle edildiği bulunmuştur (Park vd., 2003, s. 256). Aksotomize edilmiş DKG nöronlarında toplam K^+ akımının düştüğü bildirilmiştir ((Abdulla ve Smith, 2001, s. 655; Park vd., 2003, s. 258). K^+ kanallarının açılması ile hiperpolarizasyon veya membran potansiyelinin stabilizasyonu olduğu ve nöropatik ağrıyı indükleyen ektopik deşarjların oluşumunun engellediği görülmüştür (Zimmermann, 2001, s. 27). Duyusal nöronlardaki K^+ kanalı iletiminin, periferik sinir terminallerinde AP başlatmasını önleyerek, akson boyunca iletim doğruluğunu azaltarak veya merkezi terminallerde nörotransmitter salınımını sınırlayarak periferik uyarılabilirliği inhibe ettiği varsayılır. Kronik ağrı durumlarında K^+ kanalları, DKG gelişen spontan aktiviteyi engelleyebilmektedir. K^+ kanalların açılmasının, içeri doğru iyon iletkenliğine karşı

koyan ve dolayısıyla nöronal uyarılabilirliği sınırlayan plazma zarı boyunca hiperpolarize edici bir K^+ akışını kolaylaştırdığı görülmüştür (Tsantoulas ve McMahon, 2014, s. 147). Bazı ağrı modellerinde ve diyabetik nöropatik ağrı modelinde, K^+ akımlarının aşağı regüle olduğu görülmüştür. Tüm bunlardan dolayı, ağrıya terapötik bir müdahale olarak voltaj kapılı potasyum kanal açıcıların kullanılması potansiyel hedef olarak düşünülmektedir (Kuo vd., 2017, s. 4403; Waxman ve Zamponi, 2014, s. 157).

Yapılan çalışmalarda, nöropatik ağrı ile bağlantılı mekanizmaların düzenlenmesinde histamin reseptörleri aracılığıyla hareket eden histaminin önemini vurgulamaktadır. Kalıcı nöropatik ağrıda DKG'nın aktif rolü tespit edilmiş ve analjezik etkileri ve metabolik stabiliteleri açısından, nöropatik ağrının tedavisi için histamin reseptör antagonistlerinin kullanımı önerilmiştir (Obara vd., 2020, s. 594)

Medial vestibular çekirdek nöronlarında tüm-hücre patch clamp tekniği ile, histamin reseptörlerinin aktivasyonu ile indüklenen HCN kanal ilişkili eksitabilite artışı rapor edilmiştir (Zhang vd., 2013, s. 156). Serebellar çekirdeklerde histamin reseptörleri ile eşleşmiş HCN kanalları aracılı aktivasyonu gösteren veriler de literature sunulmuştur (Zhang vd., 2016, s. 1399). Histaminin lateral vestibüler çekirdeğin nöronal uyarılabilirliğini ve duyarlılığını arttırdığı ve H_2 reseptörüne bağlı HCN kanalı aktivasyonu yoluyla motor davranışları teşvik ettiği öne sürülmüştür (Li vd., 2017, s. 11). Literatürdeki bu bulgular, histamin reseptörü H_2 ile HCN kanalları arasında aktivasyon ile ilgili pozitif bir korelasyon olduğunu gösterir niteliktedir (Yu vd., 2016, s. 185).

DRG nöronları ile HCN kanalları arasındaki ilişkide ise, HCN aktivitesinde azalmanın ağrı iletiminde azalma ile sonuçlandığına dair raporlar bulunmaktadır.

Membran potansiyelinin hiperpolarizasyonu HCN kanallarını aktive etmektedir. Bu çalışmada uygulanan protokol ile HCN kanallarının aktive edildiği voltaj değerlerinde histamin etkisi incelenmiş ve akımlarda azalmaya neden olduğu bulunmuştur. HCN kanalları ağrı tedavisinde terapötik hedef olarak gösterilmektedir. Sinir hasarını takiben DKG nöronlarında HCN kanallarının upregüle olduğu ve kronik ağrıya karşı HCN bloker stratejisi ile nöropatik ağrının tersine çevrildiği bildirilmiştir. Bu kanalların inhibisyonu, ağrı iletiminde azalmaya yönelik sonuçlar ortaya koymaktadır (Ramirez vd., 2018. s. 10; Wang vd., 2012, s. 523). HCN blokajının nöropatik ağrıda umut veren bir yaklaşım sağladığı belirtilmiştir (Tanguay, Callahan, D'Avanzo, 2019. s. 1). Nosisepsiyonda yer alan HCN kanal izoformlarına karşı seçiciliği olan küçük moleküllerin mevcudiyeti, kronik ağrıya karşı güvenli ve etkili bir stratejiyi temsil edebilir (Dini vd., 2018, s. 12).

Çalışmamızda da, histaminin DKG nöron hücrelerinde K^+ tepe akımı üzerine etkilerine bakılmış, 10 mV'lik artışlarla -60 mV ila +60 mV arasında değişen potansiyelde değişikliklere maruz bırakılmış, elde edilen akım sonuçlarında standart kontrol maddesine göre anlamlı bir değişiklik olmadığı tespit edilmiştir.

Ayrıca, tüm hücre akımı voltaj-clamp yöntemiyle kaydedildi, 100 μ M histamin uygulanarak -40 ila -130 mV arasındaki hiperpolarize voltaj basamakları ve -70 mV'de tutma potansiyeli üzerindeki etkileri incelenmiş ve analiz edilmiştir. Histaminin, hiperpolarize voltaj aralıklarında akımda azalma ve DKG nöronlarında bir uyarılabilirlik inhibisyonuna neden olduğu görülmüştür.



5. SONUÇ

Yaptığımız çalışmada histaminin K^+ tepe akımları üzerine etkisine bakılmış, elde ettiğimiz sonuçlara göre, histaminin DKG'larında HCN kanallarına patch-clamp yöntemiyle uygulamasına rağmen anlamlı bir etkisi olmamış, dışa yönelik akım sonuçlarını değiştirmemiş, etkisiz bulunmuştur. Histaminin DKG'larında diğer kanallarda etkili olmasına rağmen K^+ akımlarına herhangi bir etki yapmaması, kemirgen ve hDKG nöronları arasındaki fizyolojik, fonksiyonel ve yapısal farklılıklardan kaynaklanabileceği düşünülebilir. hDKG nöronlarının kemirgen çalışmalarında kullanılan doğrudan uygulanan kimyasal uyaranlara duyarlılığı konusunda da kanıtların yetersiz olması nedeniyle farklı çalışmalar yapılabilir.

Bunun yanında, tüm hücre akımı voltaj-clamp yöntemiyle histaminin HCN kanalları üzerine etkileri araştırılmış ve bu çalışmada göstermiş olduğumuz gibi, hiperpolarize voltaj aralıklarında akımda azalma görülmüştür. Bu sonuçta bize, DKG nöronlarında bir uyarılabilirlik inhibisyonuna işaret etmektedir. Histamin ilişkili ağrı iletimine tedavi edici yaklaşımlarda bu yolağın değerlendirilmesi söz konusu olabilir. Literatürde daha önce rapor edilmiş olan, HCN kanalları ve aktivite arasındaki pozitif ilişkinin bu çalışmada DKG nöronları üzerinde zıt yönde tespit edilmesi, ileri moleküler çalışmalar ile elde edilecek veriler ile tartışılacaktır. Hangi histamin reseptörünün süreçte rol aldığı belirlenmesi, n sayısının artırılması, patoloji varlığında oluşan değişimler gibi deneysel dizaynların da eklenmesi ile ileri çalışmalarda daha ayrıntılı ve kapsamlı verilerin sunulması planlanmaktadır.

Ayrıca, elde ettiğimiz verilerden hareketle, histaminin, patolojik durumlar söz konusu olmadığı durumlarda, periferik iletimin temel düzeylerinden biri olan DKG nöronları üzerinde herhangi bir etkiye sahip olmadığı veya daha az etkili olduğu düşünülebilir. Bunlardan dolayı, histamin ile çeşitli ağrı modellerinde (inflamatuvar, nöropatik, vs.) olan hayvan modellerinde, histaminin etkili olup olmayacağını belirlemek için daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır.

KAYNAKÇA

- Abdulla, F.A. and Smith, P.A. (2001). Axotomy- and autotomy-induced changes in Ca^{2+} and K^{+} channel currents of rat dorsal root ganglion neurons. *Journal of Neurophysiol*, 85 (2), 644-58.
- Abe, M., Yoshioka, K., Shinomiya, K., Nakai, O. (1999). Drug Sensitivities of the Primary Afferents and Their Changes After Inflammation. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 369, 340-348.
- Akiyama, T., Tominaga, M., Davoodi, A., Nagamine, M., Blansit, K., Horwitz, A., Carstens, M.I., Carstens, E. (2012). Cross-sensitization of histamine-independent itch in mouse primary sensory neurons. *Neuroscience*, 13 (226), 305-312.
- Alexander, S.P., Mathie, A., Peters, J.A., Veale, E.L., Striessnig, J., Kelly, E., Armstrong, J.F., Faccenda, E., Harding, S.D., Pawson, A.J., Southan, C., Davies, J.A., Aldrich, R.W., Attali, B., Baggetta, A.M., Becirovic, E., Biel, M., Bill, R.M., Catterall, W.A., Conner, A.C., Davies, P., Delling, M., Virgilio, F.D., Falzoni, S., Fenske, S., George, C., Goldstein, S.A.N., Grissmer, S., Ha, K., Hammelmann, V., Hanukoglu, I., Jarvis, M., Jensen, A.A., Kaczmarek, L.K., Kellenberger, S., Kennedy, C., King, B., Kitchen, P., Lynch, J.W., Perez-Reyes, E., Plant, L.D., Rash, L., Ren, D., Salman, M.M., Sivilotti, L.G., Smart, T.G., Snutch, T.P., Tian, J., Trimmer, J.S., Van den Eynde, C., Vriens, J., Wei, A.D., Winn, B.T., Wulff, H., Xu, H., Yue, L., Zhang, X., Zhu, M. (2021). The Concise Guide to Pharmacology 2021/22: Ion channels. *British Journal of Pharmacology*, 178 (Suppl 1), 157-245.
- Altomare, C., Terragni, B., Brioschi, C., Milanesi, R., Pagliuca, C., Viscomi, C., Moroni, A., Baruscotti, M., DiFrancesco, D. (2003). Heteromeric HCN1-HCN4 channels: a comparison with native pacemaker channels from the rabbit sinoatrial node. *Journal of Physiology*, 549 (2), 347-59.
- Amano, R., Hirumab, H., Nishidab, S., Kawakamib, T., Shimizu, K. (2001). Inhibitory effect of histamine on axonal transport in cultured mouse dorsal root ganglion neurons. *Neuroscience Research*, 41 (2), 201-206.
- Andrew, D. and Craig, A.D. (2001). Spinothalamic lamina I neurons selectively sensitive to histamine: A central neural pathway for itch. *nature neuroscience*, 4 (1), 72-77.
- Armstrong, C.M. and Hollingworth, S. (2021). Na^{+} and K^{+} channels: history and structure. *Biophysical Journal*, 120 (5), 756-763.

- Ashwell, K. W. S. and Waite, P. M. E. (2012). Development of the Peripheral Nervous System. [J. K. Mai and G. Paxinos (Eds.)], *The Human Nervous System-Third Edition* (s. 14-30). London: Elsevier.
- Atherton, J.F., Kitano, K., Baufreton, J., Fan, K., Wokosin, D., Tkatch, T., Shigemoto, R., Surmeier, D.J., Bevan, M.D. (2010). Selective participation of somatodendritic HCN channels in inhibitory but not excitatory synaptic integration in neurons of the subthalamic nucleus. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 30 (47), 16025-16040.
- Bachert, C. (2002). The role of histamine in allergic disease: re-appraisal of its inflammatory potential. *Allergy*, 57 (4), 287-96.
- Bagal, S.K., Brown, A.D., Cox, P.J., Omoto, K., Owen, R.M., Pryde, D.C., Sidders, B., Skerratt, S.E., Stevens, E.B., Storer, R.I., Swain, N.A. (2013). Ion channels as therapeutic targets: a drug discovery perspective. *Journal of Medicinal Chemistry*, 56 (3), 593-624.
- Bartholeyns, J. and Bouclier, M. (1984). Involvement of histamine in growth of mouse and rat tumors: antitumoral properties of monofluoromethylhistidine, an enzyme-activated irreversible inhibitor of histidine decarboxylase. *Cancer Res.*, 44 (2), 639-45.
- Baruscotti, M., Bottelli, G., Milanesi, R., DiFrancesco, J.C., DiFrancesco, D. (2010). HCN-related channelopathies. *Pflugers Arch.*, 460 (2), 405-15.
- Benarroch, E.E. (2013). HCN channels: function and clinical implications. *Neurology*, 80 (3), 304-10.
- Bennett, D.L., Clark, A.J., Huang, J., Waxman, S.G., Dib-Hajj, S.D. (2019). The Role of Voltage-Gated Sodium Channels in Pain Signaling. *Physiol Rev.*, 99 (2), 1079-1151.
- Berridge, M.J. (1997). Elementary and global aspects of calcium signalling. *Journal of Physiology*, 499 (2), 291-306.
- Biel, M., Wahl-Schott, C., Michalakis, S., Zong, X. (2009). Hyperpolarization-activated cation channels: from genes to function. *Physiol Rev.*, 89 (3), 847-85.
- Cannon, K.E., Chazot, P.L., Hann, V., Shenton, F., Hough, L.B., Rice, F.L. (2007). Immunohistochemical Localization of Histamine H3 Receptors in Rodent Skin, Dorsal Root Ganglia, Superior Cervical Ganglia and Spinal Cord: Potential Antinociceptive Targets. *Pain*, 129 (1-2), 76-92.

- Catterall, W.A. (1992). Cellular and molecular biology of voltage-gated sodium channels. *Physiological Reviews*, 72 (4), 15-48.
- Chang, W., Berta, T., Kim, Y.H., Lee, S., Lee, S.Y., Ji, R.R. (2018). Expression and Role of Voltage-Gated Sodium Channels in Human Dorsal Root Ganglion Neurons with Special Focus on Nav1.7, Species Differences, and Regulation by Paclitaxel. *Neurosci. Bull.*, 34 (1), 4-12.
- Chaplan, S.R., Guo, H.Q., Lee, D.H., Luo, L., Liu, C., Kuei, C., Velumian, A.A., Butler, M.P., Brown, S.M., Dubin, A.E. (2003). Neuronal hyperpolarization-activated pacemaker channels drive neuropathic pain. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 23 (4), 1169-1178.
- Davidson, S., Copits, B.A., Zhang, J., Page, G., Ghetti, A., Gereau, R.W. (2014). Human sensory neurons: Membrane properties and sensitization by inflammatory mediators. *Pain*, 155 (9), 1861-1870.
- DiFrancesco, D. (1999). Dual allosteric modulation of pacemaker (f) channels by cAMP and voltage in rabbit SA node. *The Journal of physiology*, 515 (2), 367-376.
- DiFrancesco, J.C. and DiFrancesco, D. (2015). Dysfunctional HCN ion channels in neurological diseases. *Frontiers in cellular neuroscience*, 6 (174), 1-10.
- Dini, L., Del, Lungo, M., Resta, F., Melchiorre, M., Spinelli, V., Di Cesare Mannelli, L., Ghelardini, C., Laurino, A., Sartiani, L., Coppini, R., Mannaioni, G., Cerbai, E., Romanelli, M.N. (2018). Selective Blockade of HCN1/HCN2 Channels as a Potential Pharmacological Strategy Against Pain. *Front Pharmacol.*, 9 (1252), 1-14.
- Djoughri, L., Newton, R., Levinson, S.R., Berry, C.M., Carruthers, B., Lawson, S.N. (2003). Sensory and electrophysiological properties of guinea-pig sensory neurones expressing Nav 1.7 (PN1) Na⁺ channel alpha subunit protein. *J. Physiol.*, 546 (2), 565-76.
- Djoughri, L., Zeidan, A., Abd El-Aleem, S.A. (2020). Changes in expression of Kv7.5 and Kv7.2 channels in dorsal root ganglion neurons in the streptozotocin rat model of painful diabetic neuropathy. *Neuroscience Letters*, 736 (135277), 1-9.
- Doran, C., Chetrit, J., Holley, M.C., Grundy, D., Nassar, M.A. (2015). Mouse DRG Cell Line with Properties of Nociceptors. *PLoS One*, 10 (6), 1-15.

- Dunford, P.J., Williams, K.N., Desai, P.J., Karlsson, L., McQueen, D., Thurmond, R.L. (2007). Histamine H4 receptor antagonists are superior to traditional antihistamines in the attenuation of experimental pruritus. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 119 (1), 176-183.
- Düzgün Ergün, D. ve Dursun, Ş. (2018). Patch-Clamp Yönteminin Biyofiziksel Prensipleri ve Tıpta Kullanımı. *Tıp Fakültesi Klinikleri*, 1 (1), 93-108.
- Ennaceur, A., Abuhamdah, R., Lethbridge, N., Chazot, P., Van Rensburg, R. (2012). Effects of methimipip and JNJ-5207852 in Wistar rats exposed to an open-field with and without object and in Balb/c mice exposed to a radial-arm maze. *Frontiers in Systems Neuroscience*, 6 (54), 59-64.
- Feirabend, H. K. P. and Marani, E. (2003). Dorsal Root Ganglion. [M. J. Aminoff and R. B. Daroff (Eds.)], *Encyclopedia of the Neurological Sciences*, (s. 28-33). New York: Academic Press.
- Felten, D. L., O'Banion, M. K., Maida M. S. (2016). Spinal Cord. [D. L. Felten, M. K. O'Banion and M. S. Maida (Eds.)], *Netter's Atlas of Neuroscience (Third Edition)*, (s. 77-83). Philadelphia: Elsevier.
- Fjell, J., Cummins, T.R., Dib-Hajj, S.D., Fried, K., Black, J.A., Waxman, S.G. (1999). Differential role of GDNF and NGF in the maintenance of two TTX-resistant sodium channels in adult DRG neurons. *Brain Res Mol Brain Res.*, 67 (2). 267-82.
- Ganchingco, J.R.C., Fukuyama, T., Yoder, J.A., Bäumer, W. (2019). Calcium imaging of primary canine sensory neurons: Small-diameter neurons responsive to pruritogens and algogens. *Brain Behavior*, 9 (12), 1-9.
- Gao, L., McMullan, S., Djouhri, L., Acosta, C., Harper, A., Lawson, S. (2012). Expression and properties of hyperpolarization-activated current in rat dorsal root ganglion neurons with known sensory function. *The Journal of Physiology*, 590 (19), 4691-4705.
- Graham, B. and Callister, R. (2012). Pain. [C. Watson, G. Paxinos and L. Puelles (Eds.)], *The Mouse Nervous System* (s. 589-606). London: Elsevier.
- Green, W.N., Millar, N.S. (1995). Ion-channel assembly. *Trends in Neurosciences*, 18 (6), 280-7.
- Green, W.N. (1999). Ion channel assembly: creating structures that function. *The Journal of general physiology*, 113 (2), 163-170.

- Green, D. and Dong, X. (2016). The cell biology of acute itch. *The Journal of Cell Biology*, 213 (2), 155-61.
- Greenstein, B. and Greenstein, A. (2000). Meninges and Tracts. *Color atlas of neuroscience: neuroanatomy and neurophysiology*, (s. 2-3). Stuttgart-New York: Thieme
- Gong, K., Ohara, P.T. and Jasmin, L. (2016). Patch-Clamp Recordings on Intact Dorsal Root Ganglia from Adult Rats. *Journal of Visualized Experiments*, 115 (54287), 1-7.
- Grundmann, S. and Ständer, S. (2011). Chronic pruritus: clinics and treatment. *Ann Dermatol.*, 23 (1), 1-11.
- Han, S.K., Mancino, V. and Simon, M.I. (2006). Phospholipase C β 3 mediates the scratching response activated by the histamine H1 receptor on C-fiber nociceptive neurons. *Neuron*, 52(4), 691-703.
- Happola, O., Ahonen, M. and Panula, P. (1991). Distribution of histamine in the developing peripheral nervous system. *Agents and Action*, 33 (1-2), 112-115.
- Heron, A., Rouleau, A., Cochois, V., Pillot, C., Schwartz, J.C., Arrang, J. (2001). Expression analysis of the histamine H3 receptor in developing rat tissues. *Mechanisms of development*, 105 (1-2), 167-173.
- Herrmann, S., Schnorr, S. and Ludwig, A. (2015). HCN channels--modulators of cardiac and neuronal excitability. *International journal of molecular sciences*, 16 (1), 1429-1447.
- Hille, B. (1978). Ionic channels in excitable membranes. Current problems and biophysical approaches. *Biophysical journal*, 22 (2), 283-294.
- Ho, C. and O'Leary, M.E. (2011). Single-cell analysis of sodium channel expression in dorsal root ganglion neurons. *Mol Cell Neurosci.*, 46 (1), 159-66.
- Jang, Y., Lee, W.J., Hong, G.S., Shim, W.S. (2015). Red ginseng extract blocks histamine-dependent itch by inhibition of H1R/TRPV1 pathway in sensory neurons. *Journal of ginseng research*, 39 (3), 257-264.
- Jian, T., Yang, N., Yang, Y., Zhu, C., Yuan, X., Yu, G., Wang, C., Wang, Z., Shi, H., Tang, M., He, Q., Lan, L., Wu, G., Tang, Z. (2016). TRPV1 and PLC Participate in Histamine H4 Receptor-Induced Itch. *Neural Plasticity*, 2016 (1682972), 1-9.

- Imamachi, N., Park, G.H., Lee, H., Anderson, D.J., Simon, M.I., Basbaum, A.I., Han, S.K. (2009). TRPV1-expressing primary afferents generate behavioral responses to pruritogens via multiple mechanisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106 (27), 11330-11335.
- Inase, N., Schreck, R.E. and Lazarus, S.C. (1993). Heparin inhibits histamine release from canine mast cells. *Am J Physiol.*, 264 (4), 387-390.
- Kajihara, Y., Murakami, M., Imagawa, T., Otsuguro, K., Ito, S., Ohta, T. (2010). Histamine potentiates acid-induced responses mediating transient receptor potential V1 in mouse primary sensory neurons. *Neuroscience*, 166 (1), 292-304.
- Kahlson, G., Rosengren, E. and White, T. (1960). The formation of histamine in the rat foetus. *J. Physiol.*, 151 (1), 131-138.
- Kase, D. and Imoto, K. (2012). The Role of HCN Channels on Membrane Excitability in the Nervous System. *Journal of signal transduction*, 2012 (619747), 1-11.
- Kiernan, J.A. and Rajakumar, N. (2014). *Barr's the human nervous system*. (Tenth edition). China: Lippincott Williams & Wilkins, a Wolters Kluwer.
- Kim, Y.S., Shin, Y.K., Lee, C., Song, J. (2000). Block of sodium currents in rat dorsal root ganglion neurons by diphenhydramine. *Brain Res.*, 881 (2), 190-8.
- Kim, B.M., Lee, S.H., Shim, W.S., Oh, U. (2004). Histamine-induced Ca(2+) influx via the PLA(2)/lipoygenase/TRPV1 pathway in rat sensory neurons. *Neuroscience Letters*, 361 (1-3), 159-162.
- Kitano, Y., Wakimoto, S., Tamura, S., Kubota, K., Domon, Y., Arakawa, N., Saito, M., Sava, B. (2018). Buisson B. Effects of mirogabalin, a novel ligand for the $\alpha_2\delta$ subunit of voltage-gated calcium channels, on N-type calcium channel currents of rat dorsal root ganglion culture neurons. *Pharmazie*, 74 (3), 147-149.
- Kittaka, H. and Tominaga, M. (2017). The molecular and cellular mechanisms of itch and the involvement of TRP channels in the peripheral sensory nervous system and skin. *Allergology International*, 66 (1), 22-30.
- Kornreich, B.G. (2007). The patch-clamp technique: principles and technical considerations. *J Vet Cardiol.*, 9 (1), 25-37.
- Kuo, Y.L., Cheng, J.K., Hou, W.H., Chang, Y.C., Du, P.H., Jian, J.J., Rau, R.H., Yang, J.H., Lien, C.C., Tsaur, M.L. (2017). K⁺ Channel Modulatory Subunits KChIP and DPP Participate in Kv4-Mediated Mechanical Pain Control. *J Neurosci.*, 37 (16), 4391-4404.

- Kurachi, Y. and North, A. (2004). Ion channels: their structure, function and control – an overview. *The Journal of Physiology*, 554 (2), 245-7.
- Lee, K.Y. and Gold, M.S. (2012). Inflammatory mediators potentiate high affinity GABA(A) currents in rat dorsal root ganglion neurons. *Neurosci Lett.*, 518 (2), 128-32.
- Lee, C.H. and MacKinnon, R. (2017). Structures of the Human HCN1 Hyperpolarization-Activated Channel. *Cell*, 168 (1-2), 111-120.
- Lewis, T. (1926). The Blood Vessels of the Human Skin. *Br Med J.*, 2 (3418), 61-62.
- Li, B., Zhang, X.Y., Yang, A.H., Peng, X.C., Chen, Z.P., Zhou, J.Y., Chan, Y.S., Wang, J.J., Zhu, J.N. (2017). Histamine Increases Neuronal Excitability and Sensitivity of the Lateral Vestibular Nucleus and Promotes Motor Behaviors via HCN Channel Coupled to H2 Receptor. *Front Cell Neurosci.*, 10 (300), 1-13.
- Li, S., Ding, M., Wu, Y., Xue, S., Ji, Y., Zhang, P., Zhang, Z., Cao, Z., Zhang, F. (2022). Histamine Sensitization of the Voltage-Gated Sodium Channel Nav1.7 Contributes to Histaminergic Itch in Mice. *ACS Chem Neurosci.*, 13 (5), 700-710.
- Liu, Q., Tang, Z., Surdenikova, L., Kim, S., Patel, K.N., Kim, A., Ru, F., Guan, Y., Weng, H.J., Geng, Y., Undem, B.J., Kollarik, M., Chen, Z.F., Anderson, D.J., Dong, X. (2009). Sensory neuron-specific GPCR Mrgprs are itch receptors mediating chloroquine-induced pruritus. *Cell*, 139 (7), 1353-65.
- Ma, Y., Cai, Y., Wang, Z., Sun, M., Zhao, X. (2021). Visual Detection of Cells in Brain Tissue Slice for Patch-Clamp System. *Proceedings of 11th IEEE International Conference on CYBER Technology in Automation, Control, and Intelligent Systems*, July 27 - 31, 2021, Jiaxing, China, s. 521-526.
- Maffeo, C., Bhattacharya, S., Yoo, J., Wells, D., Aksimentiev, A. (2012). Modeling and simulation of ion channels. *Chemical reviews*, 112 (12), 6250-6284.
- Marani, E. and Lakke, E. A. J. F. (2012). Peripheral Nervous System Topics. [J. K. Mai and G. Paxinos (Eds.)], *The Human Nervous System-Third Edition* (s. 82-140). London: Elsevier.
- Matsuyoshi, H., Masuda, N., Chancellor, M.B., Erickson, V.L., Hirao, Y., De Groat, W.C., Wanaka, A., Yoshimura, N. (2006). Expression of hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated cation channels in rat dorsal root ganglion neurons innervating urinary bladder. *Brain Res.*, 1119 (1), 115-23.

- McCoy, E.S., Taylor-Blake, B., Zylka, M.J. (2012). CGRPa-Expressing Sensory Neurons Respond to Stimuli that Evoke Sensations of Pain and Itch. *PLoS ONE*, 7 (5), 1-11.
- Michael, G.J. and Priestley, J.V. (1999). Differential expression of the mRNA for the vanilloid receptor subtype 1 in cells of the adult rat dorsal root and nodose ganglia and its downregulation by axotomy. *The Journal of Neuroscience*, 19 (5), 1844-1854.
- Min, H., Lee, H., Lim, H., Jang, Y.H., Chung, S.J., Lee, C.J., Lee, S.J. (2014). TLR4 enhances histamine-mediated pruritus by potentiating TRPV1 activity. *Molecular Brain*, 7 (59), 1-10.
- Minett, P. and Ginesi, L. (2020). *Anatomy and Physiology*. (ISBN: 9781908625731). Banbury: Lantern Publishing.
- Mishra, S.K. and Hoon, M.A. (2013). The cells and circuitry for itch responses in mice. *Science*, 340 (6135), 968-971.
- Moiseenkova-Bell, V., Delemotte, L., Minor DL, Jr. (2021). Ion Channels: Intersection of Structure, Function, and Pharmacology. *Journal of Molecular Biology*, 433 (17), 1-3.
- Molliver, D.C., Wright, D.E., Leitner, M.L., Parsadanian, A.S., Doster, K., Wen, D., Yan, Q., Snider, W.D. (1997). IB4-binding DRG neurons switch from NGF to GDNF dependence in early postnatal life. *Neuron*, 19 (4), 849-61.
- Moran, Y., Barzilai, M.G., Liebeskind, B.J., Zakon, H.H. (2015). Evolution of voltage-gated ion channels at the emergence of Metazoa. *The Journal of Experimental Biology*, 218 (4), 515-25.
- Morrisset, S., Rouleau, A., Ligneau, X., Gbahou, F., Tardivel-Lacombe, J., Stark, H., Schunack, W., Ganellin, C.R., Schwartz, J.C., Arrang, J.M. (2000). High constitutive activity of native H3 receptors regulates histamine neurons in brain. *Nature*, 408 (6814), 860-864.
- North, R.Y., Li, Y., Ray, P., Rhines, L.D., Tatsui, C.E., Rao, G., Johansson, C.A., Zhang, H., Kim, Y.H., Zhang, B., Dussor, G., Kim, T.H., Price, T J., Dougherty, P.M. (2019). Electrophysiological and transcriptomic correlates of neuropathic pain in human dorsal root ganglion neurons. *Brain, A journal of Neurology*, 142 (5), 1215-1226.

- Notomi, T. and Shigemoto, R. (2004). Immunohistochemical localization of Ih channel subunits, HCN1-4, in the rat brain. *The Journal of Comparative Neurology*, 471 (3), 241-276.
- Obara, I., Telezhkin, V., Alrashdi, I., Chazot, P.L. (2020). Histamine, histamine receptors, and neuropathic pain relief. *Br J Pharmacol.*, 177 (3), 580-599.
- Oda, T., Morikawa, N., Saito, Y., Masuho, Y., Matsumoto, S. (2000). Molecular cloning and characterization of a novel type of histamine receptor preferentially expressed in leukocytes. *J Biol Chem.*, 275 (47), 36781-6.
- Ohkubo, T., Shibata, M., Inoue, M., Kaya, H., Takahashi, H. (1995). Regulation of substance P release mediated via prejunctional histamine H3 receptors. *European Journal of Pharmacology*, 273 (1-2), 83-8.
- Park, S.Y., Choi, J.Y., Kim, R.U., Lee, Y.S., Cho, H.J., Kim, D.S. (2003). Downregulation of voltage-gated potassium channel alpha gene expression by axotomy and neurotrophins in rat dorsal root ganglia. *Mol Cells*, 16 (2), 256-259.
- Parker, T., Huang, Y., Raghu, A., FitzGerald, J.J., Green, A.L., Aziz, T.Z. (2020). Dorsal Root Ganglion Stimulation Modulates Cortical Gamma Activity in the Cognitive Dimension of Chronic Pain. *Brain sciences*, 10 (2), 1-13.
- Passani, M.B., Panula, P. and Lin, J.S. (2014), Histamine in the Brain, *Frontiers in Ssystems Neuroscience*, 8 (64), 4-5.
- Patel, K.N., Liu, Q., Meeker, S., Undem, B.J., Dong, X. (2011). Pirt, a TRPV1 Modulator, Is Required for Histamine-Dependent and -Independent Itch. *PLoS ONE*, 6 (5), 1-8.
- Paus, R., Schmelz, M., Bíró, T., Steinhoff, M. (2006). Frontiers in pruritus research: scratching the brain for more effective itch therapy. *The Journal of clinical investigation*, 116 (5), 1174-1186.
- Petersen, C.C.H. (2017). Whole-Cell Recording of Neuronal Membrane Potential during Behavior. *Neuron*, 95(6), 1266-1281.
- Ramirez, D., Zuniga, R., Concha, G., Zuniga, L. (2018). HCN Channels: New Therapeutic Targets for Pain Treatment. *Molecules*. 23 (9), 1-18.
- Reinhold, A.K. and Rittner, H.L. (2020). Characteristics of the nerve barrier and the blood dorsal root ganglion barrier in health and disease. *Experimental Neurology*, 327 (113244), 1-7.

- Reiß, P. and Koert, U. (2013). Ion-channels: goals for function-oriented synthesis. *Accounts of Chemical Research*, 46 (12), 2773-2780.
- Renganathan, M., Cummins, T.R. and Waxman, S.G. (2001). Contribution of Na(v)1.8 sodium channels to action potential electrogenesis in DRG neurons. *J Neurophysiol.*, 86 (2), 629-640.
- Restrepo-Angulo, I., De Vizcaya-Ruiz, A. and Camacho, J. (2010). Ion channels in toxicology. *Journal of Applied Toxicology*, 30 (6), 497-512.
- Rizzo, M.A., Kocsis, J.D. and Waxman, S.G. (1994). Slow sodium conductances of dorsal root ganglion neurons: intraneuronal homogeneity and interneuronal heterogeneity. *J Neurophysiol.*, 72 (6), 2796-2815.
- Roberson, D.P., Gudes, S., Sprague, J.M., Patoski, H.A., Robson, V.K., Blasl, F., Duan, B., Oh, S.B., Bean, B.P., Ma, Q. (2013). Activity-dependent silencing reveals functionally distinct itch-generating sensory neurons. *Nat Neurosci.*, 16 (7), 910-918.
- Rogers, K., (2011). *The brain and the nervous system*. New York: Britannica Educational Publishing.
- Rowley, D.A. and Benditt, E.P. (1956). 5-Hydroxytryptamine and histamine as mediators of the vascular injury produced by agents which damage mast cells in rats. *The Journal of experimental medicine*, 103 (4), 399-412.
- Rosbach, K. and Baumer, W. (2014). PCR detects bands consistent with the expression of receptors associated with pruritus in canine dorsal root ganglia. *Veterinary Dermatology*, 25 (1), 9-e4.
- Rotordam, M.G., Obergrussberger, A., Brinkwirth, N., Takasuna, K., Becker, N., Horvath, A., Goetze, T.A., Rapedius, M., Furukawa, H., Hasegawa, Y., Oka, T., Fertig, N., Stoelzle-Feix, S. (2021). Reliable identification of cardiac conduction abnormalities in drug discovery using automated patch-clamp II: Best practices for Nav1.5 peak current in a high throughput screening environment. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods.*, 112 (107125), 1-13.
- Salvatierra, J., Diaz-Bustamante, M., Meixiong, J., Tierney, E., Dong, X., Bosmans, F. (2018). A disease mutation reveals a role for Nav1.9 in acute itch. *J Clin Invest.*, 128 (12), 5434-5447.

- Santoro, B., Grant, S.G., Bartsch, D., Kandel, E.R. (1997). Interactive cloning with the SH3 domain of N-src identifies a new brain specific ion channel protein, with homology to eag and cyclic nucleotide-gated channels. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 94 (26), 14815-20.
- Sengul, G. and Watson, C. (2012a). Spinal Cord: Regional Anatomy, Cytoarchitecture and Chemoarchitecture. [J. K. Mai and G. Paxinos (Eds.)], *The Human Nervous System-Third Edition* (s. 186-232). London: Elsevier.
- Sengul, G. and Watson, C. (2012b). Spinal Cord. [C. Watson, G. Paxinos and L. Puelles (Eds.)], *The Mouse Nervous System* (s. 424-458). London: Elsevier.
- Shelley, W.B. and Melton, F.M. (1950). Relative effect of local anesthetics on experimental histamine pruritus in man. *The Journal of investigative dermatology*, 15 (4), 299-300.
- Shibuya, K., Funaki, Y., Hiraoka, K., Yoshikawa, T., Naganuma, F., Miyake, M., Watanuki, S., Sato, H., Manabu Tashiro, M., Yanai, K. (2012). Doxepin binding to histamine H1 receptors in living human brain: reproducibility during attentive waking and circadian rhythm, *Frontiers in Systems Neuroscience*, 6 (45), 22-28.
- Shim, W.S., Tak, M.H., Lee, M.H., Kim, M., Kim, M., Koo, J.Y., Lee, C.H., Kim, M., Oh, U. (2007). TRPV1 mediates histamine-induced itching via the activation of phospholipase A2 and 12-lipoxygenase. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 27 (9), 2331-2337.
- Shim, W.S. and Oh, U. (2008). Histamine-induced itch and its relationship with pain. *Molecular pain*, 4 (29), 1-6.
- Sigg, D. (2014). Modeling ion channels: past, present, and future. *The Journal of General Physiology*, 144 (1), 7-26.
- Smith, T., Al Otaibi, M., Sathish, J., Djouhri, L. (2015). Increased expression of HCN2 channel protein in L4 dorsal root ganglion neurons following axotomy of L5- and inflammation of L4-spinal nerves in rats. *Neuroscience*, 295 (2015), 90-102.
- Smith, P.A. (2020). K⁺ Channels in Primary Afferents and Their Role in Nerve Injury-Induced Pain. *Front Cell Neurosci.*, 14 (566418), 1-30.
- Strasser, A., Wittmann, H.J., Buschauer, A., Schneider, E.H., Seifert, R. (2013). Species-dependent activities of G-protein-coupled receptor ligands: lessons from histamine receptor orthologs. *Trends Pharmacol Sci.*, 34 (1), 13-32.

- Sun, Y.G. and Chen, Z.F. (2007). A gastrin-releasing peptide receptor mediates the itch sensation in the spinal cord. *Nature*, 448 (7154), 700-3.
- Tanguay, J., Callahan, K.M. and D'Avanzo, N. (2019). Characterization of drug binding within the HCN1 channel pore. *Scientific Reports*, 9 (465), 1-14.
- Tata, A.M., Vilaro, M.T. and Mengod, G. (2000). Muscarinic receptor subtypes expression in rat and chick dorsal root ganglia. *Molecular Brain Research*, 82 (1-2), 1-10.
- Tsantoulas, C. and McMahon, S.B. (2014). Opening paths to novel analgesics: the role of potassium channels in chronic pain. *Trends Neurosci.*, 37 (3), 146-58.
- Tomaszewski, A. and Büsselberg, D. (2006). Cisplatin modulates voltage gated channel currents of dorsal root ganglion neurons of rats. *NeuroToxicology*, 28 (1), 49-58.
- Tomaszewski, A. and Büsselberg, D. (2008). SnCl(2) reduces voltage-activated calcium channel currents of dorsal root ganglion neurons of rats. *Neurotoxicology*, 29 (6), 958-63.
- Vaccari, T., Moroni, A., Rocchi, M., Gorza, L., Bianchi, M.E., Beltrame, M., DiFrancesco, D. (1999). The human gene coding for HCN2, a pacemaker channel of the heart. *Biochimica et Biophysica Acta.*, 1446 (3), 419-25.
- Vlachova, V., Lyfenko, A., Orkand, R.K., Vyklicky, L. (2001). The effects of capsaicin and acidity on currents generated by noxious heat in cultured neonatal rat dorsal root ganglion neurones. *Journal of Physiology*, 533 (3), 717-28.
- Vohora, D. and Bhowmik, M. (2012). Histamine H3 receptor antagonists/inverse agonists on cognitive and motor processes: relevance to Alzheimer's disease, ADHD, schizophrenia, and drug abuse. *Frontiers in Systems Neuroscience*, 6 (72), 65-74.
- Wang, Y.P., Sun, B.Y., Li, Q., Dong, L., Zhang, G.H., Grundy, D., Rong, W.F. (2012). Hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated cation channel subtypes differentially modulate the excitability of murine small intestinal afferents. *World J Gastroenterol.*, 18 (6), 522-31.
- Wang, L. and Yule, D.I. (2018). Differential regulation of ion channels function by proteolysis. *Biochimica et biophysica acta. Molecular cell research*, 1865 (11 Pt B), 1698-1706.
- Wang, T., Tao, J., Fang, Y., Ma, C. (2021). The role of pruriceptors in enhancing sensitivity to pruritogens in a murine chronic compression model of dorsal root ganglion. *Mol Brain*, 14 (1), 1-9.

- Watanabe, T., Taguchi, Y., Maeyama, K., Wada, H. (1991). Formation of Histamine: Histidine Decarboxylase. B. Uvnas (Ed.), *Histamine and Histamine Antagonists* (s. 145-163). Berlin Heidelberg: Springer-Verlag.
- Waxman, S.G. and Zamponi, G.W. (2014). Regulating excitability of peripheral afferents: emerging ion channel targets. *Nat Neurosci.*, 17 (2), 153-63.
- Webb, A.A. (2003). Potential sources of neck and back pain in clinical conditions of dogs and cats: a review. *The Veterinary Journal.*, 165 (3), 193-213.
- Wells, B.G., DiPiro, J.T., Schwinghammer, T.L., DiPiro, C.V. (2015). *Pharmacotherapy Handbook*. (Ninth Edition). United States: McGraw-Hill Education.
- Weng, X., Smith, T., Sathish, J., Djouhri, L. (2012). Chronic inflammatory pain is associated with increased excitability and hyperpolarization-activated current (I_h) in C- but not A δ -nociceptors. *Pain*, 153 (4), 900-914.
- Westlund, K. N. and Willis, Jr. W. D. (2012). Pain System. [J. K. Mai and G. Paxinos (Eds.)], *The Human Nervous System-Third Edition* (s. 1144-1186). London: Elsevier.
- Wheeler, J.J., Lascelles, B.D., Olivry, T., Mishra, S.K. (2019). Itch-associated Neuropeptides and Their Receptor Expression in Dog Dorsal Root Ganglia and Spinal Cord. *Acta Dermato-Venereologica*, 99 (12), 1131-1135.
- Wickenden, A. (2002). K(+) channels as therapeutic drug targets. *Pharmacology & Therapeutics*, 94 (1-2), 157-82.
- Yu, X., Duan, K.L., Shang, C.F., Yu, H.G., Zhou, Z. (2004). Calcium influx through hyperpolarization-activated cation channels (I_h) channels) contributes to activity-evoked neuronal secretion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101 (4), 1051-1056.
- Yu, J., Fang, Q, Lou, G.D., Shou, W.T., Yue, J.X., Tang, Y.Y., Hou, W.W., Xu, T.L., Ohtsu, H., Zhang, S.H., Chen, Z. (2013). Histamine Modulation of Acute Nociception Involves Regulation of Nav1.8 in Primary Afferent Neurons in Mice. *CNS Neuroscience & Therapeutics.*, 19 (9), 649-658.
- Yu, L., Zhang, X.Y., Cao, S.L., Peng, S.Y., Ji, D.Y., Zhu, J.N., Wang, J.J. (2016). Na⁽⁺⁾-Ca⁽²⁺⁾ Exchanger, Leak K⁽⁺⁾ Channel and Hyperpolarization-Activated Cyclic Nucleotide-Gated Channel Mediate the Histamine-Induced Excitation on Rat Inferior Vestibular Nucleus Neurons. *CNS Neurosci Ther.*, 22 (3), 184-93.

- Yue, J.X., Wang, R.R., Yu, J., Tang, Y.Y., Hou, W.W., Lou, G.D., Zhang, S.H., Chen, Z. (2014). Histamine Upregulates Nav1.8 Expression in Primary Afferent Neurons via H2Receptors: Involvement in Neuropathic Pain. *CNS Neuroscience & Therapeutics*, 20 (10), 883-892.
- Zhang, J.M., Donnelly, D.F. and LaMotte, R.H. (1998). Patch-clamp recording from the intact dorsal root ganglion. *Journal of Neuroscience Methods*, 79 (1), 97-103.
- Zhang, X.Y., Yu, L., Zhuang, Q.X., Peng, S.Y., Zhu, J.N., Wang, J.J. (2013). Postsynaptic mechanisms underlying the excitatory action of histamine on medial vestibular nucleus neurons in rats. *Br J Pharmacol.*, 170 (1), 156-69.
- Zhang, J., Zhuang, Q.X., Li, B., Wu, G.Y., Yung, W.H., Zhu, J.N., Wang, J.J. (2016). Selective Modulation of Histaminergic Inputs on Projection Neurons of Cerebellum Rapidly Promotes Motor Coordination via HCN Channels. *Mol Neurobiol.*, 53 (2), 1386-1401.
- Zhang, X., Priest, B.T., Belfer, I., Gold, M.S. (2017). Voltage-gated Na⁺ currents in human dorsal root ganglion neurons. *eLife*, 6 (e23235), 1-23.
- Zhang, F., Wu, Y., Xue, S., Wang, S., Zhang, C., Cao, Z. (2019). 3'-O-Methylorobol Inhibits the Voltage-Gated Sodium Channel Nav1.7 with Anti-Itch Efficacy in A Histamine-Dependent Itch Mouse Model. *International journal of molecular sciences*, 20 (23), 6058.
- Zimmermann, M. Pathobiology of neuropathic pain. *Eur J Pharmacol.*, 429 (1-3), 23-37.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Mehmet Hakan Akcan

Yabancı Dil : İngilizce

Doğum Yeri ve
Yılı

E-posta

Orcid No

Eğitim ve Mesleki Geçmişi:

- 2015, Türk Eczacılar Birliği Denetleme Kurulu, Başkan
- 2013, Türk Eczacılar Birliği Denetleme Kurulu, Üye
- 2011, Kütahya Eczacı Odası Denetleme Kurulu, Üye
- 1997, Kütahya Eczacı Odası Yönetim Kurulu, Üye
- 1993, Akcan Eczanesi, Eczacı (halen devam etmektedir)
- 1992, Ege Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi
- 1988, Tavşanlı Atatürk Lisesi
- 1982, Tavşanlı Arslanbey İlkokulu

Mesleki Birlik/ Dernek/ Kuruluş Üyelikleri:

- 1992, Türk Eczacılar Birliği, Ankara (halen devam etmektedir)
- 1992, 35. Bölge Kütahya Eczacı Odası, Kütahya (halen devam etmektedir)