

Sıçan Duyusal Sinir Hücresi Alt Tiplerinde Kalsiyum Sinyallerinin İncelenmesi: Kapsaisin Duyarlılığı, Nonspesifik Depolarizasyon ve Hücre Çapı Arasındaki İlişki

Investigation of the Calcium Signaling in Subpopulation of Rat Sensory Neurones: Relationships Between Capsaicin Sensitivity, Nonspecific Depolarisation and Cell Size

Dr. Mete ÖZCAN,^a
Dr. Ergül ALÇIN,^b
Dr. Kemal Tuğrul KUZGUN,^a
Dr. Haluk KELEŞTİMUR,^b
Dr. Ahmet AYAR^b

^aBiyofizik AD,
^bFizyoloji AD,
Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi,
Elazığ

Geliş Tarihi/Received: 15.12.2008
Kabul Tarihi/Accepted: 12.05.2009

Yazışma Adresi/Correspondence:
Dr. Ahmet AYAR
Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi,
Fizyoloji AD, Elazığ,
TÜRKİYE/TURKEY
aayar@firat.edu.tr

ÖZET Amaç: Hücre içi serbest Ca^{2+} konsantrasyonu ($[Ca^{2+}]_i$) aralarında uyarılabilmenin ve nörotansmitter salıverilmesinin de yer aldığı nöronal özellikleri etkiler. Bu çalışmanın amacı, akut izole dorsal kök gangliyon (DKG) nöronlarında kapsaisin duyarlılığı ile hücre çapı arasındaki ilişkiyi irdeleyerek, belli bir hücre çapı aralığındaki nöronların nosisepsiyonda rol oynayıp oynamadığını belirlemektir. **Gereç ve Yöntemler:** Depapitasyonu takiben çıkarılan dorsal kök gangliyonları enzimsel muamele ve mekanik izolasyonu takiben yüzeyi kaplanmış lamellere ekilerek sinir büyüme faktörü içeren kültür vasatında kısa süreliğine kültüre edildi. Hücre gövdesi boyutuna göre DKG nöronları küçük, orta ve büyük çaplı olmak üzere üç alt gruba ayrıldı. Kapsaisin (1 μ M) ve yüksek KCl^+ (30 mM) ile depolarizasyona cevaplar fura-2 ile yüklenmiş münferit nöronlarda $[Ca^{2+}]_i$ değişiklikleri mikroskopik dijital imaj analiz sistemi kullanılarak belirlendi. **Bulgular:** DKG nöronu alt tipleri arasında, kapsaisin ve KCl^+ 'ye $[Ca^{2+}]_i$ cevapları bakımından belirgin farklılıklar vardı. Küçük çaplı nöronlar kapsaisine en büyük $[Ca^{2+}]_i$ transienleri ile cevap verirken yüksek KCl cevapları bütün alt tiplerde benzer ölçekte gerçekleşti. **Sonuç:** Bu bulgular farklı boyutlardaki DKG nöronlarının fonksiyonel olarak da heterojen olduğunu göstermektedir. Küçük çaplı DKG nöronlarının belirgin olarak daha yüksek kapsaisin duyarlılığına sahip olmaları, bu nosiseptörlerin yeni analjezik ajanların geliştirilebilmesi için potansiyel bir "nosiseptif hücre model" olarak kullanılabilirliğini göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Kapsaisin; ağrı ölçümü; kalsiyum

ABSTRACT Objective: The concentration of free intracellular Ca^{2+} ($[Ca^{2+}]_i$) influences neuronal properties including regulation of excitability and neurotransmitter release. The aim of this study was to investigate relationships between capsaicin sensitivity and cell size in acutely isolated dorsal root ganglion (DRG) neurons, in order to ascertain whether a particular diameter range is involved in nociception. **Material and Methods:** Following decapitation, dorsal root ganglia were excised, enzymatically treated and plated on coated coverslips following mechanical isolation, and cultured in a tissue culture containing nerve growth factor for a short time. Based on the size of cell trunk, DRG neurons were divided into three categories: small, medium and large. Responses to capsaicin (1 μ M) and depolarization by high KCl^+ (30 mM) were studied by monitoring changes in $[Ca^{2+}]_i$ with a microscopic digital image analysis system in fura-2 loaded single neurons. **Results:** There were marked differences between subpopulations of neurons with respect to Ca^{2+} responses to the KCl and capsaicin, with the largest $[Ca^{2+}]_i$ transients in small-diameter neurons to capsaicin while all subtypes gave similar responses to KCl . **Conclusion:** These results suggest that different sized DRG neurons are also heterogeneous functionally. Significantly more capsaicin-sensitivity of small-diameter DRG neurons indicates that these nociceptors may serve potential "nociceptive cellular model" for the development of novel analgesics.

Key Words: Capsaicin; pain measurement; calcium

Ağrı, “gerçekleşen veya potansiyel doku hasarı veya tehdidi ile birlikte bulunan” çok önemli bir biyolojik sinyaldir. Günlük yaşamda yaygın olarak hissedilen hoş olmayan bu duyu ilave doku hasarının gerçekleşmesine karşı koruyucu rol oynayarak “fonksiyonel ve canlı kalma” bağlamında homeostazise katkıda bulunur.

Ağrı, somatik (kas iskelet), visseral (toraks, abdomen, pelvis), sinir ve sempatik kökenli ağrı gibi sınıflandırılabilirdiği gibi; nosiseptif (somatik ve visseral) ve nosiseptif olmayan (nöropatik ve semöpatik kökenli) ağrı olmak üzere çeşitli şekillerde sınıflandırılmaktadır. Ağrı oluşumunun primer mekanizması düşünüldüğünde, nosiseptif ve nöropatik ağrı olmak üzere iki ana gruba ayrılabilir ve psikojenik ağrı üçüncü tip olarak düşünülebilir.^{1,2}

Doku hasarı, beyine ağrı sinyallerinin gitmesini sağlayan sinyalleri başlatan kimyasal(ların) salıverilmesine yol açar. Bu sinyaller, nosiseptörler olarak adlandırılan ve medulla spinaliste dorsal boynuz nöronları ile sinaps yapan ince az miyelinli (A-delta) ve miyelinsiz (C) grubu liflerle elektriksel formda taşınırlar. Noksius (hoş olmayan, kötü) uyarılar, hücre gövdeleri dorsal kök gangliyonu (DKG), trigeminal gangliyon ve nodoz gangliyon-da yer alan primer duyuusal afferentlerle üst merkezlere iletilirler.^{1,3}

Dorsal kök gangliyonu duyuusal sinirlere ait hücre gövdelerini ihtiva eder. DKG hücrelerinin çoğu mekanik uyarıya cevap verir ve buna göre bu hücreler geniş bağlamda düşük eşikli mekanoseptörler ve yüksek eşikli nosiseptörler olarak iki ana gruba ayrılabilir. Mekanik uyarının bu nöronların reseptif uçlarında yer alan mekanosensitif iyon kanallarını direk olarak aktive ettiği sanılmaktadır. Bununla beraber, bu iyon kanallarının moleküler yapısı ve fizyolojik ve farmakolojik özellikleri de tam anlaşılammıştır.³

DKG nöronları hücre gövdelerinin çapına göre küçük, orta ve büyük çaplı olmak üzere üç alt sınıfa ayrılırlar. Genelde hücre gövde çapı < 30 µm olan DKG nöronları potansiyel nosiseptörler olarak değerlendirilirken, 30 µm'den büyük çaplı DKG nöronları da non-nosiseptif olarak kabul edilirler. Bu sınıflandırma A-delta ve C lifi afferentle-

rinde aksonal ileti hızı ile nöron çapı arasındaki pozitif ilişkiyi esas alan Harper ve Lawson'un⁴ bu konudaki öncül çalışmalarını esas almaktadır. Miyelinsiz C-lifleri (noksius bilgiyi iletirler) küçük çaplı hücre gövdesine sahip nöronlardan köken alırken, miyelinli A-alfa ve A-beta lifleri (düşük eşikli non-noksius bilgileri iletirler) büyük çaplı hücre gövdesine sahip nöronlardan köken alırlar. A-delta lifleri (nosiseptif olabilirler), orta ve küçük çaplı hücre gövdesine sahip nöronlardan köken alırlar.

Küçük çaplı DKG nöronlarının aksonları genelde miyelinsiz C-lifleri olup, nosiseptörlere ait olan bu C-lifleri de ağrı, kaşınma ve yanma duyu-larına ait bilgileri iletirler. A-alfa ve A-beta sinyalleri genelde proprioseptif sinyalleri taşırlar. Orta ve büyük çaptaki DKG hücreleri miyelinli aksonlara sahip olup düşük eşikli mekanoseptörlerden bilgi taşırlar.^{3,5}

Klinik araştırmalarda etik kısıtlamalar nedeniyle ağrı araştırmalarında deney hayvanı ve çeşitli hücre modeler kullanılarak araştırmalar gerçekleştirilmekte ve bu alanda klinik önemi olan bilgiler elde edilmektedir. DKG nöronları ağrı için “hücre model” olarak kabul edilmektedir.

Kalsiyum, nöronlarda transmitter salıverilmesi, aksiyon potansiyeli ateşlemesi ve uyarılabilmenin kontrolü, gen ekspresyonu ve enzim aktivasyonu gibi çeşitli hücre fizyolojik olayların düzenlenmesinde rol oynayan bir “ikincil haberci”dir.^{6,7} Ayrıca Ca²⁺ iyonları nöronal hücre gelişmesi, farklılaşması ve nöronal hücre ölümünde de rol oynar.⁸ Bu nedenle hücre içi serbest kalsiyum konsantrasyonu ([Ca²⁺]_i) sıkı bir kontrol altındadır.⁹ [Ca²⁺]_i düzeyindeki artış ya hücre dışından reseptör-aracılı veya voltaj kapılı Ca²⁺ kanalları aracılığı ile kalsiyum girişi, ya da hücre içi depolardan kalsiyum salıverilmesi ile gerçekleşir.^{7,9}

Bütün sinir hücreleri gibi DKG nöronlarında da [Ca²⁺]_i düzenleyici mekanizmaların etkin olduğu ve kalsiyum tetiklemeli kalsiyum salıverilmesinin de gerçekleştiği gösterilmiştir.¹⁰ Bütün merkezi sinir sistemi sinapsları gibi, duyuusal nöronlarda P maddesi ve kalsitonin geni ile ilişkili peptid (CGRP) gibi nosiseptif nörotransmitterlerin hücre içi kalsiyum miktarındaki artış sonucunda salıverildiği bi-

linmektedir.¹¹ İlave olarak, çeşitli kalsiyum kanal blokerlerinin deneysel ve klinik olarak ağrı giderici etkisinin olduğunu gösteren çok sayıdaki çalışma¹² kalsiyum kanallarının ağrı tedavisinde yeni ajan geliştirilmesinde önemli bir hedef ve hücre içi kalsiyum düzeyinin nosiseptif/antinosiseptif etki takibi için önemli bir belirteç olduğunu ortaya koymaktadır.¹³

Halk arasında isot (ısı otu) olarak da bilinen acı biberde yoğun olarak bulunan ve bibere acılığını veren alkaloid madde olan kapsaisin ilk olarak 1816 yılında P. A. Buchholz tarafından izole edilmiş ve 1846 yılında L.T. Tresh tarafından “capsaicin-kapsaisin” olarak adlandırılmıştır.¹⁴ Her ne kadar postherpetik nevralji ve zona gibi periferik nöropatide ağrı giderici olarak kullanılmakta¹⁵ ve hatta kanser tedavisinde etkin olduğuna yönelik tıbbi bilgiler bulunsa da,¹⁶ kapsaisinin asıl kullanım alanlarından biri nosisepsiyonla alakalı deneysel tıbbi çalışmalardır.

İn vivo olarak DKG nöronlarının uçlarında bulunan reseptörlerin, bu hücrelerin kültürü yapıldığı in vitro şartlarda hücre gövdelerinde ekspresyonu olduğu gösterilmiştir. Bu nedenle kültüre edilmiş DKG sinir hücrelerinin gövdeleri nosiseptif araştırmalar için iyi bir hücre model olarak kabul edilmektedir. Ancak, primer afferent nöronlar fonksiyonel olarak heterojendir. DKG nöronlarının da morfolojik olarak üç alt tipi olduğu bilinmektedir.

Bu çalışmada kapsaisinin (1 µM) farklı hücre gövdesi çapına sahip DKG sinir hücresi alt tiplerinde, hücre içi kalsiyum sinyalleri üzerine etkilerini, nonspesifik olarak hücre membranını depolarize ederek hücre içi serbest kalsiyum düzeyinde artışa yol açan KCl ile karşılaştırmalı olarak inceleyerek, hangi tip DKG hücrelerinin kapsaisine duyarlı olduğunun tespit edilmesi amaçlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEMLER

SIÇAN DORSAL KÖK GANGLION HÜCRELERİNİN PRİMER KÜLTÜRÜ HAZIRLANMASI

Hücre kültürü için yavru sıçanların dekapitasyon işlemi yerel Etik Kurul izni alındıktan sonra “Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (www.nap.edu/catalog/5140.html) prensipleri doğ-

rultusunda” gerçekleştirildi. Yavru sıçanlar Fırat Üniversitesi Deneysel Araştırma Merkezinden (FÜDAM) sağlandı.

Bu çalışmada kullanılan sıçan DKG sinir hücrelerinin primer kültürü daha önce detaylı olarak yayınlanan protokole göre hazırlandı.^{17,18} Dorsal kök ganglionları dekapite edilmiş iki günlük Wistar sıçanlarından diseksiyonla çıkarılarak, enzimatik ve mekanik yöntemlerle izole edilmiş tek hücrelere ayrıştırıldı.

Hücreler izole edilip önceden hücre dışı geliştirme matriksi, poli-δ-lizin ve laminin kaplanmış 12 mm çapındaki cam lamellere (BD BioCoat, ABD) ekildikten sonra 37 °C’de %5 karbondioksit içeren nemli bir inkübatörde (Heraus, Almanya) inkübasyona bırakıldı. Bu hücreler, en az 4-6 saat inkübe edilerek lamel üzerine iyice yapışması sağlandıktan sonra kalsiyum görüntüleme deneylerinde kullanıldı.

Dorsal kök ganglion (DKG) nöronları 1-2 günlük Wistar sıçanlarından izole edildi. Toplanan DKG’ları fosfat tamponlu salin (PBS) içerisinde iki kez yıkandı. Ardından, 13 dakika kollagenaz (1.25 mg/ml kültür vasatında, Sigma), altı dakika da tripsin (2.5 mg/ml, Sigma) ile enzimatik işleme tabi tutuldu. Ardından DNAaz (Sigma) ilave edilerek ucu daraltılmış Pastör pipeti aracılığı ile mekanik ayrıştırmaya tabi tutuldu. Kaplı lameller üzerine ekilen hücre süspansiyonu 200 ng/ml sinir büyütme faktörü (NGF 2.5 S, Sigma) eklenerek, %5 CO₂ ve %95 O₂ karışımı içeren nemli bir inkübatörde 37 °C inkübe edildi.

HÜCRE İÇİ KALSİYUM GÖRÜNTÜLEME VE GÖRÜNTÜ ANALİZLERİ

Hücrelerin fura-2AM ile yüklenmesi (floresan işaretleme): Bu hücreler, en az 4-6 saat inkübe edildikten ve lamel üzerine iyice yapışması sağlandıktan sonra kalsiyum görüntüleme deneylerinde kullanıldı. Hücrelerin aksonal ve dentritik uzantılar geliştirmesi floresan kalsiyum görüntüleme hesaplamalarını etkileyebileceği için görüntüleme deneylerinde genelde bir günlük hücreler kullanıldı.

Hücreler fura-2-AM (5 µM, Molecular Probes, İngiltere) ile oda sıcaklığında bir saat inkübe edilerek floresan boya yüklemesi yapıldı. Yüklemeyi ta-

kiben hücreler 20 dakika içerisinde NaCl-esaslı hücre dışı solüsyonu [135 mM NaCl, 5.9 mM KCl, 1.5 mM CaCl₂, 1.2 mM MgCl₂, 11.5 mM glikoz, 11.6 mM HEPES (ozmolarite 310 - 320 mOsm, sukroz) ile en az üç kez daha yıkanarak, hücre dışındaki boya uzaklaştırıldı ve fura-2'nin de-esterifikasyonu sağlandı ve kalsiyum görüntüleme deneyleri bu solüsyon kullanılarak gerçekleştirildi.

FLORESAN [Ca²⁺]_i GÖRÜNTÜLEME

Kalsiyum duyarlı floresan boya ile yüklenen hücreleri içeren lameller, mikroinkübasyon kayıt çemberine (Warner Instruments, ABD) aktarılarak, mikroinkübasyon-perfüzyon sistemi aracılığıyla NaCl-esaslı hücre dışı solüsyonu ile kayıt çemberine ince silikon hortum ile bağlantılı, açma kapaması bilgisayar kontrollü, akım hızı yer çekimine göre ayarlanan ilaç uygulama/perfüzyon sistemi (Warner Instruments, ABD) aracılığı ile (1 ml/dakika) sürekli perfüze edildi ve floresan ataşmanlı Nikon TE 2000S ters mikroskop altında gerektiğinde göz ile değerlendirildi. Bütün deneyler oda sıcaklığında (≈ 22°C) gerçekleştirildi ve bütün deneysel işlemler hücrelerin floresan işaretleyici ile yüklenmesinden maksimum bir saat içerisinde gerçekleştirildi. Floresan boyanın ışığa maruz kalarak ağarmasını sınırlandırmak optimum pozlama zamanı (exposure time) belirlendi ve bilgisayar kontrollü filtre sürücüsü perde (shutter) donanımı aracılığı ile görüntü alınmadığı zamanlarda ışık maruziyeti önlendi.

Fura-2 floresansı bir xenon ışık kaynağından (LS- Sutter Instr, ABD) gönderilen UV ışınının hızlı bir otomatize filtre sürücüsüne (Lambda-2, Sutter Instr, ABD) yerleştirilen fura-2 filtre seti 340 ve 380 nm filtrelerden (Chroma, ABD) gönderilerek mikroskop optikleri (Nikon TE 2000 S, S-flour 40X objektif, NA= 1.4) aracılığı dual eksitasyon ve 510 nm'de emisyon gerçekleştirildi. Floresan görüntüleri yüksek hızlı soğutmalı dijital bir CCD kamera (ORCA 285, Hamamatsu Photonics, Hamamatsu, Japonya) aracılığı ile veri kazanım-yazılım programı (sPCI, ComPix) aracılığı ile bilgisayar hafızasına kayıt edildi.

Floresan oranı analizleri off-line olarak, cevap veren hücrelerde ilgi alanı seçimleri yapılarak yazılım programı (sPCI, ComPix) aracılığıyla gerçekle-

tirildi. [Ca²⁺]_i hesaplanmasında, 510 nm'de emisyon gerçekleştirilerek 340 nm eksitasyonda elde edilen floresan yoğunluğunun 380 nm eksitasyonla elde edilen floresan yoğunluğuna oranlanması (dual uyarı: 340 nm/380 nm, emisyon: 510 nm) esas alındı.

Görüntü alanında yer alan DKG nöron profilleri hücre gövdesi büyüklüklerine göre küçük çaplı (<20 µM), orta çaplı (20-40 µM) ve büyük çaplı (>40 µM) olmak üzere üç alt gruba ayrıldı.⁴

Çalışmada kullanılan kapsaisin (Sigma) DMSO içerisinde çözüldü. Hücreler, perfüzyon sistemi aracılığı ile sadece kısa süreli bir kapsaisin (1 µM) ve yüksek K⁺ (30 mM) uygulamasına maruz bırakıldı. Uygulanan konsantrasyonda DMSO'nun [Ca²⁺]_i düzeyi üzerine etkisi olmadığı belirlendi.

İstatistiksel Analiz

Bütün veriler ortalama ± SEM olarak sunuldu. İstatistiksel karşılaştırmalar çift yönlü varyans analizi kullanılarak gerçekleştirildi. Gruplar arasındaki farklılığı ortaya koyabilmek amacıyla post hoc test olarak Tukey HSD testi kullanıldı. p< 0.05 istatistiksel anlamlılık düzeyi olarak kabul edildi.

BULGULAR

Önceki kısımda ayrıntılı olarak bahsedilen floresan kalsiyum görüntüleme yöntemi mevcut deney koşullarında fura-2 ile yüklenmiş stabil (bazal) istirahat floresan sinyalleri veren dorsal kök gangliyon hücrelerinden dakikalarca (45-60 dakika) stabil floresan sinyalleri kayıt edilebildiğini göstermiştir. Yine bu hücreler, standart olarak yüksek K⁺ (30 mmol/L) ile uyarılmaya [Ca²⁺]_i artışla cevap vermektedir.

Bu çalışmada [Ca²⁺]_i değişiklikleri takip edilerek, DKG hücre alt tiplerinin ağırlı uyaran olarak kapsaisin ve non-spesifik depolarizasyon olarak yüksek K⁺ ile uyarıma cevap verdiği tespit edildi. Desensitizasyonu önlemek için hücreler sadece bir kapsaisin uygulamasına maruz bırakıldı. Kapsaisin uygulaması öncesi 340/380 nm oranı yaklaşık olarak 0.6 ve 0.7 arasındaydı (Tablo 1).

Akut izole edilmiş DKG hücrelerinde hücre çaplarını ölçerek hangi alt tipin kapsaisin duyarlı olduğunu belirlemeye çalışıldı. Çalışılan hücrelerin hücre çapı dağılımı Şekil 1'de görülmektedir. Bu dağılım

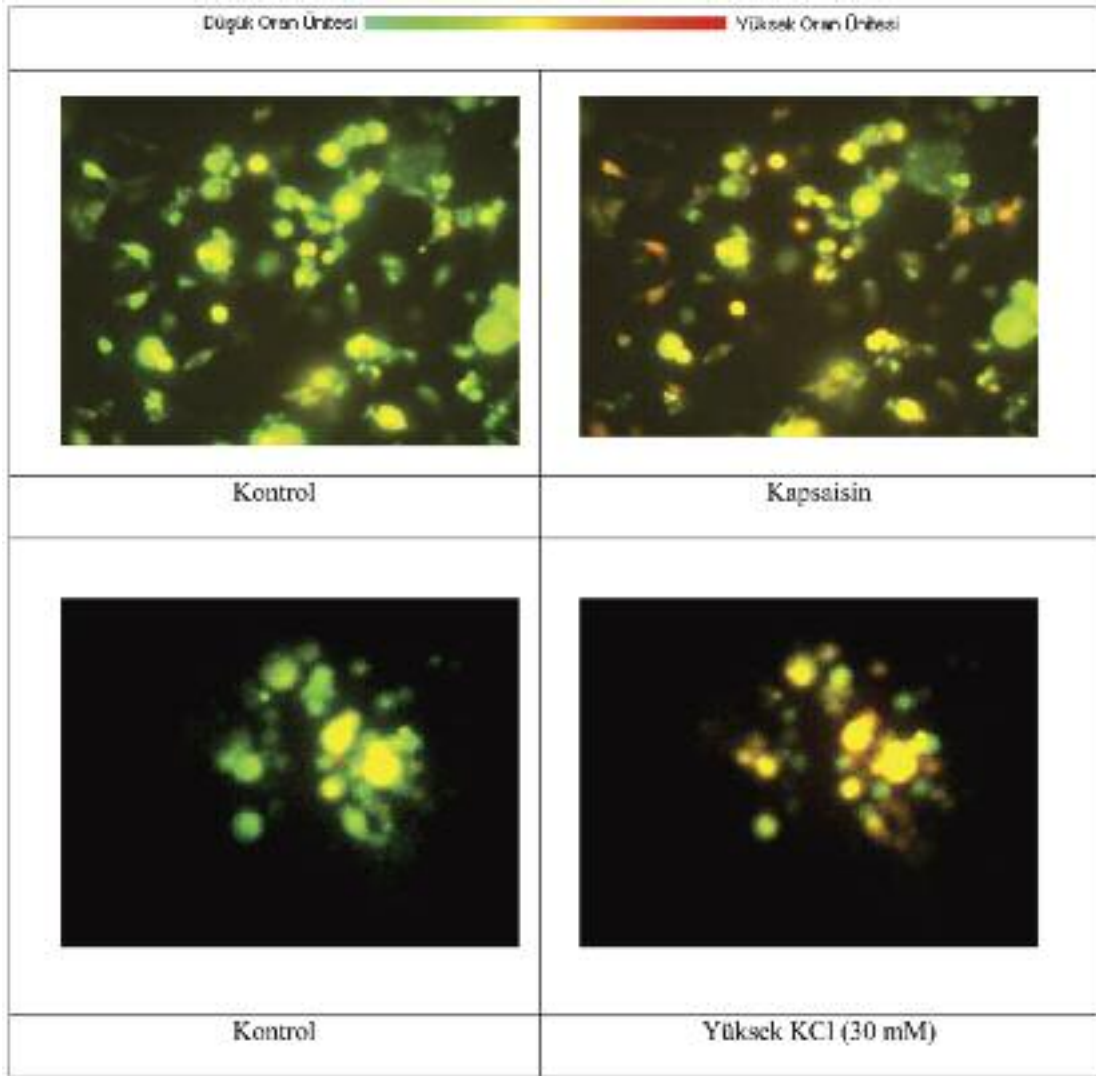
TABLO 1: Dorsal kök gangliyon ginir Hücreleri alt tiplerinde, kapsaisin (1 µM) ve yüksek K⁺ (30mM KCl) uygulamasına hücre içi serbest kalsiyum (Ca²⁺)_i düzeyi (340/380 nm floresan oranları) cevapları.

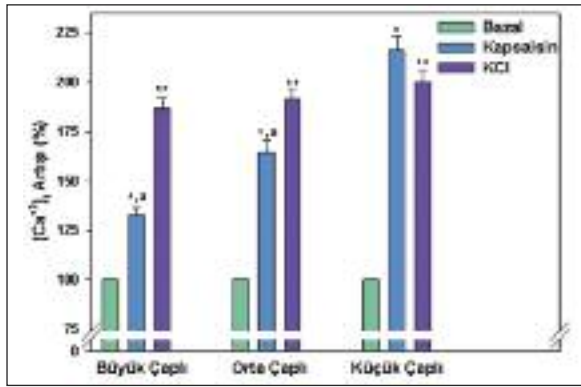
DKG Hücre Çapı	Bazal (Kontrol)		Yüksek KCl (30 mM)	
	Bazal (Kontrol)	Kapsaisin (1 µM)	Bazal (Kontrol)	Yüksek KCl (30 mM)
Büyük	0.70 ± 0.03 (n= 7)	0.93 ± 0.09 (n= 7)	0.67 ± 0.04 (n= 8)	1.25 ± 0.08 (n= 8)
Orta	0.68 ± 0.04 (n= 12)	1.12 ± 0.16 (n= 12)	0.71 ± 0.04 (n= 17)	1.36 ± 0.10 (n= 17)
Küçük	0.62 ± 0.06 (n= 16)	1.34 ± 0.19 (n= 16)	0.64 ± 0.05 (n= 26)	1.28 ± 0.11 (n= 26)

çalışılan görüntü alanlarında yer alan hücrelerin %49'unun (42/86) küçük çaplı (<20 µm), %34'ünün (29/86) orta çaplı (20-40 µm) ve %17'sinin (15/86) büyük çaplı (>40 µm) olduğunu ortaya koymaktadır (Tablo 1).

Kısa süreli (≈ 30 saniye) kapsaisin (1 µM) uygulanması DKG hücrelerinde geçici bir [Ca²⁺]_i artı-

şına yol açtı (Tablo 1, Şekil 1 ve 2). Tablo 1'de görüldüğü gibi kapsaisin uygulaması küçük çaplı DKG nöronlarında, büyük ve orta çaplı DKG nöronlarına oranla çok daha yüksek oranda ve belirgin bir [Ca²⁺]_i artışına yol açtı. Küçük, orta ve büyük çaplı DKG nöronlarının kapsaisine [Ca²⁺]_i cevap profilleri Tablo 1'de özetlenmiştir.

**ŞEKİL 1:** Kapsaisin ve yüksek KCl'in sıçan dorsal kök gangliyon hücre kültürlerinde [Ca²⁺]_i düzeylerine etkisini gösteren orijinal resim.



ŞEKİL 2: Kültüre DKG sinir hücresi alt tiplerinde kapsaisin ve KCl duyarlılıklarının karşılaştırılması.

Bazal $[Ca^{2+}]_i$ düzeyi %100 olarak kabul edilerek kapsaisin (1 μ M) ve yüksek KCl (30 mM) uygulamasına $[Ca^{2+}]_i$ cevapları bu değere göre yüzde olarak ifade edilmiştir. Bar grafikler % floresan oranı \pm S.E.M'i göstermektedir. Her gruptaki hücre sayısı grafik üzerinde gösterilmiştir. *: Bazal düzey ile kapsaisin karşılaştırıldığında; **: Bazal düzey ile yüksek KCl karşılaştırıldığında, a: Kapsaisin cevabı ile yüksek KCl cevabı karşılaştırıldığında $p < 0.05$.

Fura-2 ile yüklenmiş DKG hücrelerinde kontrol koşullarında (Şekil 1, bazal, sol sütun) ve kapsaisin (1 μ M) ve yüksek KCl (30 mM) ile süperfüzyon esnasında floresan oranını gösteren orijinal resimlerde kapsaisin uygulamasından sonra küçük çaplı hücrelerde $[Ca^{2+}]_i$ artışı dikkat çekerken KCl uygulaması hemen hemen bütün hücre alt tiplerinde $[Ca^{2+}]_i$ artışı yönünden benzer etki göstermektedir.

Hücre çaplarına göre yapılan sınıflandırmaya göre, farklı DKG nöron alt tiplerinde kapsaisine $[Ca^{2+}]_i$ cevap farklılığının, non-spesifik membran depolarizasyonuna $[Ca^{2+}]_i$ cevapları için de geçerli olup olmadığı test etmek için yüksek K^+ (30 mM) ile uyarma protokolü uygulandı.

Yüksek KCl^+ (30 mM) uygulanması DKG nöronlarında belirgin bir $[Ca^{2+}]_i$ artışına yol açtı. Küçük, orta ve büyük çaplı DKG nöronlarının yüksek KCl uygulamasına $[Ca^{2+}]_i$ cevap profilleri Tablo 1'de görülmektedir. Hücre dışına uygulamayı takiben oldukça kısa sürede ortaya çıkan etki geri dönüşümlüdür (Şekil 1). Yüksek K^+ ile uyarılmaya cevaplılık oranı bakımından ve cevaben gözlenen $[Ca^{2+}]_i$ artış düzeyleri bakımından hücre çaplarına göre DKG nöronları alt tipleri arasında anlamlı bir fark yoktu (Tablo1, Şekil 1 ve 2).

DKG sinir hücresi alt tiplerinin kapsaisin ve yüksek K^+ a bazale göre % $[Ca^{2+}]_i$ cevapları Şekil 2'de görülmektedir.

TARTIŞMA

Bu çalışmada kültüre edilmiş DKG hücrelerinin çapları ölçülerek bu hücrelerin kapsaisin ve KCl ile uyarılmaya karşı oluşan hücre içi kalsiyum değişimleri çaplarıyla bağlantılı olarak irdelendi.

Kültüre DKG nöronlarının kapsaisin ve KCl ile uyarılmaya karşılık oluşan cevaplarını çaplarına göre sınıflandırarak nosiseptif nöronları tespit ettik. Kapsaisinin, nosiseptif primer afferent nöronlardan küçük çaplı olanları etkileyerek, katyon-seçici iyon kanallarının açılmasına neden olduğu ve hücre içi serbest kalsiyum düzeylerinde büyük artışlara yol açtığı gösterilmiştir.¹⁹⁻²¹

Ancak, nonspesifik depolarizasyon ile kapsaisin cevapları arasında kıyas yapılarak hücre çapına göre DKG nöronlarından hangisinin ağrı için daha spesifik model olduğu yeterince irdelenmemiştir. Bu çalışmada kapsaisin cevaplarını KCl ile kıyaslayarak hücre çapına göre alt tiplerinin nosiseptif farklılıklarını göstermiş bulunmaktayız.

Hücre görüntüleme, farmakoloji, elektrofizyoloji ve in vivo davranışsal testleri kapsayan ve gitikçe daha güçlenen deneysel ağırlı araştırma yöntemleri ile bu konuda tedavi için önemli gelişmeler sağlanmaktadır. Bu bağlamda, oldukça kompleks olan mekanizmaların uygun deneysel modellerde, geçerli belirteçler kullanılarak irdelenmesi deneysel verilerin önemini ve bu çalışmaların etkinliğini artıracığı kesindir. DKG hücreleri nosisepsiyon için kabul görmüş bir hücre model olup yaygın olarak kullanılmaktadır. Ancak, bu makalenin giriş kısmında da detaylı olarak ele alındığı gibi bu nöronların kültürlerinde farklı hücre tipleri bulunmaktadır. Mevcut çalışmanın esas amacı, bu alt tiplerden hangisinin nosisepsiyon için en uygun hücre model olduğunu belirlemektir.

Duyusal nöronal mekanizmalar çevresel değişiklikleri ayırt eder, uyarının şiddet ve temporal özelliklerini algılamayı sağlar. Duyusal nöronlar deri, kas ve diğer iç organlarda yer alan duyusal reseptörler olarak adlandırılan özelleşmiş yapıları ile dış ve iç ortam hakkında bilgi alırlar. Primer afferent nöronlar fonksiyonel olarak heterojendir; farklı duyusal nöronlar moleküler olarak diğerle-

rinden ayrıdır ve farklı tip uyaranlara duyarlıdır. Uyarılar periferel reseptörler tarafından algılanarak sinir impulslarına dönüştürülür ve merkezi sinir sistemine aktarılan bu sinyaller beyin tarafından ısı, dokunma ve ağrı gibi farklı duyuşsal özellikler olarak algılanırlar. Farklı duyuşsal uyaranların beyin tarafından seçici olarak algılanmasının fizyolojik temelinde, duyuşsal nöronların belli uyaranlara özelleşmiş alt tiplerinin olduğu ve duyuşsal nöronların algılayıcı ucunda uyarana özgün “moleküler algılayıcılar” ve dönüştürücü moleküller olduğu gerçeğinin yattığı bilinmektedir. 1837’li yıllarda, Johannes Müller tarafından konuda ileri sürülen “spesifik sinirsel enerjiler” doktrininden moleküler esaslara dayalı güncel algılamaya kadar ilgili süreç ve konudaki mevcut bilgiler, yeni derlemlerde detaylı olarak ele alınmıştır.^{22,23}

Bazı çalışmalarda DKG nöronları küçük çaplı ($\approx < 20 \mu\text{m}$) ve büyük çaplı ($\approx > 20 \mu\text{m}$) olarak başlıca iki ana grup olarak sınıflandırılmalarına rağmen; mevcut çalışmada gözlenen kapsaisin cevaplılığının bu sınıflandırmadan ziyade üç ana alt gruba ayırmaya daha uyumlu olduğu tespit edildiğinden, çalışmamızda üç gruba ayırma be-nimsenmiştir.⁴

İlave olarak, çalışmanın materyalini oluşturan sıçan DKG primer kültüründe görüntü alanlarında yer alan sinir hücrelerinde hücre çapına göre yapılan sınıflandırmada alt tip oranları, daha önce aynı hücre kültürleri için bildirilen oranlar ile uyumlu bulundu. Çalışmamızda %49 ile en yüksek oranda tespit edilen küçük çaplı nöronlardan sonra %34 ile orta çaplı ve %17 ile büyük çaplı (Tablo 1) nöronlar için oranlar az da olsa değişse de, bu alanda ilk sınıflandırmayı yapan Harper ve ark. ile benzeri çalışmalarda da küçük çaplı hücreler en yüksek ve büyük çaplı hücreler en düşük oranda rapor edilmiştir.^{4,24,25}

İlgili çalışmalar genelde vezikül transportu, nörotransmitter salıverilmesi, uyarılma yoluyla sinyal iletimi gibi nosisepsiyonda rol alan mekanizmalardan hangisinde spesifik olarak rol oynadığı net olarak aydınlatılamamışsa da, hücre içi kalsiyum artışının spinal dorsal boynuz ve diğer periferel bölgelerde nosiseptif cevabın başlamasında

anahtar rol oynadığı kabul edilmektedir. Voltaj bağımlı kalsiyum kanalları aracılığı ile hücre dışından kalsiyum girişinin akut nosiseptif bilginin spinal düzeyde iletiminde rol aldığı gösterilmiştir.²⁶ Yine, akut, tonik ve kronik ağrı için hücreşel ve davranışsal nosiseptif modellerde gerçekleştirilen çalışmalarda N-tipi, L-tipi ve diğer kalsiyum kanal antagonistlerinin antinosiseptif etki gösterdiği tespit edilmiştir.²⁷⁻³⁰ Nosiseptif hücre modeli DKG sinir hücre kültürlerinde hücre gövdesinde voltaj bağımlı kalsiyum kanallarının da nosisepsiyonda rol oynayan iyon kanalları arasında (voltaj bağımlı Na^+ , K^+ kanalları, TRP kanalları, 5-HT reseptörler, asit duyarlı iyon kanalları...) yer aldığı bilinmektedir.³¹ Bu literatür bilgilerinin ışığı altında mevcut çalışmada $[\text{Ca}^{+2}]_i$ değişiklikleri nosiseptif sinyal belirteci olarak kabul edilerek floresan kalsiyum görüntüleme tekniğı ile hücre içi kalsiyum düzeyleri değerlendirilmiştir.

Kapsaisinin hücreşel etki mekanizması daha önceki çalışmalarla ortaya konduğu ve bu çalışmanın esas amacını teşkil etmediğı için ilave olarak irdelenmedi. Kapsaisinin yakıcı ve acı hissi bu maddenin duyuşsal nöronlarla etkileşimi sonucu ortaya çıkmaktadır. Vaniloid ailesine üye olan kapsaisin, aktive olduğunda katyonların geçişine müsaade eden “vaniloid reseptör 1 (VR1)” adlı reseptör alt tipine bağlanır.³² Hücre içine katyon girişinin hücreyi depolarize ederek beyine sinyal gönderdiği kabul edilmektedir.

Non-selektif katyon kanalları olan “transient reseptör potansiyel (TRP) kanalları” Ca^{+2} ve Na^{+} ’a geçirgen olup duyuşsal fizyoloji için son derece önemli iyon kanallarıdır.³³ Bu kanalların duyuşsal öneme sahip rolleri arasında termal duyarlılık, kimyasal duyarlılık, mekanik duyarlılık, dokunma hissi ve işitme yer almaktadır.³⁴ Selektif agonist ve antagonistleri klinik kullanım ve gelişme aşamasında olan vaniloid-tip TRP 1 (TRPV1) kanalları bu sınıfın en fazla çalışılmış üyeleri olup yeni ve umut vaat eden ağrı hedefleri olarak değerlendirilmektedir.³⁵ Bu bağlamda, küçük çaplı DKG nöronları ağrı tedavisine yönelik araştırmalara konu ve tedaviye hedef teşkil eden iyon kanallarını da ihtiva etme yönüyle, “hücreşel ağrı modeli olma” potansiyeli arz etmektedir.

KCl, sinir hücrelerinde sinyal transdüksiyonu için yaygın olarak kullanılan ve depolarizasyonu ile hücreye kalsiyum girişini uyaran bir stimulustur. Çalışmada küçük, orta ve büyük çaplı DKG nöronlarının kapsaisin duyarlılığını (klasik kimyasal nosiseptif uyaran) test etmek için, nonspesifik membran depolarizasyonu için KCl kullanıldı. KCl membranı depolarize ederek voltaj bağımlı kalsiyum kanallarından kalsiyum girişi yoluyla $[Ca^{+2}]_i$ belirgin bir artışa yol açtı. KCl ile indüklen $[Ca^{+2}]_i$ cevapları, kapsaisinin aksine DKG alt tipleri arasında belirgin bir farklılık gözlemlenmez, bütün alt tiplerde benzer profilde gerçekleşti. Daha önce DKG hücrelerinde de gerçekleştirilen çalışmalarla uyumlu olarak kısa süreliğine KCl (30 mM) uygulanması voltaj bağımlı kalsiyum kanalları aracılığıyla $[Ca^{+2}]_i$ düzeyinde geri dönüşümlü bir artışa yol açtı.³⁶

Önceki çalışmalar kapsaisinin düşük iletkenlikli C-liflerini ve A-delta liflerini etkilediğini fakat yüksek eşikli mekanoreseptörleri etkilemediğini göstermiştir. Kapsaisinin, deri ve eklemlerdeki yavaş iletkenlikli C- ve A-delta tipi nosiseptörleri uyardığı gösterilmiştir.³⁷⁻³⁹ Bu çalışmanın bulguları A lifleri ile alakalı olma ihtimali yüksek olan büyük çaplı DKG nöronlarının mekanik hipe-

restezi, C-lifleri ile alakalı olma ihtimali yüksek olduğu bildirilen küçük çaplı DKG nöronlarının da nosisepsiyonda rol aldığı bilgisi ile uyumludur.⁴⁰

Moleküler görüntüleme teknikleri hücresel mekanizmaların anlaşılması ve tedaviye yönelik ilaç geliştirilmesi çalışmalarının etkinliğinin artırılmasında giderek daha güçlü rol oynamaktadır. Bu çalışmada kullanılan floresan kalsiyum görüntüleme protokolü de, yaygın rolleri olan hücresel ikincil bir haberci molekülünün düzeyinin güvenle takibini sağlayan önemli bir tekniktir.

Sonuç olarak; bu çalışmanın bulguları DKG hücrelerinin nosisepsiyon çalışmaları için uygun bir sistem olduğunu ve özellikle küçük çaplı DKG hücrelerinin ağrı duyarlı olduklarını bir kez daha doğrulamaktadır. Ağrı tedavisinde etkin olası yeni ajanların keşfi için zaten yerleşik hücresel model olan DKG hücreleri için bu bulgular da alt tip belirlenmesinde ilave kanıt sağlar niteliktedir. Bu saptama, ağrıyla alakalı iyon kanalı, reseptör ve hücresel sinyalleşme mekanizmalarının eksprese edildiği DKG nöron kültüründe küçük çaplı hücrelerin, akut ve kronik ağrı durumları için yeni analjezik ajanlar geliştirilme çalışmalarında faydalı bir model olması yönünden önem arz etmektedir.

KAYNAKLAR

1. Bıçkacı Ş, Sarıca Y. [Pain and related mechanisms]. *Türkiye Klinikleri J Int Med Sci* 2006;2(5):1-5.
2. Celebi N, Canbay O, Sahin A. [Current approach in diagnosis and treatment of neuropathic pain: review]. *Türkiye Klinikleri J Med Sci* 2007;27(6):862-9.
3. Lewin GR, Stucky CL. Sensory neuron mechanotransduction: regulation and underlying molecular mechanisms. In: Wood JN, ed. *Molecular Basis of Pain Transduction*. 1sted. New York: Wiley; 2000. p.129-48.
4. Harper AA, Lawson SN. Conduction velocity is related to morphological cell type in rat dorsal root ganglion neurones. *J Physiol* 1985; 359:31-46.
5. Woolf CJ, Shortland P, Coggeshall RE. Peripheral nerve injury triggers central sprouting of myelinated afferents. *Nature* 1992;355(6355): 75-8.
6. Catterall WA. Structure and function of neuronal Ca^{2+} channels and their role in neurotransmitter release. *Cell Calcium* 1998;24(5-6):307-23.
7. Berridge MJ, Lipp P, Bootman MD. The versatility and universality of calcium signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2000;1(1):11-21.
8. Berridge MJ, Bootman MD, Roderick HL. Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2003; 4(7):517-29.
9. Thayer SA, Usachev YM, Pottorf WJ. Modulating Ca^{2+} clearance from neurons. *Front Biosci* 2002;7:d1255-79.
10. Ayar A, Scott RH. The actions of ryanodine on Ca^{2+} -activated conductances in rat cultured DRG neurones; evidence for Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1999;359(2):81-91.
11. Evans AR, Nicol GD, Vasko MR. Differential regulation of evoked peptide release by voltage-sensitive calcium channels in rat sensory neurones. *Brain Res* 1996;712(2): 265-73.
12. Gribkoff VK. The role of voltage-gated calcium channels in pain and nociception. *Semin Cell Dev Biol* 2006;17(5):555-64.
13. Hwang SW, Oh U. Current concepts of nociception: nociceptive molecular sensors in sensory neurons. *Curr Opin Anaesthesiol* 2007;20(5):427-34.
14. Nelson EK. The constitution of capsaicin, the pungent principle of capsicum. *J Am Chem Soc* 1919;41(7):1115-21.
15. Pittler MH, Ernst E. Complementary therapies for neuropathic and neuralgic pain: systematic review. *Clin J Pain* 2008;24(8):731-3.
16. Aggarwal BB, Kunnumakara AB, Harikumar KB, Tharakan ST, Sung B, Anand P. Potential of spice-derived phytochemicals for cancer prevention. *Planta Med* 2008;74(13):1560-9.
17. Ayar A, Thatcher NM, Zehavi U, Trentham DR, Scott RH. Mobilization of intracellular calcium by intracellular flash photolysis of caged dihydropyridine in cultured neonatal rat sensory neurones. *Acta Biochim Pol* 1998;45(2):311-26.

18. Ayar A, Scott RH. Difficulties associated with the study of action potentials after-potentials in rat cultured sensory neurones. *Turk J Med Sci* 2001;31(1):29-34.
19. Wood JN, Winter J, James IF, Rang HP, Yeats J, Bevan S. Capsaicin-induced ion fluxes in dorsal root ganglion cells in culture. *J Neurosci* 1988;8(9):3208-20.
20. Dray A, Forbes CA, Burgess GM. Ruthenium red blocks the capsaicin-induced increase in intracellular calcium and activation of membrane currents in sensory neurones as well as the activation of peripheral nociceptors in vitro. *Neurosci Lett* 1990;110(1-2):52-9.
21. Greffrath W, Kirschstein T, Nawrath H, Tree-de R. Changes in cytosolic calcium in response to noxious heat and their relationship to vanilloid receptors in rat dorsal root ganglion neurons. *Neuroscience* 2001;104(2):539-50.
22. Belmonte C, Viana F. Molecular and cellular limits to somatosensory specificity. *Mol Pain* 2008;4:14.
23. Onal A. [Basic concepts related with the sensation of pain: neurophysiological mechanisms, endogenous opioid peptides and opioidergic receptors]. *Turkiye Klinikleri J Int Med Sci* 2005;1(9):1-14.
24. Lawson SN, Perry MJ, Prabhakar E, McCarthy PW. Primary sensory neurones: neurofilament, neuropeptides, and conduction velocity. *Brain Res Bull* 1993;30(3-4):239-43.
25. Lu SG, Gold MS. Inflammation-induced increase in evoked calcium transients in subpopulations of rat dorsal root ganglion neurons. *Neuroscience* 2008;153(1):279-88.
26. Malmberg AB, Yaksh TL. Voltage-sensitive calcium channels in spinal nociceptive processing: blockade of N- and P-type channels inhibits formalin-induced nociception. *J Neurosci* 1994;14(8):4882-90.
27. Miranda HF, Bustamante D, Kramer V, Pelissier T, Saavedra H, Paeille C, et al. Antinociceptive effects of Ca²⁺ channel blockers. *Eur J Pharmacol* 1992;217(2-3):137-41.
28. Diaz A, Dickenson AH. Blockade of spinal N- and P-type, but not L-type, calcium channels inhibits the excitability of rat dorsal horn neurons produced by subcutaneous formalin inflammation. *Pain* 1997;69(1-2):93-100.
29. Todorovic SM, Pathirathna S, Meyenburg A, Jevtovic-Todorovic V. Mechanical and thermal anti-nociception in rats after systemic administration of verapamil. *Neurosci Lett* 2004;360(1-2):57-60.
30. Chaplan SR, Pogrel JW, Yaksh TL. Role of voltage-dependent calcium channel subtypes in experimental tactile allodynia. *J Pharmacol Exp Ther* 1994;269(3):1117-23.
31. Lee Y, Lee CH, Oh U. Painful channels in sensory neurons. *Mol Cells* 2005;20(3):315-24.
32. Dray A. Mechanism of action of capsaicin-like molecules on sensory neurons. *Life Sci* 1992;51(23):1759-65.33.
33. Venkatachalam K, Montell C. TRP channels. *Annu Rev Biochem* 2007;76(1):387-417.
34. Damann N, Voets T, Nilius B. TRPs in our senses. *Curr Biol* 2008;18(18):880-9.
35. Broad LM, Mogg AJ, Beattie RE, Ogden AM, Blanco MJ, Bleakman D. TRP channels as emerging targets for pain therapeutics. *Expert Opin Ther Targets* 2009;13(1):69-81.
36. Sutton KG, Martin DJ, Pinnock RD, Lee K, Scott RH. Gabapentin inhibits high-threshold calcium channel currents in cultured rat dorsal root ganglion neurons. *Br J Pharmacol* 2002;135(1):257-65.
37. Baumann TK, Simone DA, Shain CN, LaMotte RH. Neurogenic hyperalgesia: the search for the primary cutaneous afferent fibers that contribute to capsaicin-induced pain and hyperalgesia. *J Neurophysiol* 1991;66(1):212-27.
38. He X, Schmidt RF, Schmittner H. Effects of capsaicin on articular afferents of the cat's knee joint. *Agents Actions* 1988;25(3-4):222-4.
39. Kenins P. Responses of single nerve fibres to capsaicin applied to the skin. *Neurosci Lett* 1982;29(1):83-8.
40. Shir Y, Seltzer Z. A-fibers mediate mechanical hyperesthesia and allodynia and C-fibers mediate thermal hyperalgesia in a new model of causalgiform pain disorders in rats. *Neurosci Lett* 1990;115(1):62-7.