T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

Tez Yöneticisi
Doç. Dr. Özgür GÜNDÜZ
İkinci Tez Yöneticisi
Prof. Dr. Ahmet ULUGÖL

SEROTONİN İLE OLUŞTURULAN KAŞINTI ÜZERİNE ENDOKANNABİNOİD SİSTEM MODÜLATÖRLERİNİN ROLÜ

(Yüksek Lisans Tezi)

Nurcan TOSUN

Referans no:10007557

EDİRNE-2019

T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

Tez Yöneticisi
Doç. Dr. Özgür GÜNDÜZ
İkinci Tez Yöneticisi
Prof. Dr. Ahmet ULUGÖL

SEROTONİN İLE OLUŞTURULAN KAŞINTI ÜZERİNE ENDOKANNABİNOİD SİSTEM MODÜLATÖRLERİNİN ROLÜ

(Yüksek Lisans Tezi)

Nurcan TOSUN

Destekleyen Kurum: TÜBAP- 2012/187

Tez No:

EDİRNE-2019

T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitü Müdürlüğü

O N A Y

Trakya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı çerçevesinde ve Prof. Dr. Ahmet ULUGÖL'ün danışmanlığında Yüksek Lisans öğrencisi Nurcan TOSUN'a ait tez başlığı "Serotonin ile Oluşturulan Kaşıntı Üzerine Endokannabinoid Sistem Modülatörlerinin Rolü" olarak teslim edilen bu tezin tez savunma sınavı 18.04.2019 tarihinde yapılarak aşağıdaki jüri üyeleri tarafından **"Yüksek Lisans Tezi"** olarak kabul edilmiştir.

Doç. Dr. Özgür GÜNDÜZ
JÜRİ BAŞKANI

Prof. Dr. Aydın BARLAS
ÜYE

Prof.Dr. Dikmen DÖKMECİ
ÜYE

Yukarıdaki imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.

Prof. Dr. Tammam SİPAHİ
Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimde değerli katkılarından dolayı danışman hocalarım Doç. Dr. Özgür GÜNDÜZ ve Prof. Dr. Ahmet ULUGÖL'e; ayrıca Prof. Dr. Ç. Hakan KARADAĞ, Prof. Dr. Dikmen DÖKMECİ, Dr. Öğr. Üyesi Ruhan D. TOPUZ'a, çalışmalarımda yardımlarından dolayı Uzm. Kübra DUVAN AYDEMİR'e, Uzm. Zeynep G. TODURGA'ya, projeyi destekleyen TÜBAP'a beni yetiştiren anne ve babama, ve eşim Tamer TOSUN'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

GİRİŞ VE AMAÇ **1**

GENEL BİLGİLER **3**

- **KAŞINTI** **3**
- **SEROTONİN** **12**
- **ENDOKANNABİNOİD SİSTEM** **15**

GEREÇ VE YÖNTEMLER **20**

BULGULAR **28**

TARTIŞMA **33**

SONUÇLAR **38**

ÖZET **40**

SUMMARY **41**

KAYNAKLAR **42**

ŞEKİLLER LİSTESİ **51**

ÖZGEÇMİŞ **53**

EKLER

SİMGE VE KISALTMALAR

AEA	**:**	Anandamid
CB_1	**:**	Kannabinoid reseptör-1
CB_2	**:**	Kannabinoid reseptör-2
ECS	**:**	Endokannabinoid sistem
FAAH	**:**	Yağ asidi amid hidrolaz
GRPR	**:**	Gastrin-serbestleyici peptid reseptörü
IL-2	**:**	İnterlökin-2
IL-31	**:**	İnterlökin-31
İ.d.	:	İntradermal
İ.p.	**:**	İntraperitoneal
LTB_4	**:**	Lökotrien B_4
MAGL	**:**	Monoaçilgliserol lipaz
NK_1	**:**	Nörokinin-1 reseptör
PAR	**:**	Proteaz ile aktive reseptör
PEA	**:**	*N*-palmitol etanolamin
SP	**:**	P maddesi
SSRI	**:**	Serotonin reuptake inhibitörleri
TCA	**:**	Trisiklik antidepresanlar
THC	**:**	Δ9-tetrahidrokannabinol
TRPV1	**:**	Vaniloid reseptör-1

2-AG	**:**	2-araşidonil gliserol
5-HIAA	**:**	*5*-hidroksiindol-*3*-asetik asit
5-HT	**:**	Serotonin

GİRİŞ VE AMAÇ

Kaşıntı rahatsızlık veren ve yaşam kalitesini belirgin olarak bozan bir semptomdur (1). Alerjik, inflamatuvar, paraziter ve enfeksiyon nedenli deri hastalıkların belirtisi olabileceği gibi neoplazik, metabolik, otoimmün veya psikolojik hastalıklarının da bulgusu olabilir (2). Ağrı ile kaşıntı arasında benzerlikler bulunmaktadır, özellikle yolakları ve nöromediyatörleri benzerdir (3,4). Kaşıntı aslında belirli bir uyarana karşı oluşan, ağrının hafif bir şekli olarak kabul edilebilir (5). Son zamanlarda ağrıda olduğu gibi kaşıntıda da yalnızca periferik mekanizmaların değil, santral mekanizmaların da rol oynadığı ortaya çıkmış olup, kaşıntı tedavisine karşı yaklaşımlar değişmeye başlamıştır (6).

Kannabinoid agonistlerinin kaşıntı önleyici etkileri hakkında yeni bilgiler literatürde ortaya konulmuştur; fakat bu grup ilaçların istenmeyen birçok etkileri (bağımlılık, hipotermi, katalepsi, hipoaktivite, vb.) kullanımlarını son derece kısıtlamaktadır (7-9). Endokannabinoidlerin yıkımında sorumlu olan monoaçilgliserol lipaz (*monoacylglycerol lipase*; MAGL) ve yağ asidi amid hidrolaz (*fatty acid amide hydrolase*; FAAH) gibi enzimlerin inhibe edilmesi ve endokannabinoid uptake'nin engellenmesi anandamid (AEA) ve 2-araşidonilgliserol (2-AG) gibi endokannabinoidlerin omurilik, beyin ve periferik dokulardaki düzeylerinin artmasına yol açar. Düzeyleri artan endokannabinoidlerin kannabinoid agonistlerinde görülen istenmeyen etkiler olmaksızın nöropatik ağrı belirtilerini azalttığını gösteren çalışmalar bulunmaktadır (10,11).

Bütün bu veriler ışığında endokannabinoid sistem (ECS) modülatörlerin kaşıntıyı önleyebileceğini düşündük. Bu görüşün doğruluğunu test etmek için, ECS modülatörlerinin serotoninle oluşturulan kaşıntıyı önleyici etkilerini göstermeyi, bu etkiye hangi modülatör sistemin (1-FAAH inhibisyonu, 2-MAGL inhibisyonu veya 3-uptake inhibisyonu) aracılık ettiğini araştırmayı ve kannabinoid reseptörlerinden hangisinin bu etkide daha önemli rol oynadığını belirlemeyi hedefledik.

GENEL BİLGİLER

KAŞINTI

Kaşıntı (*pruritus*); insanları rahatsız eden ve insanda nahoş duygular uyandıran bir duygudur ve yaşam kalitesini bozmaktadır. Kimi zaman bir deri hastalığıyla ortaya çıkan kaşıntı, kimi zaman ise sistemik bir hastalığa eşlik eder. Psikolojik bir bozukluğun yansıması olabileceği gibi, sebepsiz bir şekilde de meydana gelebilen lokal veya yaygın hissedilen bir semptomdur. Kaşıntının patofizyolojisi tam olarak aydınlatılmış değildir. Kaşıntının patofizyolojisinde, cildin sıcak, soğuk, sürtünme gibi etkilere maruz kalması sonucunda histamin, serotonin gibi kaşıntı mediyatörleri artışının rolü olduğu düşünülmektedir. Öte yandan, merkezi sinir sistemine etki eden tümör ve birtakım kimyasal maddeler de kaşıntının patofizyolojisinde rol oynamaktadır (12).

Genel olarak, kısa süren pek rahatsızlık vermeyen kaşıntılara “akut kaşıntı”, 6 haftadan daha uzun süren kaşıntılara “kronik kaşıntı” denmektedir. Kronik kaşıntının sebeplerini 4 başlık altında tanımlayabiliriz (5).

Pruritoseptif Kaşıntı

Derinin çeşitli faktörler (böcek ısırma ve sokmaları, inflamatuvar cilt hastalıkları, vb.) tarafından hasarlanması sonucu ortaya çıkan kaşıntı mediyatörlerinin, myelinsiz C liflerinin serbest sinir uçlarını uyarmasıyla meydana gelen bir kaşıntı türüdür (13,14).

Nöropatik Kaşıntı

Aferent kaşıntı yolunun herhangi bir noktasında meydana gelen hasara bağlı ortaya çıkan kaşıntıdır. Örnek olarak Zona, beyin tümörü ve multipl skleroz gibi hastalıklarda gelişen kaşıntı verilebilir (5,13).

Nörojenik Kaşıntı

Santral sinir sisteminin doğrudan uyarılmasıyla ortaya çıkan bir kaşıntı olarak tanımlanır. Bu kaşıntının ortaya çıkması için periferik duyu sinirlerinin uyarılmasına gerek yoktur. Doğrudan bir sinir hasarı yoktur. Opioid reseptörlerinin uyarılması sonucu oluşan santral kökenli kaşıntılar bu gruba dahil edilebilir. Böbrek yetmezliği sonucu oluşan üreminin sebep olduğu kaşıntılar da bu tip kaşıntıya örnek gösterilebilir, ancak üremide meydana gelen cilt kuruluğu da kaşıntının sebebi olabilir (13,14).

Psikojenik Kaşıntı

Herhangi bir fiziksel sebebe bağlı olmayan kaşıntılardır. Parazit delüzyonu gibi durumlardan kaynaklanan kaşıntı türüdür. Anksiyete bozukluğu, depresyon, deliryum, somatizasyon bozukluğu gibi psikolojik hastalıklarda da görülebilir (5,13-15).

KAŞINTI VE AĞRI ARASINDAKİ İLİŞKİ

Kaşıntı ve ağrı koruyucu duyular olmasına rağmen şiddetli oldukları zaman kişiyi rahatsız ederler ve yaşam kalitesini bozarlar. İletim yolları ve oluşum mekanizmaları arasında benzerlikler bulunmaktadır. Kaşıntı ve ağrının periferde oluşumda rol alan ciltte bulunan mediyatörler ile oluşan uyarının omuriliğin arka boynuzuna iletimi sağlayan duyusal lifler aynıdır. Drzezga ve ark. pozitron emisyon tomografisi kullanarak yaptıkları kaşıntı çalışmalarında, ağrı algısında aktive olan talamus, prefrontal korteks, somatosensoriyel korteks ve anterior singulat korteks gibi premotor alanların ve serebellumun kaşıntı oluşumunda da aktive olduğunu göstermişlerdir (16). Kaşıntı cilt ve mukozalarda meydana gelirken ağrı vücudun her yerine oluşabilir. Bu da ağrı yolaklarının daha yaygın olduğunu göstermektedir. Ayrıca ciltten omuriliğin arka boynuzuna uyarı taşıyan duyusal nöronlar benzer olsa da kaşıntı ve ağrı farklı hissedilir ve farklı yanıtlanır. Omurilikte kaşıntı ve ağrı arasındaki modalite azaldıkça bu iki durum arasında ayrım kolay yapılabilmektedir

(17). Kaşıntının spesifik yollarla merkezi sinir sistemine taşındığı düşünülmektedir. Örneğin histamin ve sığırkuyruğu bitkisinin başlattığı uyarı iki ayrı yolla merkezi sinir sistemine ulaşır ve burada iki ayrı bölgeyi uyarır ve dolayısıyla iki ayrı kaşıntı tipi oluşur. Histamin daha yakıcı bir kaşıntı oluştururken sığırkuyruğu daha batıcı bir kaşıntı oluşturur (18,19).

Deride mast hücreleri tarafından salgılanan histamin kaşıntıya aracılık etmektedir. Fonksiyonel pozitron emisyon tomografi ve fonksiyonel manyetik rezonans görüntüleme çalışmalarında kaşıntının supraspinal işlenmesi ile ilgili önemli sonuçlara ulaşılmıştır. Gönüllü insanlara uygulanan histamin'in arterior singulat ve insular korteksi, premotor ve suplementer motor alanları, serebellumu, primer somatosensor korteksi ve talamusu koaktive ettiği görülmüştür. Bu bölgelerin hepsi, ağrının işlenmesinde de görev almaktadır. Bu sonuçları değerlendiren Paus ve ark. ağrı ve kaşınma için ayrı merkezlerin değil de farklı uyaranların önemli rolleri olacağını vurgulamıştır (20). Mochizuku ve ark. ağrının işlenmesinde önemli olan periakuaduktal gri madenin, sadece ağrıyı ve kaşıntıyı meydana getiren uyaranlar aynı anda verildiğinde uyarıldığını görmüşler ve bundan dolayı PAG'ın kaşıntının modülasyonunda rolünün önemli olduğunu belirtmişlerdir (21).

Omurilikte, kaşıntı ve ağrının algılanmasında büyük bir öneme sahip olan gastrin-serbestleyici peptid reseptörü (GRPR) bulunmaktadır. Kaşıntının oluşumunda büyük öneme sahip olan histamin üzerinde sık çalışmalar yapılan bir maddedir. Derideki mast hücreler tarafından salgılanan histamin ile oluşan kaşıntı, antihistaminikler tarafından engellenmektedir. Fakat bazı durumlarda birtakım kaşıntı türleri antihistaminikler tarafından engellenememektedir. Bu durum histamin'in bağımsız yollarının olduğunu göstermiştir. Örneğin, klorokin adlı ilacın en önemli yan etkisi kaşıntı'dır ve bu durum antihistaminik ilaçlar ile ortadan kalkmamaktadır. Fareler üzerinde yapılan araştırmalarda klorokin hemen kaşıntı oluşturmuştur. Bu farelerde GRPR taşıyan nöronlar intratekal uygulanan bombesin ile harap edildiğinde kaşınma davranışının azaldığı belirlenmiştir. Bu veri, kaşıntının farklı sinirsel yolaklar ile iletildiğini desteklemektedir (22).

Ağrı ve kaşıntı antagonist bir ilişkiye sahiptir. Ağrı reseptörleri uyarıldığı zaman kaşıntı oluşmamaktadır. Aslında, kaşınmanın kendisi de ağrı oluşturup kaşıntıyı ortadan kaldırmaya yönelik bir motor aktivite olabilir. Ağrıyı oluşturan birtakım uyaranlar ağrı yolaklarını, omuriliği ve merkezi sinir sistemini aktive eder ve kaşıntı

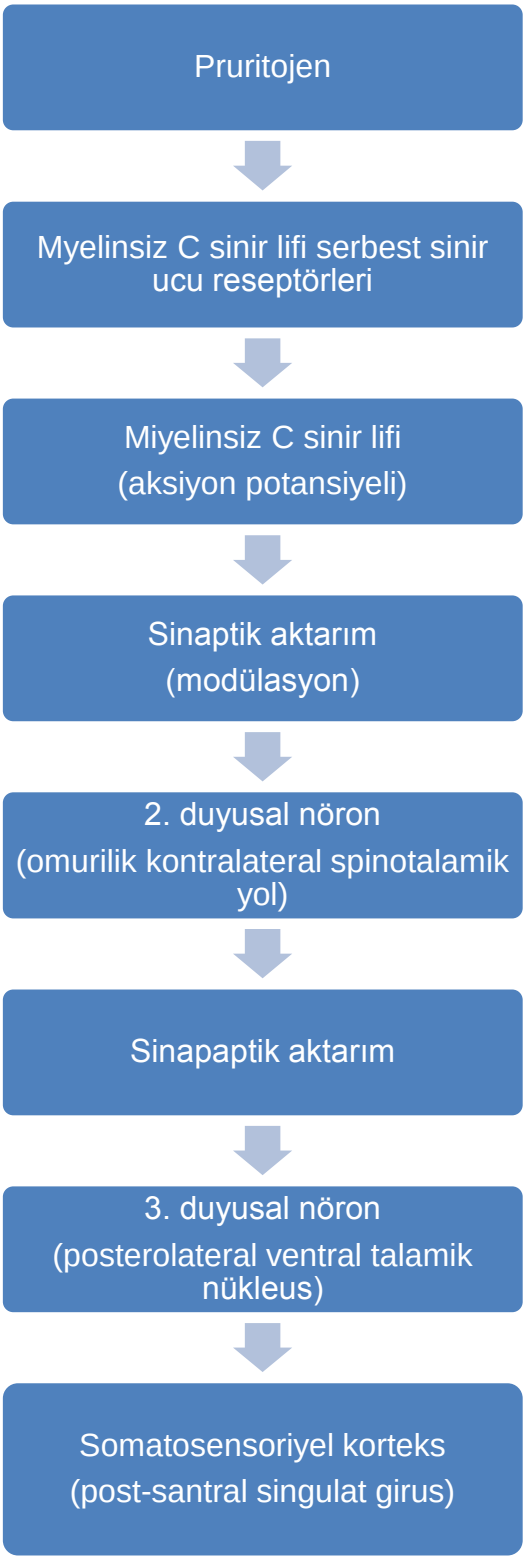
önlenir. Yapılan deneysel çalışmalarda histamin ile kaşıntı oluşturulmuş ve kişiye analjezi uygulanmıştır. Deneyin sonunda kaşıntı şiddetinin anlamlı bir şekilde arttığı gözlenmiştir (23).

KAŞINTININ İLETİM TEORİSİ

Kaşıntının iletimiyle ilgili çeşitli teoriler bulunmaktadır; bu teorilerden 4 tanesi ağırlık kazanmış durumdadır. Yoğunluk teorisi (intensity theory)'ne göre; deride az sayıda ağrı reseptörü (nosiseptör) uyarılırsa bu durum kaşıntı olarak algılanır fakat çok sayıda ağrı reseptörü uyarılırsa ağrı olarak algılanır. Bu teoride önemli olan uyarılan nosiseptör sayısıdır. Diğer bir teori ise spesifite teorisi (specificity theory) olarak bilinen teoridir. Yalnızca kaşıntıya özel afferent nöronların var olduğunu kabul eder. Seçicilik teorisinde (selectivity theory) ise kaşıntıdan sorumlu santral nöronları harekete geçiren nosiseptif afferent alt grubunun olduğu savunulur. Üzerinde durulan 4. teori ise diğer duyuları iletebilen kütanoz afferentlerde zamansal veya uzaysal deşarj kalıplarının kaşıntı hissini tespit ettiği patern teorisidir (the pattern theory) (24).

KAŞINTI YOLAKLARI

Pruritojen etkili maddelerin salıverilmesini takiben miyelinsiz C sinir liflerinin serbest sinir uçlarında bulunan çeşitli reseptörler uyarılır. Önce reseptör potansiyeli, ardından aksiyon potansiyeli oluşur. Miyelinsiz C lifi boyunca ilerleyen aksiyon potansiyeli omurilik arka kökünde kontralateral spinotalamik yolak üzerinden yukarı çıkan ikinci duyusal nörona aktarılır. Bu aktarım sırasında uyarı çeşitli ara nöronlar ile modüle edilebilir. İkinci duyusal nöronla posterolateral ventral talamik nükleuslara taşınan uyarı burada üçüncü duyusal nörona aktarılır. Son olarak üçüncü duyusal nöron, uyarının kaşıntı olarak algılanacağı yer olan somatosensoriyel kortekste yerleşen nöronlarla sinaps yapar (Şekil 1) (25).



Şekil 1. Kaşıntı yolakları

KAŞINTININ BİYOLOJİK MEDİYATÖRLERİ

Serbest sinir uçlarının uyarılması yoluyla kaşıntı davranışını tetikleyen birçok madde mevcuttur. İnsan ve diğer memelilerde kaşıntı oluşumuna yol açan maddeler aynı veya farklı olabilirler.

Histamin

Histamin üzerinde en çok çalışılan pruritojen'dir (14). Histamin su ve alkol içinde çözünebilir, nörotransmitter ekisi vardır. Düz kasların kasılması, santral sinir sisteminin düzenlenmesi gibi birçok fizyolojik olayda rol alır. Histamin'in büyük bir çoğunluğu bazofil ve mast hücrelerinden sentezlenir (12). Histamin reseptörü G-protein bağlı reseptör ailesindendir ve bilinen 4 alt tipi vardır. Bunlar H_1, H_2, H_3 ve H_4 reseptörü olarak adlandırılır. Dorsal kök gangliyon nöronlarında H_1, H_3 ve H_4 reseptörlerinin lokalize olduğu gösterilmiştir (14). H_1 reseptörüne bağlanan histamin spesifik C-sinir liflerini uyarır (12). Deri içi enjeksiyon yoluyla uygulanan histamin ağrı hissini uyandırmaz iken yoğun kaşıntıya neden olur (14).

Esas olarak H_1 reseptörü insanlarda kaşıntı oluşumundan sorumludur. H_2 reseptörleri ise küçük bir role sahiptir. Fareler üzerinde yapılan deneysel kaşıntıda H_1 ve H_4 reseptörlerinin aracılık ettiği gözlenmiştir. Yapılan araştırmalarda farelerde H_3 reseptörünün aktive olması pruritojen ile uyarılmış kaşıntı davranışını azaltmış, H_3 reseptör antagonizması ise kaşıntı davranışına sebep olduğu gözlemlenmiştir. Histamin kaynaklı kaşıntılar $TRPV_1$ (vaniloid reseptör-1) aktivasyonuna da bağlı olabilirler (14).

Serotonin (5-HT)

5-hidroksitriptamin (5-HT), serotonin olarak bilinmektedir; insanlarda kaşıntıya neden olan endojen biyojenik amindir. İnsanlarda serotonin ile oluşan kaşıntı hissi, histamin ile oluşan kaşıntı hissinden daha zayıf hissedilir (14). Ancak atopik dermatit'li insanlarda olduğu gibi lezyonlu ciltte serotonin, histamin'e göre daha güçlü bir kaşıntı oluşturur (14,26). Atopik dermatit hastalığının erken evrelerinde serotonin trombositlerden salıverilir ve iltihaplanmaya yol açar (26).Farelerde histamine göre daha fazla kaşıntı oluşturur (27).

Asetilkolin

Sağlıklı gönüllülere uygulanan intradermal (i.d) asetilkolin enjeksiyonu ağrıya neden olurken, atopik dermatit'li ciltte kaşıntıya yol açmıştır (14,28,29). Atopik dermatit'li hastaların ciltlerinde sağlıklı kişilere göre yaklaşık 10 kat daha fazla asetilkolin konsantrasyonu olduğu gözlemlenmiştir (14). Asetilkolin'in bir diğer önemli özelliği ise otonom sinir sisteminde önemli bir nörotransmitter olmasıdır; etkisini muskarinik ve nikotinik reseptörlere bağlanarak gösterir (29).

P maddesi

P maddesi (*substance P* [SP]), kütanoz nosiseptif sinirlerde büyük ölçüde bulunan bir nöropeptid'dir. SP sinir sistemi dışında derideki mast hücrelerinde lokalizedir ve alerjik inflamasyon durumlarında rol oynamaktadır (14). Yapılan çalışmalarda SP'nin hem sağlıklı insanlarda hem de atopik dermatit'li hastalarda kaşıntı oluşturduğu gözlemlenmiştir (26). İnsanlarda SP ile uyarılan kaşıntı mekanizmasının altında yatan neden histamin'in mast hücrelerinden salıverilmesidir (14, 30). Sağlıklı ve lezyonlu deride H_1 reseptör antagonistleri histamin ve SP'nin salıverilmesini baskılar (31). SP aynı zamanda farelerde de kaşıntı oluşturur, fakat insanlarda olduğu gibi histamin reseptör antagonistleri tarafından inhibe edilemez. SP nörokinin-1 (NK_1) reseptörünü aktive eder. Seçici bir NK_1 reseptör antagonisti olan aprepitant bir hafta oral yolla verildiğinde kronik kaşıntısı olan hastalarda kaşıntıyı hafifletmiştir. Aynı zamanda malignite ile ilişkili kaşıntı tedavisinde de etkili olmuştur (14,32).

Lökotrienler

Lökotrienler insanlarda kaşıntıya neden olurlar (33). Lökortrien B_4 (LTB_4) güçlü bir pruritojen'dir. Atopik dermatit, sedef hastalığı gibi kaşıntılı hastalıklarda lezyonlu deride LTB_4 seviyesinin artmış olduğu gözlemlenmiştir (34). LTB_4ve sistein-lökotrienler intradermal olarak uygulandığında ciltte kaşıntı ile birlikte görülen lokal inflamatuvar reaksiyona yol açar. Fareler üzerinde yapılan çalışmalarda deri içine lökotrien B_4 uygulanmış ve kaşıntı oluşturulmuştur; LTB_4 reseptör antagonistlerinin ise kaşıntıyı engellendikleri belirlenmiştir. (14). SP maddesinin rol aldığı kaşıntının önlenmesinde LTB_4 reseptör antagonistleri ve 5-lipoksijenaz inhibitörleri antipruritik olarak kullanılmaktadır (34).

Bradikinin

İntradermal yolla bradikinin'in uygulanması insanlarda ağrıya yol açmaktadır. Ağrının kesilmesinden sonra hissedilen bir kaşıntı oluşur (35). Lezyonlu ciltte ağrı zayıf olur ve kaşıntı güçlü hissedilir (26). Ayrıca bradikinin mast hücrelerinden histamin salıverilmesini de uyarır (23).

Opioidler

Üç ana opioid reseptörü vardır; bunlar μ (mü), δ (delta), K (kappa) reseptörleridir. Morfin en iyi bilinen μ opioid reseptöragonisti'dir (6). Morfin tedavisi sırasında oluşan kaşıntı iyi bilinen bir yan etkidir. Terapötik dozlarda kullanılan morfin mast hücre degranülasyonuna yol açmadığı için bu kaşıntının temelinde santral mekanizmaların yol oynadığı düşünülmüştür. Ancak morfin'in intradermal uygulanması kaşıntıya yol açar ve bu kaşıntı H_1 reseptör antagonistleriyle tam olarak önlenebilirken μ opioid reseptör antagonisti olan nalokson ile kısmi olarak önlenir. Bu verilerden yola çıkıldığında morfin'in kaşıntı oluşturucu etkisine hem santral hem de periferik mekanizmaların aracılık ettiği düşünülmektedir. İntraspinal morfin uygulamalarında segmentel kaşıntı oluşmaktadır. Üremi ve kolestaz ile ilişkili kaşıntıların tedavisinde μ-reseptör antagonistleri nalokson ve naltrekson'un etkili olduğu görülmüştür (36).

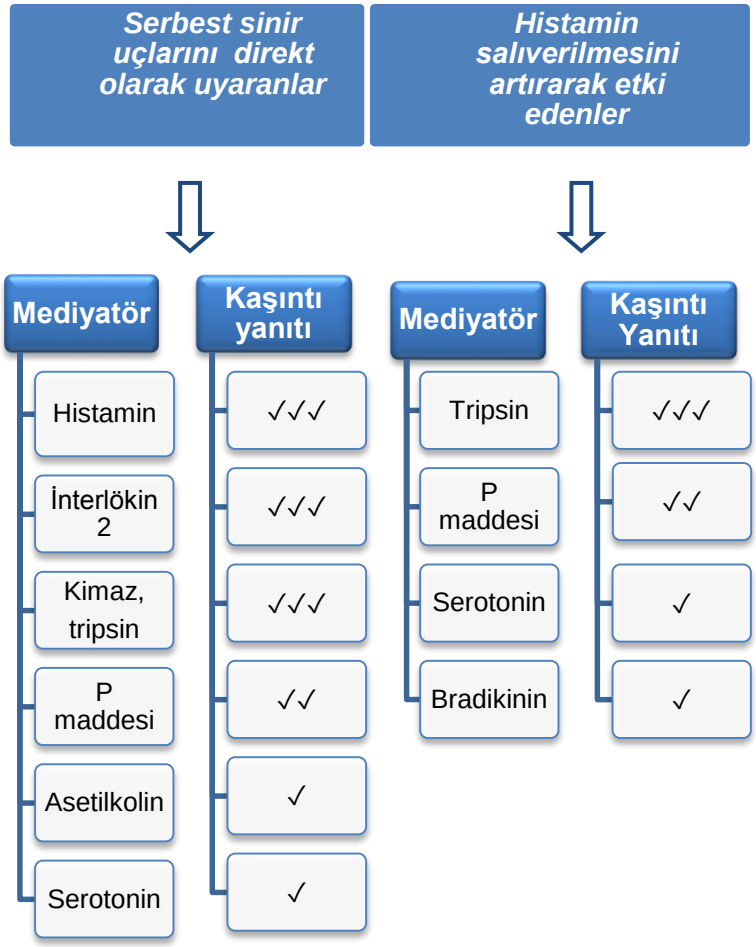
İnterlökinler

İnterlökin 31 (IL-31) hem iltihap oluşumunda hemde kaşıntıda rol oynayan bir sitokin'dir. Atopik dermatit'li fare modelinde anti IL-31antikorlarının uygulanması sonucunda kaşıntının azaldığı görülmüştür. IL-31onkostatin M reseptörüne ve IL-31 reseptörüne bağlanmaktadır. Ancak kaşıntı yapıcı etkisinin reseptörler üzerinden ya da dolaylı olarak keratinositler üzerinden olup olmadığı bilinmemektedir (36). Atopik dermatit ve prurigo nodularis gibi deri hastalıklarında insanlarda IL-31'in ciltte yüksek seviyede olduğu gösterilmiştir (36,37). IL-31atopik dermatit'de görülen kaşıntı tedavisinde yeni bir yaklaşım olabilir. İnterlökin 2 (IL-2) aktive edilmiş T lenfositleri tarafından üretilir. IL-2'nin intradermal enjeksiyonu ile kaşıntı yanıtının uyarıldığı gözlemlenmiştir. Prurigo nodülaris hastalığında deride ayrıca interlökin 6 seviyesinin de yüksek olduğu gösterilmiştir. İnterlökin 8'in kaşıntıdaki rolü ise belirsizdir (36).

Proteazlar

Tripsin ve triptaz gibi endojen proteazlar insanlarda kaşıntıya neden olurlar. Benzer şekilde deney hayvanlarında da tripsin, triptaz ve diğer proteazların enjeksiyonu kaşıntıya sebep olur. Proteazların kaşıntıya proteazla aktive edilmiş reseptörleri (PAR) uyararak yol açtığı gösterilmiştir (14). Bitki kaynaklı sistein proteazı papinin deriye uygulanması PAR2 ve PAR4 reseptörlerini uyarır ve kaşıntı oluşturur. Dört tip PAR reseptörü tanımlanmıştır ve bunlar PAR1-4 olarak adlandırılmıştır ve G proteinine bağlı reseptörlerdir (38). PAR2'nin kaşıntıda daha fazla rol oynadığı belirlenmiştir (39). Hamam böceklerinde ve toz akarlarında bulunan proteazların PAR2'yi aktive ettiği gözlemlenmiştir; birçok allerjen PAR'ları aktive eden proteazlar içermektedir (14,40).

Bazı mediyatörler yerel mast hücrelerinde histamin salıverilmesine neden olarak yada ilgili serbest sinir uçlarını uyararak kaşıntı oluştururlar (Şekil 2) (12,25).

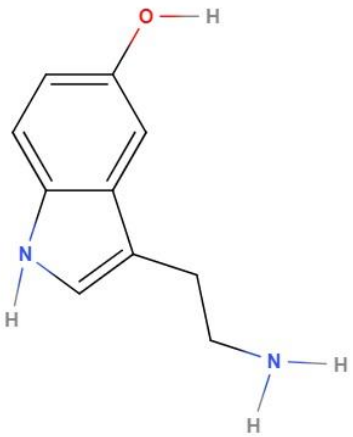


Şekil 2. Bazı mediyatörlerin intradermal enjeksiyonunun tetiklediği kaşıntı yanıtı.

SEROTONİN

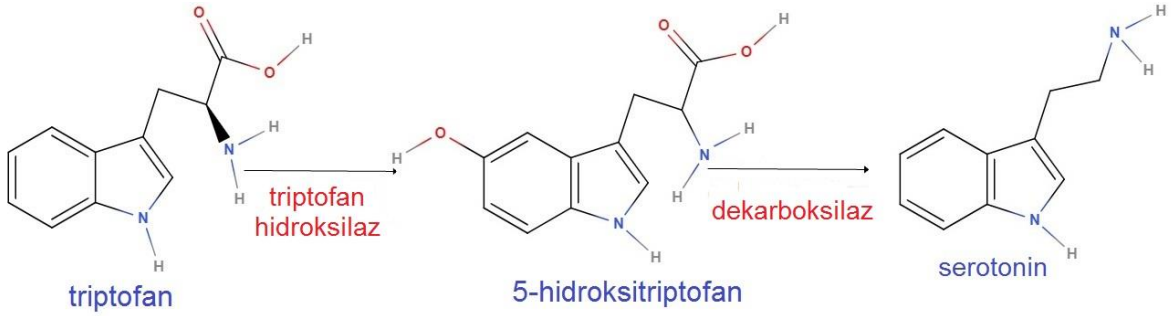
1948 yılında sığır kanında vazokonstrüktör etkili bir madde tespit edilmiştir. Elde edilen bu maddeye Green ve Page (41) tarafından serotonin (5-hidroksitriptamin, 5-HT) adı verilmiştir. Serotonin'in moleküler yapısı ise 1949'da keşfedilmiştir (Şekil 3) (42). Serotonin omurgalılarda, omurgasızlarda, bitkilerde ve bakterilerde bulunmaktadır (43,44). Serotonin ve serotonin reseptörleri birçok organ sisteminde rol oynamaktadır; kardiyovasküler, pulmoner, genitoüriner, gastrointestinal ve santral sinir sistemi üzerinde önemli etkileri vardır. Serotonin önemli bir nörotransmitterdir (43,45). Mutluluk hormonu olarak da adlandırılmaktadır (12). Serotonin reseptörlerine etki eden ilaçlar psikiyatride yaygın olarak kullanılmaktadır. Serotonin'in duygu, algı, ödül, öfke, saldırganlık, iştah, bellek, cinsellik ve dikkat gibi fonksiyonlar üzerinde etkili olduğu bilinmektedir (43). Serotonin metobolizmasında meydana gelen değişimlerin depresyon, anksiyete bozukluğu, hipertansiyon, irritabl bağırsak sendromu gibi çeşitli hastalıkların etyolojisinde rol oynadığı gösterilmiştir (44).

Serotonin bir amino asit olan triptofan'dan üretilir. Besinlerle alınan triptofan miktarı yaklaşık olarak günlük 0,5-1 gr kadardır. Bunun %2'den az bir kısmı serotonin'e dönüştürülür. İnsanlarda günlük serotonin üretimi yaklaşık 10 mg civarındadır (44).



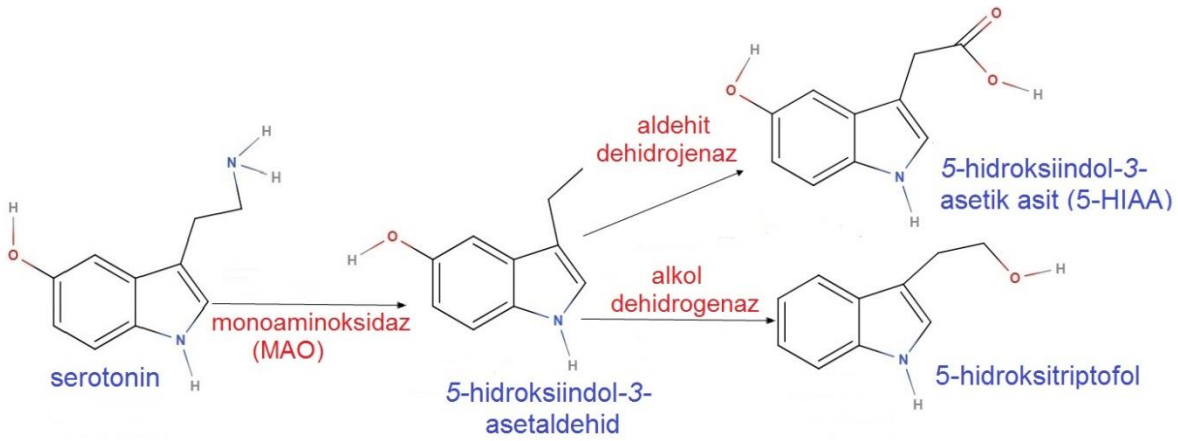
Şekil 3. Serotonin (5-hidroksitriptamin)

Serotonin triptofan aminoasit'inden sentezlenir. Triptofan hidroksilaz enzimi tarafından 5-hidroksitriptofan'a dönüştürülür, daha sonra *5*-hidroksitriptofan,*L*-aromatik amino asit dekarboksilaz aracılığı ile serotonin'e dönüştürülür (Şekil 4).



Şekil 4. Serotonin sentez şeması

Görevi sona eren serotonin monoaminoksidaz enzimiyle yıkılır ve bunun sonucunda *5*-hidroksiindol-*3*-asetaldehid oluşur. *5*-hidroksiindol-*3*-asetaldehid, aldehit dehidrojenaz enzimi tarafından yıkılarak *5*-hidroksiindol-*3*-asetik asit (5-HIAA)'e veya alkol dehidrogenaz enzimiyle 5-hidroksitriptofol'e dönüşür ve idrar ile vücuttan atılır (Şekil 5).



Şekil 5. Serotonin metabolizması

Serotonin'in etkilerini serotonin reseptörleri aracılığıyla oluşturmaktadır ve bu reseptörler 7 grup altında toplanmışlardır. Santral sinir sisteminde beyin sapının ortasında yer alan rafe *(raphe)* nükleusu'ndaki nöronlarda sentezlenir ve beyinde birçok fonksiyonda rol alır (44). Beyinde bulunan 5-HT_{1A} reseptörü kaygı duygusunu, 5-HT_2 canksiyete, iştah, enerji dengesini düzenler, 5-HT_{1B} reseptörü ise serebral kan damarlarında vazodilatasyona sebep olur. Santral sinir sistemi dışında da sayısız

etkileri vardır; kardiyovasküler sistemde sinüs düğümü ve atriyoventiküler düğümün çalışmasında rol alır. 5-HT_{2B} reseptörü akciğerlerde solunumu ve pulmoner kan basıncını düzenler, kardiyak kapak işlevinde önemli rol oynar. Serotonin gastrointestinal sistemde bağırsak hareketleri, pankreas salgısı ve kolon tonusunu düzenler. 5-HT_{2C} reseptörleri glikoz dengesini düzenler. İrritabl bağırsak sendorumunda 5-HT_3 ve 5-HT_4 reseptörleri etkilidir. 5-HT_{2A} trombosit agresyonunu kolaylaştırır (43). Bazı ilaçlar serotonin'in nörotransmisyonunu modüle ederler. Seçici serotonin reuptake inhibitörleri (SSRIs), trisiklik antidepresanlar (TCA), 5-HT_3 reseptör antagonistleri (ör, ondansetran), halüsinojenler gibi ilaçlar serotonin'in geri alınımını azaltırlar, 5-HT_{2A} reseptör antagonistleri vazospastik anjina'da etkilidirler (43). Serotonin geri alım inhibitörü olan milnasipran intratekal enjeksiyon yolu ile uygulanmış ve serotonin ile oluşturulan kaşıntıyı anlamlı bir şekilde azalttığı gözlemlenmiştir (46). Kaşıntı tedavisinde serotonin antagonistleri bir alternatif olabilirler (45).

Serotoninin kaşıntıdan sorumlu olduğu bilinmektedir ve serotonerjik reseptörlerin melanositlerde, keratinositlerde ve dermal fibrolastlarda bulunduğu literatürde mevcuttur (14,47,48). Melanosit hücrelerinde 5-HT_{1A}, egzamalı ciltlerin lenfositlerinde 5-HT_{2A}, serbest sinir uçlarında ise 5-HT_3 reseptörleri bulunmaktadır (45,49). Serotonin deride 5-HT_3 reseptörüne bağlanarak kaşıntı oluşturmaktadır (12). Serotonin reseptörleri ve bulundukları yerler Tablo 2'de gösterilmiştir (50-53). Fizyolojik fonksiyonu en az bilinen 5-HT_{5A} ve 5-HT_{5B} reseptörleridir (53).

Tablo 1. Serotonin reseptörleri, dağılımları ve işlevleri

Reseptörler	Bulunduğu Yerler	Etkileri
5-HT_{1A}	Rafe çekirdeği Korteks Hipokampus	Ağrı oluşumu
5-HT_{1B}	Subtantia nigra Globus pallidus	Lokomosyon Mizaç
5-HT_{1D}	Kranial kan damarları Globus pallidus Subtantia nigra	Vazokontriksiyon

Tablo 1 (devamı). Serotonin reseptörleri, dağılımları ve işlevleri

5-HT$_{1E}$	Korteks Putamen Hipokampus	
5-HT$_{1F}$	Korteks Hipokampus	
5HT$_{1P}$	Enterik sinir sistemi	
5-HT$_{2A}$	Serebral korteks Trombositler Düz kaslar	Nöronal uyarılma Agresyon Kasılma
5-HT$_{2B}$	Mide fundusu	Kasılma
5-HT$_{2C}$	Koroid pleksus Hipokampus Substantia nigra	Nöronal eksitasyon
5-HT$_{3}$	Area postrema bölgesi Duyu ve enterik sinirler	Anksiyete Kusma
5-HT$_{4}$	Santral sinir sistemi nöronları Enterik sinir sistemi nöronları Düz kaslar	Nöronal eksitasyon
5-HT$_{5A,B}$	Beyin	Antinosiseptif etki
5-HT$_{6,7}$	Beyin	Bilinmiyor

ENDOKANNABİNOİD SİSTEM

Endokannabinoid sistem sinaptik plastisitede, endojen ve çevresel uyarılara verilen tepkilerde ve merkezi sinir sisteminin gelişiminde önemli rol üstlenen nöromodülatör bir sistemdir. ECS; endojen kannabinoidler (endokannabinoidler), bunların sentezi ve metabolizmasından sorumlu enzimler ve kannabinoid reseptörlerinden meydana gelmektedir (54). Kannabinoidler, kannabinoid reseptörlerinin aktive edilmesi sonucunda etkilerini gösterebilen bir grup kimyasal bileşiktir. Kannabis (esrar) bitkisinde bulunan fitokannabinoidler, sentetik

kannabinoidler ve endojen kannabinoidler bu bileşiklerin içinde sayılmaktadır (55,56). Δ9-tetrahidrokannabinol (THC) ve kannabidiol kannabis bitkisinin önemli bileşenleridir (55,57). Çok güçlü analjezik etkileri vardır. Marihuana olarak da anılan kannabis bitkisi bin yılı aşkın bir süre ağrı tedavisinde kullanılmıştır (55). Kannabinoidlerin istenmeyen yan etkileri (bağımlılık, katalepsi, lokomotor aktivitede azalma ve hipotermi) vardır. Bu durum etkin bir şekilde kullanımlarını engellemiştir (8). Kannabinoidlerin fizyolojik rolü anlaşıldıkça, hafıza, kardiyovasküler fonksiyon, bellek, üreme, motor kontrolü ve bağışıklık üzerindeki fonksiyonları da daha iyi anlaşılır hale gelmiştir (58). Kannabinoid 1 (CB_1) ve kannabinoid 2 (CB_2) olarak adlandırılan iki tip kannabinoid reseptörü tanımlanmıştır. Kannabinoid reseptörleri G proteinine bağlı reseptörler ailesindendir (59). CB_1 reseptörleri bazal gangliyonlarda yoğun olarak bulunmaktadır, aynı zamanda hipokampus, korteks, beyincik ve periferik sinir sisteminde de mevcuttur (60). CB_2 reseptörleri vücutta sınırlı bir dağılım göstermektedir; genellikle bağışıklık sistemde özellikle de dalakta yoğun olarak bulunmaktadır (55,57). CB_1 reseptörü adenilat siklaz inhibisyonu yaparak genellikle nörotransmitterlerin salıverilmesinde aracı olmaktadır (55).

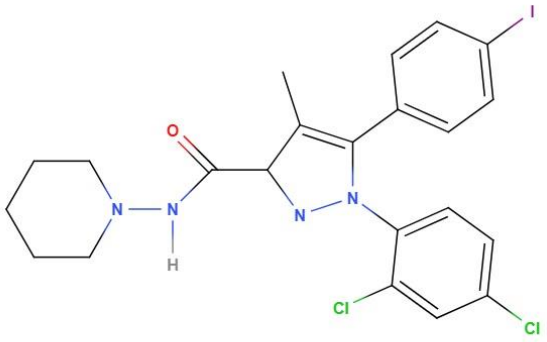
THC ve kannabidiol içeren bitkisel kenevir özü olan nabiksimol *(nabiximols)* multipl skleroz ve kanser hastalarında oluşan nöropatik ağrı tedavisi için onay almıştır. Sentetik bir THC olan dronabinol ve analoğu olan nabilon uzun yıllar boyunca Kanada ve ABD'de kemoterapinin neden olduğu emezis tedavisi için kullanılmıştır ve ayrıca nabilon AIDS ile ilişkili kilo kaybı içinde kullanılmaktadır. Fitokannabinoidler gibi endokannabinoidler ile sentetik kannabinoidler de CB_1 reseptörleri üzerinden antinosiseptif etkilerini gösterirler. İntrinsik nöronlar, presinaptik afferent terminaller ve afferent supraspinal nöronların terminallerinde bulunan CB_1 reseptörlerininspinal seviyede antinosiseptif etkiye aracılık ettiği bilinmektedir (55).

Yapılan deneysel çalışmalarda kannabinoidlerin antipruritik etkileri olduğu gözlemlenmiştir (61). Epidermis'te kannabinoid CB_1 ve CB_2 reseptörleri yer alır. Son yıllarda yapılan araştırmalarda bir kannabinoid reseptör agonistinin histaminin neden olduğu kaşıntıyı önlediği gözlemlenmiştir (62). Topikal olarak uygulanan kannabinoidler kaşıntıyı azaltan etkiye sahiptirler. Örneğin; N-palmitoletanolamin (PEA) bir kannabinoid reseptör agonistidir. Üremik kaşıntı ve atopik egzeması olan hastalarda kaşıntıyı azaltmaktadır. PEA, ayrıca FAAH enzimini inhibe eder ve bir endokannabinoid olan AEA'nın etkisini arttırır. Bu yolla da kaşıntı hissini azaltır (62).

Endokannabinoidler araşidonik asit türevidir. Üzerinde en çok çalışma yapılanı AEA'dir (56). AEA 1992'de domuz beyninde keşfedilmiştir ve daha sonraki yıllarda da CB_1 reseptörüne bağlandığı tespit edilmiştir. AEA bilinen ilk endokannabinoid'dir; keşfinden 3 yıl sonra araşidonik asit türevi, ester yapıdaki diğer önemli bir endokannabinoid olan 2-araşidonil gliserol (2-AG) keşfedilmiştir. Endokannabinoidlerin önemli bir özelliği zıt yönde (retrograde) sinyal iletimi yapmalarıdır; yani post-sinaptik terminallerde sentezlenip pre-sinaptik terminallerde bulunan reseptörler aracılığı ile nöromodülatör etki gösterirler. AEA in vivo olarak membran fosfolipidlerinden sentezlenmektedir. FAAH tarafından yağ asidi ve etanolamin'e hidroliz olur. FAAH enzimi hipokampus, serebellum ve amigdala'da post-sinaptik terminallerde bulunur. 2-AG ise diaçilgliserol lipaz enzimi aracılığıyla diaçilgliserol'den sentezlenir. Hidrolizinden MAGL enzimi sorumludur. MAGL enzimi ile 2-AG araşidonik asit ve gliserol'e yıkılır (60). Endokannabinoidlerin yıkımından sorumlu olan FAAH ve MAGL enzimlerini inhibe eden maddeler anti-inflamatuvar ve ağrı kesici yeni ilaçların geliştirilmesinde hedef olabilirler (63).

AM 251

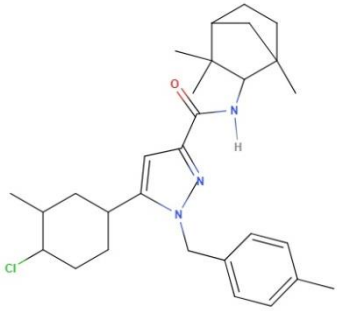
AM 251 [N-(piperidin-1-il)-5-(4-iyodofenil)-1(2,4-diklorofenil)-4-metil-1H-pirazol-3-karboksamid] CB_1 reseptörlerinin selektif antagonistidir (Şekil 6) (64,65). Molekül formülü $C_{22}H_{21}Cl_2IN_4O$'dur. Yapısı SR 141716 (rimonabant)'ya benzemektedir ve CB_1 reseptörüne bağlanma afinitesi SR 141716'ya göre daha fazladır (65).



Şekil 6. AM 251

SR 144528

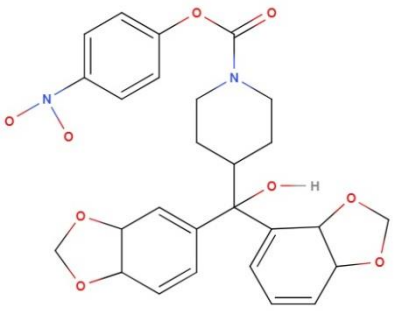
SR 144528 (5-(4-Kloro-3-metilfenil)-1-[(4-metilfenil)metil]-*N*-[(1*S*,2*S*,4*R*)-1,3,3-trimetilbisiklo [2.2.1]hept-2-il]-1*H*-pirazol-3-karboksamid) ilk potent ve selektif CB_2 reseptör antagonistidir (Şekil 7). SR-144528; klonlanmış insan CB_2 reseptörü için CB_1 reseptörüne göre 700 kat daha fazla afinite göstermektedir. Yapılan çalışmalarda 70'in üzerinde reseptör, iyon kanalı ve enzim ile etkileşimi incelenmiş SR-144528'in herhangi birine afinite göstermediği belirlenmiştir. SR-144528'in aslında bir ters agonist olduğu daha sonraları belirlenmiştir (66).



Şekil 7. SR 144528

JZL 184

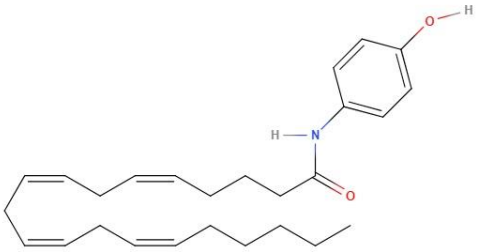
4-nitrofenil 4-[bis (1,3-benzodioksol-5-il) (hidroksi) metil] piperidin-1-karboksilat (JZL184) güçlü bir MAGL inhibitördür (Şekil 8) (67,68). JZL 184'ün nosiseptif yanıtları azalttığı bilinmektedir (67). JZL 184 ile tedavi edilen farelerde katalepsi görülmemiştir (68). Kaşıntının eşlik ettiği hastalıklarda JZL 184'ün tedavi amaçlı olarak periferik veya santral olarak kullanılması ilerleyen zamanlarda mümkün olabilir (69).



Şekil 8. JZL 184

AM 404

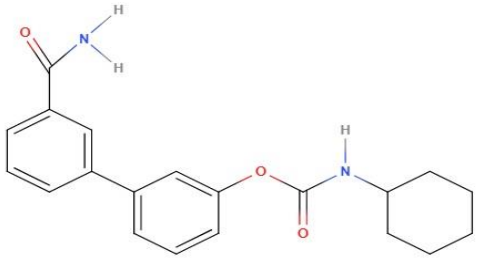
AM 404[N-(4-hidroksifenil)-arachidonylethanolamide] (Şekil 9) endokannabinoid uptake inhibitörüdür. Kannabinoidlerin etkilerini arttırır (70). AM 404'ün anti-allodinik etkileri olduğu literatürde belirtilmiştir (71). Asetaminofen in vivo olarak AM 404'e metabolize olur ve AM 404'ün asetaminofen'in analjezik ve antipretik etkilerine katkıda bulunduğu kabul edilir. Sıçanlar üzerinde yapılan çalışmalarda AM 404'ün anlamlı bir şekilde hipotermi yaptığı gösterilmiştir (70,72).



Şekil 9. AM 404

URB 597

URB 597 (sikloheksil karbamik)asit 3-karbamoil-bifenil-3-il ester) (Şekil 10) FAAH inhibitörüdür (7,73,74). URB 597 ağrıyı etkili bir şekilde azaltmaktadır (74). Yapılan deneysel çalışmalarda URB597'nin kaşıntıyı azalttığı da gösterilmiştir. Sıçanlarda serotonin ile kaşıntı oluşturulmuş ve URB 597 ve JZL 184'ün kaşıntıyı önlediği belirtilmiştir ve ayrıca CB_1 reseptörü olmayan farelerde 48/80 ile kaşıntı oluşturulmuş URB 597 ile kaşıntı hafifletilmiştir (75).



Şekil 10. URB 597

GEREÇ VE YÖNTEMLER

Bu çalışma için Trakya Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul onayı alınmış olup (Ek-1), çalışmamız Trakya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (TÜBAP-2012/187) tarafından desteklenmiştir.

DENEKLER

Çalışmamızda Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Birimi'nde üretilmiş olan, ortalama 20-30g ağırlığında 130 adet Balb/c dişi fare kullanıldı. Tüm denekler standart laboratuvar koşullarında (22±1 ^{o}C, %55 nem ve 12 saat aydınlık-karanlık siklusunda) barındırıldı. Beslenmeleri için standart fare yemi ve musluk suyu kullanıldı.

KULLANILAN İLAÇLAR

Serotonin (Tocris, Bristol, UK).

URB 597 (Cayman, Michigan, USA).

JZL 184 (Cayman, Michigan, USA).

AM 404 (Cayman, Michigan, USA).

AM 251 (Tocris, Bristol, UK).

SR 144528 (Cayman, Michigan, USA).

Çözücüler; serotonin serum fizyolojik (SF %0,9 NaCl) içinde, URB 597, JZL 184, AM 404, AM 251, SR144528 ise;%1 etanol + %1 Tween 80 + %20 DMSO + %78 serum fizyolojik (%9 NACL) içeren karışımda çözündürüldü.

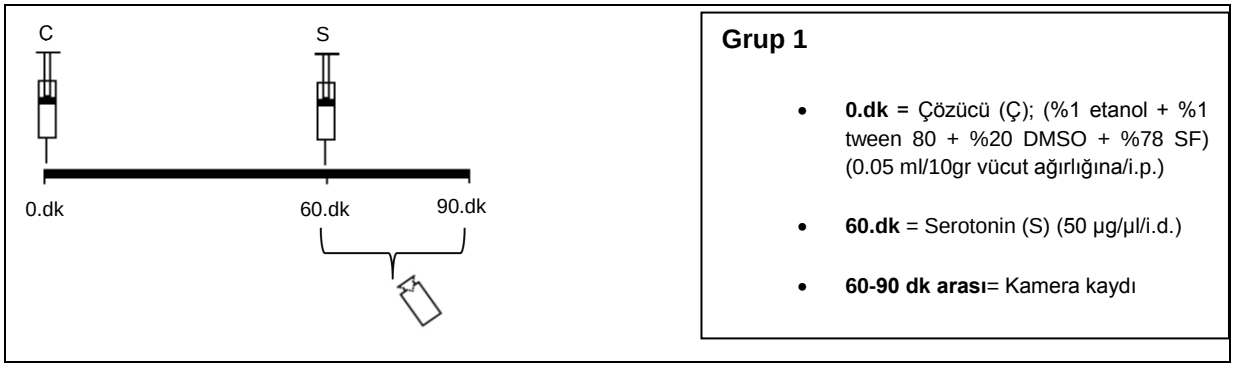
DENEY DÜZENEĞİ

Çalışmamızda toplam 130 adet Balb/c cinsi dişi fare kullanıldı. Her grupta 10 adet fare olmak üzere 13 grup oluşturuldu. Tüm farelerin boyun arka bölgelerindeki tüyler deneylere başlamadan 3 gün önce traş edildi (Şekil 11).

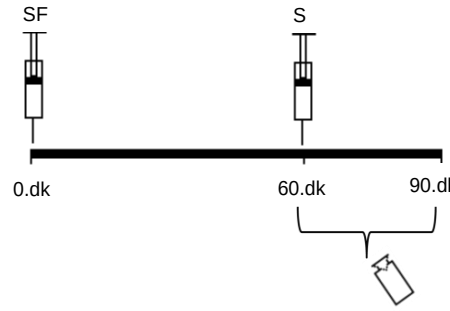
Farelere 0. dakikada enzim inhibitörü ilaçlar (URB 597, JZL184, AM 404) veya bu ilaçların hazırlanmasında kullanılan çözücü karışımı (%1 etanol + %1 Tween 80 + %20 DMSO + %78 serum fizyolojik) intraperitoneal (i.p) yolla uygulandı. 60. dakikada farelerin ense bölgesine kaşıntı oluşturan %0,5'lik serotonin (50 µg/µl/fare) hamilton enjektör ile intradermal (i.d.) yolla uygulandı ve hemen ardından 30 dakika boyunca farelerin arka ayakları ile ense bölgelerini kaşımaları kamera ile kayda alındı ve sonrasında kaşınmaları sayıldı. Kannabinoid CB_1 ve CB_2 reseptör antagonistleri enzim inhibitörü ilaçlardan 10 dk önce (-10.dk) i.p. yolla uygulandı (Tablo 2).

Bu deney metodu kaşıntı çalışmalarında dünyada sıkça kullanılan bir metod olup, hayvanlar için herhangi bir rahatsızlık teşkil etmemektedir. Çalışmamızda standart dışı bir uygulama ya da muamele yapılmamıştır. Aynı metod daha önceki çalışmalarda da kullanılmıştır (27,76).

Tablo 2.Deney grupları

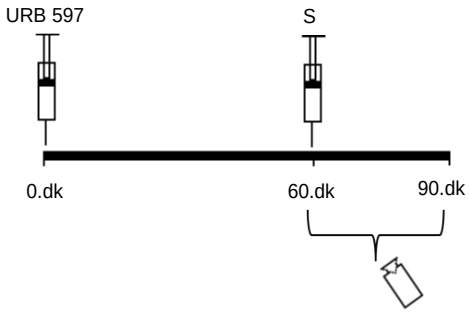


Tablo 2. (devamı) Deney grupları



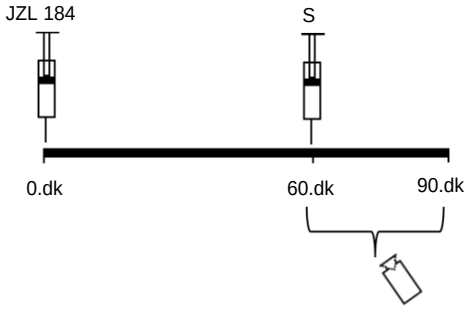
Grup 2

- **0.dk** = Serum fizyolojik (SF) (0.05 ml/10gr vücut ağırlığına/i.p.)
- **60.dk** = Serotonin (S) (50 µg/µl/ i.d.)
- **60-90 dk arası**= Kamera kaydı



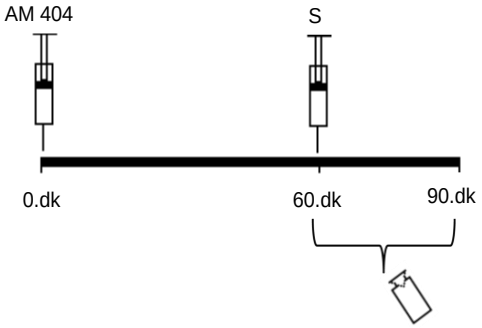
Grup 3

- **0.dk** = URB 597 (10 mg/kg/i.p.)
- **60.dk =** Serotonin (S) (50 µg/µl/ i.d.)
- **60-90 dk arası**= Kamera kaydı



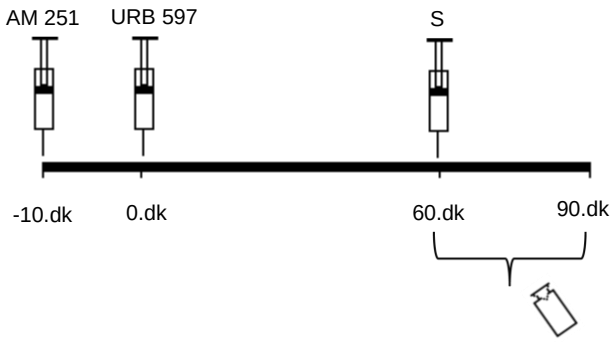
Grup 4

- **0.dk** = JZL 184 (16 mg/kg/ i.p.)
- **60.dk =** Serotonin (S) (50 µg/µl/ i.d.)
- **60-90 dk arası**= Kamera kaydı



Grup 5

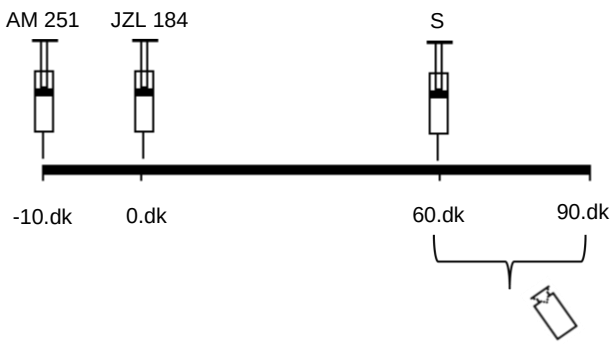
- **0.dk** = AM 404 (10 mg/kg/i.p.)
- **60.dk =** Serotonin (S) (50 µg/µl/ i.d.).
- **60-90 dk arası**= Kamera kaydı



Grup 6

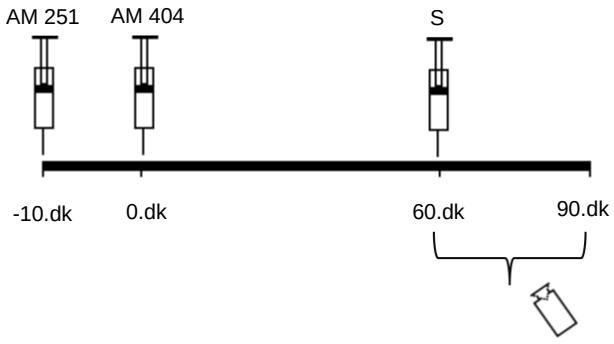
- **-10.dk** = AM 251 (1mg/kg/i.p.)
- **0.dk** = URB 597 (10 mg/kg/i.p.)
- **60.dk =** Serotonin (S) (50 µg/µl/i.d.)
- **60-90 dk arası** = Kamera kaydı

Tablo 2. (devamı) Deney grupları



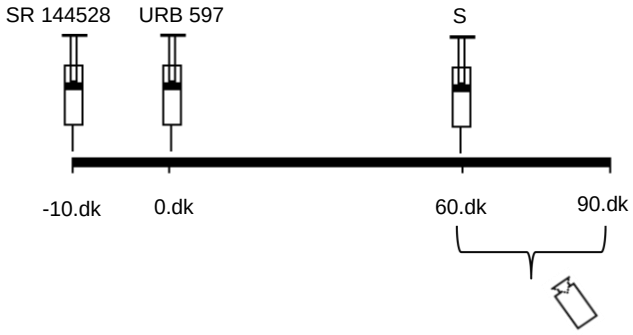
Grup 7

- **-10.dk** = AM 251 (1mg/kg/i.p.)
- **0.dk** = JZL 184 (16 mg/kg/ i.p.)
- **60.dk** = Serotonin (S) (50 µg/µl/ i.d.)
- **60-90 dk arası** = Kamera kaydı



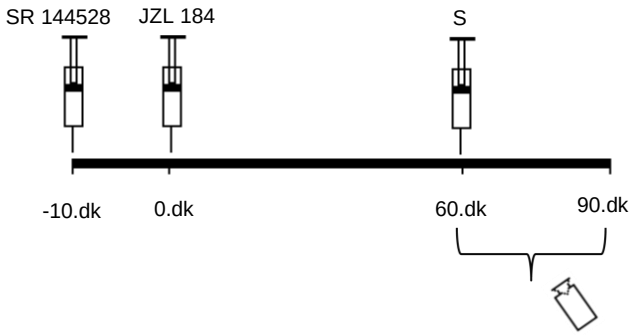
Grup 8

- **-10.dk** =AM 251 (1mg/kg/i.p.)
- **0.dk** = AM 404 (10 mg/kg/i.p.)
- **60.dk** = Serotonin (S) (50 µg/µl/ i.d.)
- **60-90 dk arası** = Kamera kaydı



Grup 9

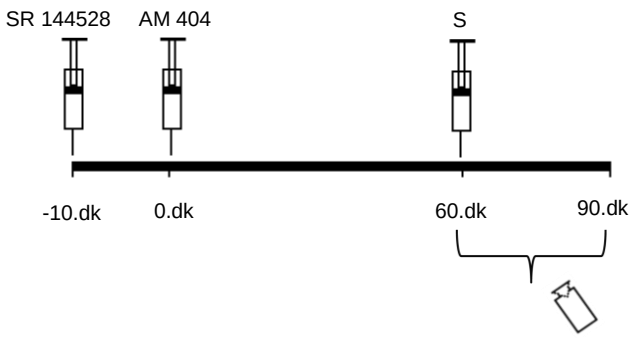
- **-10.dk** = (SR 144528 (1mg/kg/i.p.)
- **0.dk** = URB 597 (10 mg/kg/i.p.)
- **60.dk** = Serotonin (S) (50 µg/µl/ i.d.)
- **60-90 dk arası** = Kamera kaydı



Grup 10

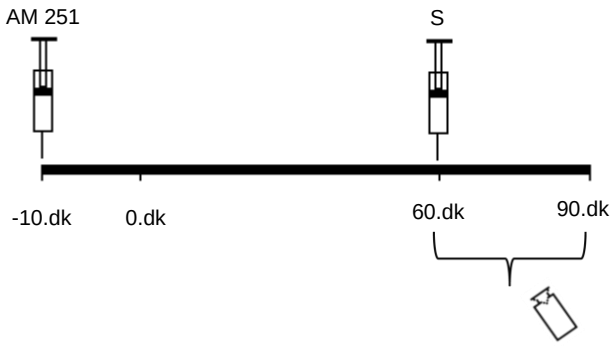
- **-10.dk** = (SR 144528 (1mg/kg/i.p.)
- **0.dk** = JZL 184 (16 mg/kg/ i.p.)
- **60.dk** = Serotonin (S) (50 µg/µl/ i.d.)
- **60-90 dk arası** = Kamera kaydı

Tablo 2. (devamı) Deney grupları



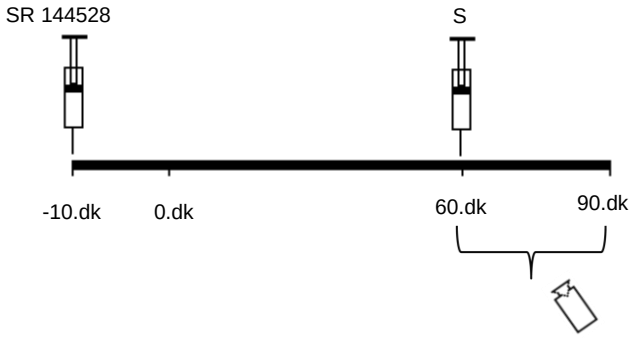
Grup 11

- **-10.dk** = (SR 144528 (1mg/kg/i.p.)
- **0.dk** = AM 404 (10 mg/kg/i.p.)
- **60.dk** = Serotonin (S) (50 µg/µl/ i.d.)
- **60-90 dk arası** = Kamera kaydı



Grup 12

- **-10.dk** = AM 251 (1mg/kg/i.p.)
- **60.dk** = Serotonin (S) (50 µg/µl/ i.d.)
- **60-90 dk arası** = Kamera kaydı



Grup 13

- **-10.dk=** (SR 144528 (1mg/kg/i.p.)
- **60.dk** = Serotonin (S) (50 µg/µl/ i.d.).
- **60-90 dk arası** = Kamera kaydı

İSTATİSTİKSEL ANALİZ

Benzer tasarımda yapılmış çalışmalardan elde edilen verilerden tahmin edilerek;

Ortalamalar arasında saptanması planlanan en düşük fark	=	30,00
Standart sapma	=	15,00
Grup sayısı	=	13
İstenen Power	=	0,80
Alfa	=	0,05

alınması planlanmıştır. Yukarıdaki değere göre örnek büyüklüğü *SigmaStat for Windows Version 3.1* kullanılarak hesaplanmış ve 10 bulundu. Bu hesaplamaya dayanarak her grup 10 fare içerecek şekilde düzenlendi.

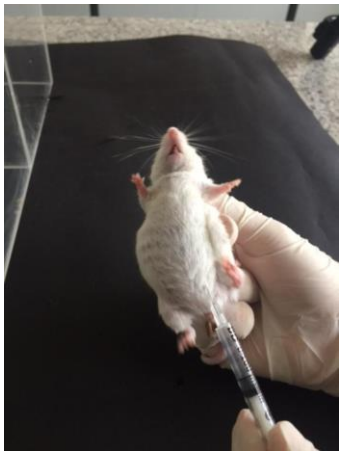
Deneylerin tamamlanmasını takiben elde edilen veriler bilgisayara aktarıldı. İstatistiksel değerlendirmeler, GPW6-156727-Rseri numaralı *Graphpad Prism for Windows Version 6.05* programı kullanılarak yapıldı. Ölçülebilen verilerin normal dağılıma uygunlukları Shapiro-Wilk testi ile değerlendirildi. Veriler normal dağılım göstermediği için gruplar arası kıyaslamalarda Kruskal-Wallis varyans analizi ve takiben *posthoc* Dunn's testi ile istatistiksel değerlendirme yapıldı. $p<0,05$ olan değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Tüm veriler ortalama ± standart hata (SEM) olarak ifade edildi.



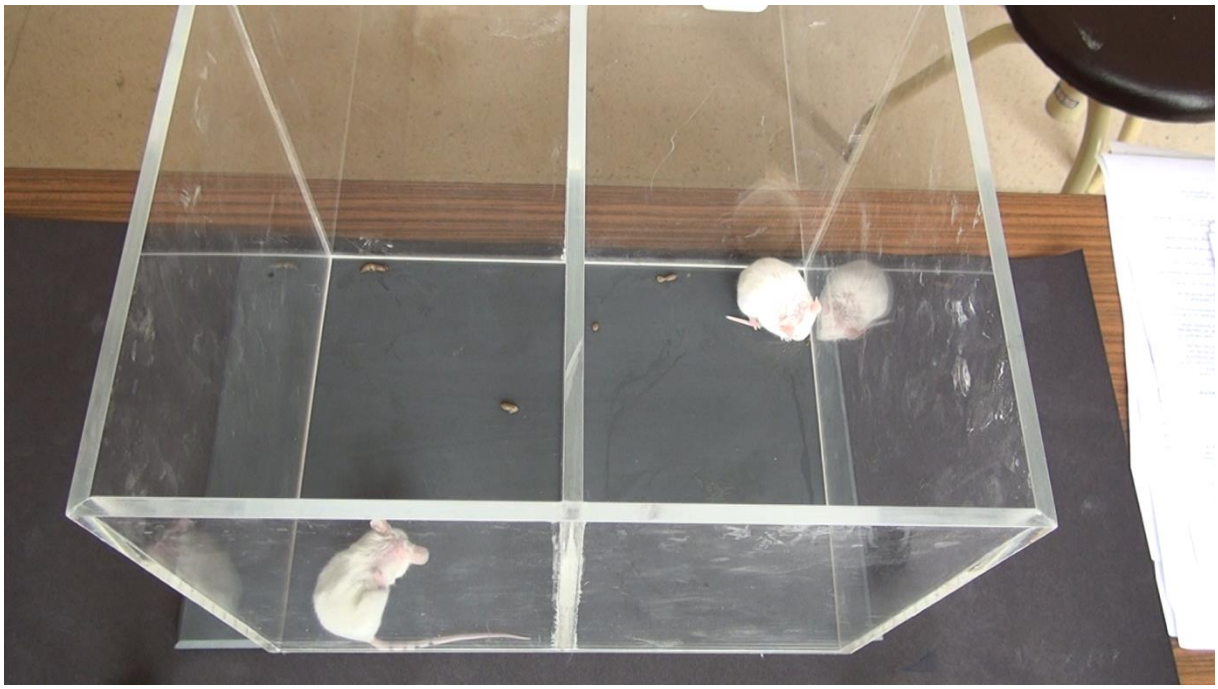
Şekil 11. Traş edilmiş fareler



Şekil 12. İntradermal enjeksiyon



Şekil 13. İntraperitoneal enjeksiyon



Şekil 14. Kaşınma davranışı



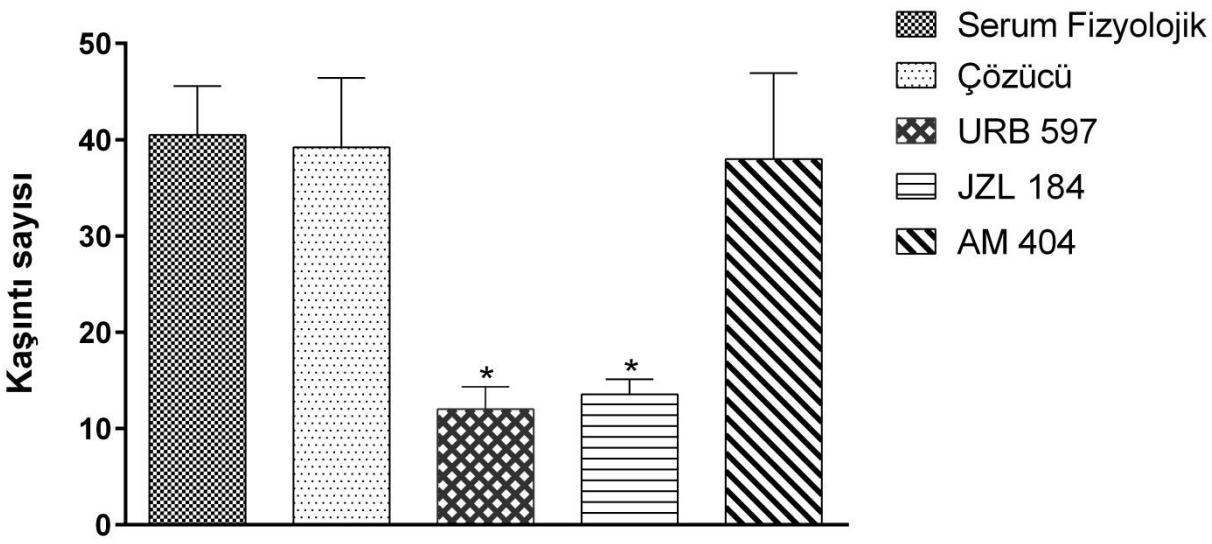
Şekil 15. Kayıt düzeneği

BULGULAR

Deneyimizde kullanılan tüm farelerde yalnızca bir kez serotonin ile kaşıntı oluşturuldu. Kaşıntı davranışları 30 dakika boyunca kamera ile kayıt edildi ve sonrasında sayıldı. Şekiller *Graphpad Prism for Windows Version 6.05* programı ile çizildi.

ENDOKANNABİNOİD SİSTEM MODULATÖRLERİNİN SEROTONİN İLE OLUŞTURULAN KAŞINTI ÜZERİNE ETKİSİ

Çalışmamızda endokannabinoidlerin yıkımından sorumlu olan FAAH ve MAGL enzimlerinin inhibitörleri olan URB 597 (10 mg/kg), JZL 184 (16 mg/kg) ve endokannabinoid uptake inhbitörü olan AM 404 (10 mg/kg) tek dozda uygulandı. Sonrasında serotonin ile oluşturulan kaşıntı üzerindeki etkileri değerlendirildi.

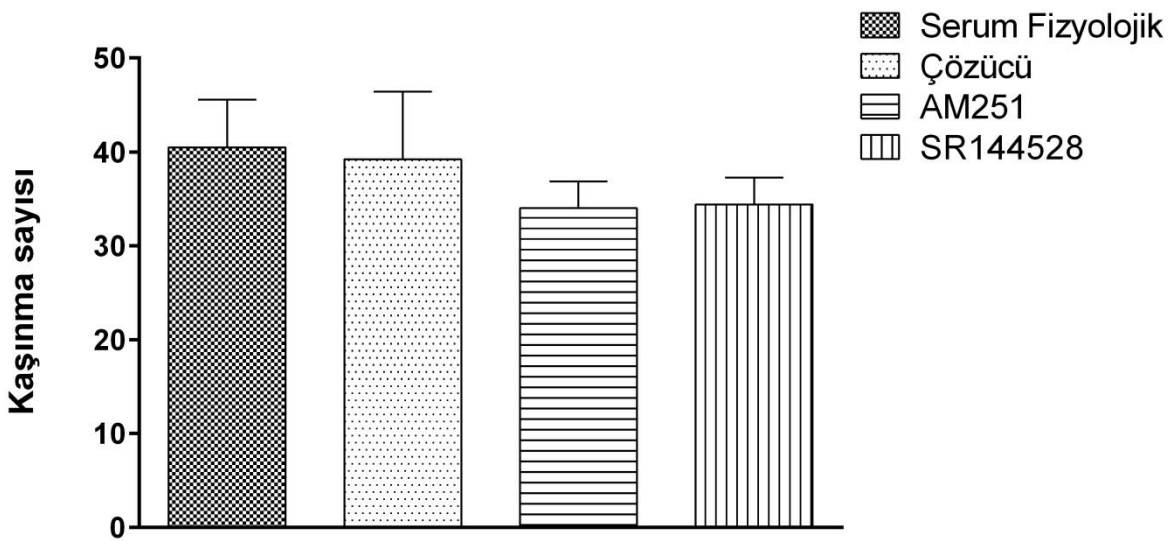


Şekil 16. Endokannabinoid sistem modülatörlerinin kaşıntı üzerine etkisi

URB 597 (10mg/kg/i.p.), JZL 184 (16mg/kg/i.p.), AM 404 (10mg/kg/i.p.)
(*p<0,05; çözücü grubuna göre).

Enzim inhibitörlerinin her ikisi de serotonin ile oluşturulan kaşıntıyı çözücü grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azalttı (p<0,05). Uptake inhibitörü AM 404 ise serotonin ile oluşturulan kaşıntı üzerine çözücü grubuyla karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı herhangi bir etki göstermedi (Şekil 16).

SEROTONİN İLE OLUŞTURULAN KAŞINTI ÜZERİNE KANNABİNOİD CB_1 VE CB_2 RESEPTÖR ANTAGONİSTLERİNİN ETKİLERİ

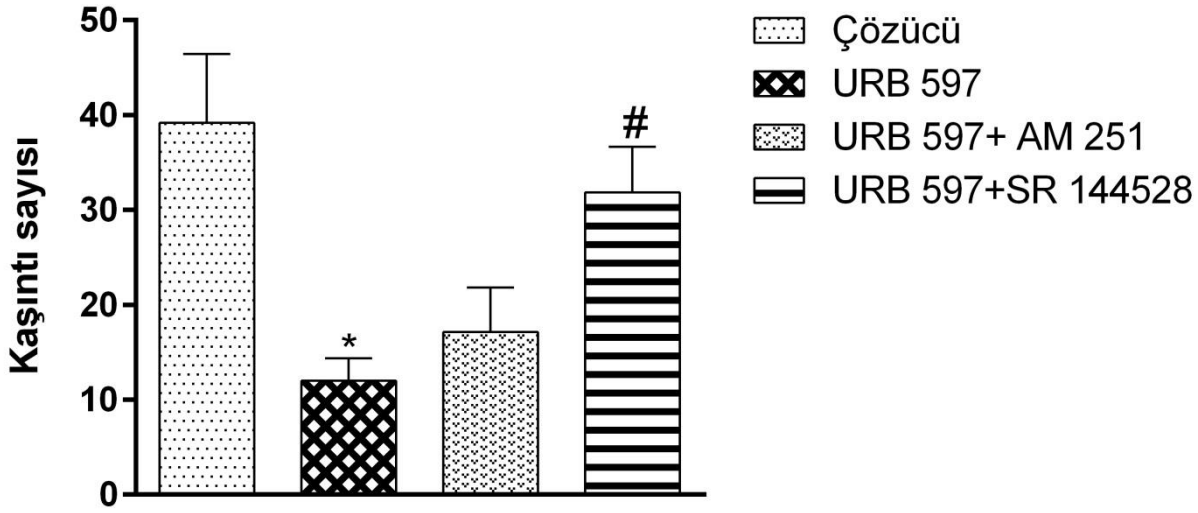


Şekil 17. Kannabinoid CB_1 ve CB_2 reseptör antagonistlerinin kaşıntı üzerine etkisi

AM 251 (1mg/kg/i.p.), SR 144528 (1mg/kg/i.p.)

Kannabinoid CB_1 reseptör antagonisti AM 251 ve CB_2 reseptör antagonisti SR 144528 tek başına tek doz olarak uygulandı. Her iki reseptör antagonisti de serotonin ile oluşturulan kaşıntı üzerine istatistiksel olarak anlamlı bir etki göstermedi (Şekil 17).

URB 597'NİN ANTİPRURİTİK ETKİSİ ÜZERİNE KANNABİNOİD CB_1 VE CB_2 RESEPTÖR ANTAGONİSTLERİNİN ETKİLERİ

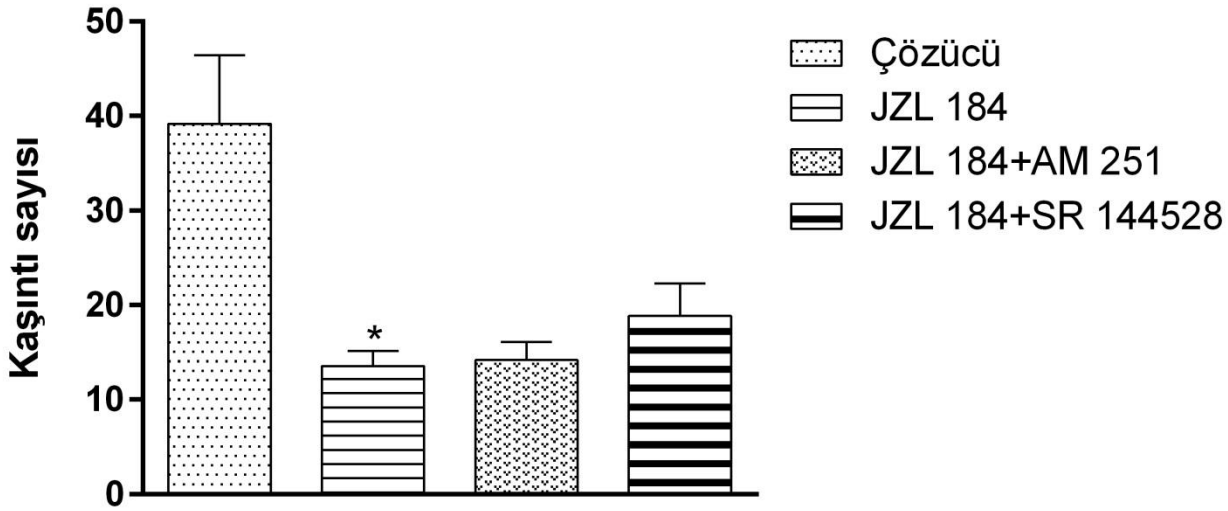


Şekil 18. Endokannabinoid sistem modülatörü URB 597'nin antipruritik etkisinde kannabinoid reseptörlerinin rolü

URB 597 (10mg/kg/i.p.), AM 251 (1mg/kg/i.p.), SR 144528 (1mg/kg/i.p.)
(*p<0,01; çözücü grubuna göre; #p<0,05 URB 597 grubuna göre).

FAAH enzim inhibitörü URB 597 (10 mg/kg)'nin tek doz uygulanmasını takiben serotonin ile oluşturulan kaşıntının istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azaldığı görüldü ($p<0,01$). URB 597'nin oluşturduğu antipruritik etki CB_2 reseptör antagonisti SR 144528 ile ortadan kaldırıldı ($p<0,05$). CB_1 reseptör antagonisti AM 251 ise URB 597'nin oluşturduğu antipruritik etki üzerine istatistiksel olarak anlamlı bir etki göstermedi. Bu bulgu CB_2 reseptörünün URB 597'nin antipruritik etkisine aracılık ettiği düşündürmektedir (Şekil 18).

JZL 184'ÜN ANTİPRURİTİK ETKİSİ ÜZERİNE KANNABİNOİD CB_1 VE CB_2 RESEPTÖR ANTAGONİSTLERİNİN ETKİLERİ



Şekil 19. Endokannabinoid sistem modülatörü JZL 184'ün antipruritik etkisinde kannabinoid reseptörlerinin rolü

JZL 184 (16mg/kg/i.p.), AM 251 (1mg/kg/i.p.), SR 144528 (1mg/kgi.p.)
(*p<0,01; çözücü grubuna göre).

MAGL enzim inhibitörü JZL184 (16 mg/kg)'ün tek doz uygulanmasını takiben serotonin ile oluşturulan kaşıntının istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azaldığı görüldü (p<0,01). JZL 184'ün oluşturduğu antipruritik etki üzerine CB_1 reseptör antagonisti AM 251 ve CB_2 reseptör antagonisti SR 144528 istatistiksel olarak anlamlı bir etki göstermediler. Ancak CB_2 reseptör antagonisti SR 144528 JZL 184'ün oluşturduğu antipruritik etkiyi istatistiksel olarak anlamlı olmayan düzeyde azalttığı görüldü (Şekil 19).

TARTIŞMA

Kaşıntı son derece rahatsızlık veren bir semptomdur ve hayat kalitesini düşürür (16). Bazen bir deri hastalığı ile ortaya çıkabilen kaşıntı bazende sistemik bir hastalığa eşlik edebilir. Kaşıntı sebepsiz bir şekilde meydana gelebilirken psikolojik bir bozukluğun belirtisi de olabilir. Lokal veya yaygın hissedilebilen kaşıntının oluşum mekanizması tam olarak aydınlatılmış değildir (12). Kaşıntı ile ağrı arasında benzer yönlerin olduğu literatürde mevcuttur. Her ikisinde de iletim yolları benzerdir. İletim sırasında görev alan deride bulunan mediyatörler ile bu iletimi sağlayan ve omuriliğin arka boynuzuna kadar ileten lifler aynıdır. Yapılan çalışmalarda ağrı oluşumunda aktive olantalamus, prefontal korteks, somatosensoriyel korteks ve anterior singulat korteks gibi premotor alanların ve serebellumun kaşıntı oluşumunda da aktive olduğu görülmüştür (16). Ek olarak ağrıda olduğu gibi kaşıntıda da yalnızca periferik mekanizmaların değil, santral mekanizmaların da rol oynadığının ortaya çıkması sonucunda kaşıntı tedavisine karşı yaklaşımlar değişmiştir (6).

Serotonin insanda kaşıntıya neden olan önemli bir endojen biyojenik amindir (14). Serotonin farelerde histaminden daha çok kaşıntıya neden olmaktadır (26,30). Bizim deneylerimizde kullandığımız Balb/c farelerde histaminin anlamlı derecede kaşıntı oluşturmadığı gösterilmiştir (77). Farelerin aksine insanlarda histamin daha güçlü kaşıntı yanıtı oluşturur. Genellikle insanlarda kaşıntı histamin H_1 reseptör antagonistleri gibi klasik antipruritikler tarafından kontrol edilir.

Kannabinoidlerin ağrı ve kaşıntı üzerine etkili olduğu bulunmuştur. Kannabinoid reseptör agonisti HU210'un insanlarda histaminle tetiklenen kaşıntıyı ve

lokal kan akımı artışını azalttığı gösterilmiştir (78). Bir kannabinoid agonisti olan WIN 55,212-2'nin sıçanlarda kolestaza bağlı kaşıntı davranışını azalttığı gözlemlenmiştir (79). Ancak eksojen kannabinoidlerin kaşıntı önleyici etkilerinin yanında istenmeyen etkilerinin görülmesi araştırmacıları endojen kannabinoidlere yönlendirmiştir.

Szepietowski ve ark. (80) çalışmalarında üremik hastalarda endokannabinoid olan *N*-asetiletanolamin ve *N*-palmitoiletanolamin içeren kremin lokal etkisini değerlendirmişler ve üremik kaşıntıyı azalttığını göstermişlerdir. İnsanlarda *N*-palmitoletanolamin içeren lokal kremin atopik egzamaya bağlı kaşıntı, eritem, likenifikasyon, döküntü ve kuruluğu önlediği gösterilmiştir (81). Daha sonraki yıllarda endokannabinoidlerin yıkımının engellenmesi yoluyla düzeylerinin artırılmasının ağrı ve kaşıntı üzerine etkili olabileceği düşünülmüştür.

Endokannabinoid yıkımından sorumlu enzimlerden biri olan FAAH'ın seçici inhibitörlerle bloke edilmesi, endojen AEA düzeylerinin artmasına neden olur ve preklinik ağrı modellerinde, başta kannabinoid CB_1 olmak üzere, aynı zamanda CB_2 reseptörü aracılığıyla analjezik etkiler yaratır (63,74,82,83).

Endokannabinoid sistemin kaşıntı üzerine etkisiyle ilgili literatürde çok az çalışma vardır. FAAH geni *knockout* (FAAH-/-) edilen farelerde artan endokannabinoidlerin sedasyon, koordinasyon kaybı ve katatoni gibi istenmeyen etkilere yol açmadan 48/80 maddesi ile oluşturulan kaşıntıyı azalttığı gözlenmiştir. Aynı çalışmada CB_1 reseptör antagonisti olan rimonabant'ın (FAAH-/-) farelerde kaşıntı davranışını geri döndürdüğü gösterilmiştir. Takiben,nöral FAAH geninin korunduğu ancak periferik dokulardaki FAAH geninin silindiği farelerde de çalışma yapılmış ve kaşıntı yanıtının azalmadığı bulunmuştur. Tüm bu verilere istinaden endokannabinoidlerin kaşıntı üzerine baskılayıcı etkilerinin nöral CB_1 reseptörleri aracılığıyla olduğu düşünülmüştür (7). Rimonabant'ın oluşturduğu kaşıntı davranışının temelinde CB_1 reseptörlerinin rolü olduğu CB_1 reseptörleri *knockout* edilmiş farelerde yapılan bir çalışma ile ortaya konulmuştur (84). Daha sonraki çalışmalarla rimonabantın ters agonist olduğu belirlenmiştir. Endokannabinoid yıkım inhibitörleri URB 597 (FAAH inhibitörü) ve JZL 184 (MAGL inhibitörü)'ün lokal etkilerinin incelendiği bir çalışmada sıçanlarda ense bölgesine lokal serotonin enjeksiyonuyla oluşturulan kaşıntıyı her ikisinin de anlamlı derecede azalttığı ve etkilerinin kannabinoid CB_1 ters agonisti (AM 251) ve CB_2 antagonisti (AM 630) ile ortadan kaldırıldığı gözlenmiştir. Ancak aynı çalışmada endokannabinoid yıkım

inhibitörlerinin yanak bölgesine uygulanan serotoninle oluşturulan kaşıntıyı ve alil izotiosiyonat ile oluşturulan ağrıyı ise arttırdığı belirlenmiştir. Trigeminal sinir ile spinal sinir innervasyon alanlarındaki bu lokal etki farklılığına dikkat çekilmiştir (75).

Biz de çalışmamızda farelerde serotoninle oluşturulan kaşıntı davranışı üzerine endokannabinoidlerin etkilerini araştırdık. Daha önceki çalışmalara benzer şekilde farelerde FAAH inhibisyonun serotonin ile oluşturulan kaşıntıyı hafiflettiğini gösterdik. Ancak bizim çalışmamızda FAAH enzimini genetik olarak değil URB 597 ile inhibe ettik. Ayrıca sıçanlarda yapılan çalışmadan farklı olarak FAAH inhibitörünü lokal değil sistemik olarak uyguladık. Çalışmamızda sistemik MAGL inhibisyonunun da serotoninle oluşturulan kaşıntıyı önlediğini ilk kez gösterdik. AEA ve 2-AG'nin hücresel geri alımını hedeflemek, hücre dışı endokannabinoid seviyelerini arttırmak için başka bir yoldur. Endokannabinoid transport inhibitörlerinin bazı ağrı modellerinde analjezik etki yarattığını gösteren raporlar vardır (71). Endokannabinoid transport inhibisyonu ile üretilen antinosisepsiyon FAAH veya MAGL inhibisyonununki kadar güçlü değildir görüşü genellikle kabul edilmektedir (85). Ancak endokannabinoid transport inhibisyonu daha önce kaşıntı modelinde çalışılmamıştır. Endokannabinoid enzim inhibitörlerinin aksine endokannabinoid transportunun AM 404 ile bloke edilmesinin, kaşınma davranışını azaltmadığını gösterdik (Şekil 16). Transport inhibitörü AM 404'ün kaşıntı üzerine zayıf da olsa bir etkisinin olmamasının nedenini araştırdığımızda AM 404'ün TRPV1 aktivasyonuna yol açması veya stabilite sorununun olmasının neden olabileceğini düşündük. Ancak bu düşünceyi test edemedik (70).

Endokannabinoidlerin kaşıntıyı önleyici etkilerinin mekanizmasını araştırdığımızda diğer çalışmalardan farklı olarak sadece CB_2 reseptörünün farmakolojik antagonizmasının URB 597 ile oluşturulan antipruritik etkiyi azalttığını belirledik (Şekil 18). Yaptığımız çalışmada CB_1 reseptör antagonistlerin etkisizliği şaşırtıcı olmuştur. Bu reseptörler hem ağrı ve inflamasyonda hem de kaşıntıda kannabinoid etkisinde baskın reseptör alt tipi olarak gösterilmiştir (7, 75,84-87). Bu uyumsuzluğun nedenin duyu farklılıkları (kaşıntıya karşı ağrı), kaşıntı modeli (serotonin, 48/80), hayvanlar (Balb/c'ye karşı C57BL/6J; dişi erkek vs) ve diğer etkenlerin olabileceğini düşündük (88,89). Ancak bizim çalışmamızdan sonra yapılan bir araştırmada; CB_2 reseptör agonisti S-777469'un, farelerde 48/80 ve sıçanlarda serotonin ile oluşturulan kaşıntı davranışını doz bağımlı olarak azalttığı belirlenmiştir.

Aynı çalışmada S-777469'un kaşınma davranışı üzerindeki inhibitör etkilerinin CB_2 reseptör antagonisti olan SR-144528 ile antagonize edilebildiği gösterilmiştir (90). CB_2 reseptörlerinin blokajının antipruritik etkili olması bizim çalışmamızla uyumludur. Bölümümüzde daha sonra yapılan bir diğer çalışmada; sentetik kannabinoid agonisti WIN55,212-2'nin serotoninle oluşturulan kaşıntıyı önlediği ve bu etkinin inici serotonerjik ve noradrenerjik sistemlerle modüle edilmediği gösterilmiştir (61). Bu veriler kaşıntı üzerine santral CB_1 reseptörlerinin ve periferik CB_2 reseptörlerinin etkisinin ön planda olduğunu düşündürmektedir.

MAGL inhibisyonu ile 2-AG düzeylerinin uzun süreli yükseltilmesinin hem CB_1 hem de CB_2 reseptörlerinin rol oynadığı antinosisepsiyona aracılık ettiği ileri sürülmektedir (82,91,92). Çalışmamızda MAGL inhibisyonun serotonin kaynaklı kaşıntı davranışını zayıflattığını gözlemledik ve bu sonuç sistemik MAGL inhibisyonunun pruritus üzerindeki etkisine dair ilk veri olma özelliğine sahiptir. Sonuçlarımız kaşıntı yanıtındaki bu azalmanın kannabinoid CB_1 ve CB_2 antagonistleri ile değişmediğini göstermektedir. Aslında bu sonuç beklenmedik bir bulgudur, ancak MAGL inhibitörünün neden olduğu diğer metabolik değişiklikler dikkate alınmalıdır. Örneğin; araşidonik asidin oluşumunun önlenmesi gibi durumlar MAGL inhibitörlerinin bu antipruritik etkisine aracılık edebilir (93). FAAH/MAGL dual inhibitörlerinin geliştirilmesinin hem ağrıda hem de kaşıntının önlenmesinde faydalı olabileceğini düşünebiliriz (89,94).

Daha önceki çalışmalarda self grooming'in (kaşınma davranışı ile karışabilir) anksiyete ve 5-HT_{2C} reseptörleri ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Dahası insanlarda ve farelerde anksiyete dahil olmak üzere çeşitli davranışların ve fizyolojik fonksiyonların düzenlenmesinde serotonin ve endokannabinoidlerin doğrudan etkileşimlerinin rol oynadığı tanımlanmıştır. 5-HT_{2c} reseptör-endokannabinoid reseptör etkileşimleri yaygın olarak çalışılmıştır (95). Ek olarak endokannabinoidler ve reseptörleri, kan damarlarının tonus ve geçirgenliğinin lokal olarak düzenlenmesinde lokal ve aynı zamanda merkezi regülasyon yoluyla bir rol oynarlar. Ayrıca serotonin de lokal vasküler etkilere sahiptir. Çalışma tasarımında dikkate alınmamasına rağmen, bunlara da dikkat edilmelidir.Yakın gelecekte muhtemelen FAAH veya MAGL inhibitörleriyle kullanımının araştırılacağı TRPV1 antagonistlerinin çalışmamızda kullanılmamış olması çalışmamızın kısıtlılıklarından biridir. Bir diğeri ise sonuçlarımızın güvenirliğini artıracak olan endokannabinoid düzeylerinin doğrudan

ölçülmemesidir. Bu kısıtlamalara rağmen çalışmamız, endokannabinoid metabolizmasından sorumlu olan, FAAH ve MAGL enzimlerinin inhibisyonunun, belirgin bir yan etki olmaksızın, kaşıntı için yeni bir hedef olabileceğini öngörmektedir.

SONUÇLAR

Endokannabinoid sistem modülatörlerinin antipruritik etkilerinin değerlendirildiği ve kannabinoid CB_1 ve CB_2 reseptör blokörlerinin bu etkiyi değiştirip değiştirmediğini incelediğimiz çalışmamızda aşağıdaki sonuçlar elde edilmiştir.

- FAAH inhibitörü URB 597 serotonin ile oluşturulan kaşıntıyı çözücü grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azaltmıştır ($p<0,01$).
- URB 597'nin antipruritik etkisi CB_2 reseptör antagonisti SR 144528 ile ortadan kaldırılmıştır ($p<0,05$).
- CB_1 reseptör antagonisti AM 251 ise URB 597'nin antipruritik etkisi üzerine istatistiksel olarak anlamlı bir etki göstermemiştir.
- Bu sonuçlar CB_2 reseptörünün URB 597'nin antipruritik etkisine aracılık ettiği düşündürmektedir.
- MAGL inhibitörü JZL184 de serotonin ile oluşturulan kaşıntıyı çözücü grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azaltmıştır ($p<0,01$).
- JZL 184'ün antipruritik etkisine CB_1 ve CB_2 reseptör antagonistleri istatistiksel olarak anlamlı bir etki göstermemiştir. Ancak CB_2 reseptör antagonisti SR 144528, JZL 184'ün antipruritik etkisini istatistiksel olarak anlamlı olmayan düzeyde azalttığı görülmüştür.
- Kannabinoid uptake inhibitörü AM 404 ise enzim inhibitörlerinin aksine serotonin ile oluşturulan kaşıntı üzerine çözücü grubuyla karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı herhangi bir etki göstermediği belirlenmiştir.

- Kannabinoid CB_1 reseptör antagonisti AM 251 ve CB_2 reseptör antagonisti SR 144528'in tek başına kullanıldıklarında serotoninile oluşturulan kaşıntı üzerine istatistiksel olarak anlamlı etkilerinin olmadığı belirlenmiştir.

Sonuçlarımız, FAAH ve MAGL enzimlerinin inhibisyonunun antipruritik etkinlik ortaya çıkardığını göstermektedir. Uptake inhibitörü ile bu etki görülmemiştir. Araştırmamızda kullandığımız gereç ve yöntemle, serotonin ile oluşturulan kaşıntıyı önleyici etkinin temelinde kannabinoid CB_2 reseptörünün rol oynadığını düşünmekteyiz.

ÖZET

Kaşıntı ve ağrı, ortak birçok özelliği paylaşan iki rahatsız edici edici histir. Ağrılı durumlarda endokannabinoid yıkıcı enzimlerin inhibisyonunun antinosiseptif etki göstermesini dikkate alarak, endokannabinoid modülasyonuyla, yani yağ asidi amid hidrolazı, monoaçilgliserol lipazı veya endokannabinoid uptake'ini inhibe ederek kaşınma davranışını azaltmaya çalıştık. Kaşıntı davranışı, Balb/c farelere intradermal serotonin enjeksiyonu ile oluşturulmuştur. Yağ asid amid hidrolaz inhibitörü olan URB 597 (10 mg/kg, i.p.), monoaçilgliserol lipaz inhibitörü olan JZL 184 (16 mg/kg, i.p.) ve endokannabinoid transport inhibitörü AM 404 (10 mg/kg, i.p.) endokannabinoid modülasyonunun kaşıma yanıtları üzerindeki etkilerini değerlendirmek için verilmiştir. Daha sonra kannabinoid reseptörlerinin endokannabinoid sistem modulatörlerinin antipruritik etkilerine aracılık edip etmediğini belirlemek için kannabinoid-1 reseptörünün antagonisti AM 251 (1mg/kg, i.p.) ve kannabinoid-2 reseptörünün antagonisti SR 144528 (1mg/kg, i.p.) uygulandı. URB 597 ve JZL 184 serotonin ile oluşturulan kaşıntıyı azalttı fakat AM 404'ün ise bir etkisi olmadı. URB 597'nin inhibe edici etkisi, SR 144528 tarafından tersine çevrildi, fakat kannabinoid reseptör antagonistlerinin, inhibitörlerin modülasyonu üzerinde başka hiçbir etkisi yoktur. Endokannabinoid tonusunun uptake inhibitörü ile değil ancak yağ asid amid hidrolaz ve monoaçilgliserol lipaz enzimleri gibi yıkıcı enzimlerin inhibisyonu ile arttırılmasının antipruritik ajanların gelişimi için yeni bir hedef olabileceğini önermekteyiz.

Anahtar kelimeler: Endokannabinoidler, serotonin, kaşıntı.

THE ROLE OF ENDOCANNABINOID SYSTEM MODULATORS IN SEROTONIN-INDUCED ITCH

SUMMARY

Itch and pain are two irritating sensations sharing a lot in common. Considering the antinociceptive effects of blockade of endocannabinoid degrading enzymes in pain states, we attempted to reduce scratching behavior by endocannabinoid modulation, i.e. by inhibiting fatty acid amide hydrolase, monoacylglycerol lipase, or cellular uptake of endocannabinoids. Scratching behavior was induced by intradermal injection of serotonin to Balb/c mice. URB 597 (10 mg/kg, i.p.), afatty acid amide hydrolase inhibitor, JZL 184 (16 mg/kg, i.p.), a monoacylglycerol lipase inhibitor, and AM 404 (10 mg/kg, i.p.), an endocannabinoid transport inhibitor, were given to evaluate the effects of endocannabinoid modulation on scratching responses. Then, the cannabinoid-1 receptor antagonist, AM 251 (1 mg/kg, i.p.), and the cannabinoid-2 receptor antagonist, SR 144528 (1 mg/kg,i.p.), were administered to determine whether cannabinoid receptors mediate these effects. URB 597 and JZL 184, but not AM 404, attenuated serotonin-induced scratches. The inhibitory effect of URB 597 was reversed by SR 144528, but cannabinoid receptor antagonists had no other effects on modulation by the inhibitors. We propose that augmenting the endocannabinoid tonus by inhibition of degradative enzymes, fatty acid amide hydrolase and monoacylglycerol lipase, but not cellular uptake, may be a novel target for the development of antipruritic agents.

Key words: Endocannabinoids, serotonin, pruritus.

KAYNAKLAR

1. Kulaç M, Türker GE. Idiopathic pruritus. Turkiye Klinikleri J Dermatol-Special Topics 2011;4(3):62-5.

2. Karabulut AA. Clinical approach to the patient with pruritus. Turkiye Klinikleri J Fam Med-Special Topics 2010;1(2):32-9.

3. Schmelz M. Itch and pain. Dermatol Ther 2005;18(4):304-7.

4. Hedlund PB. The 5-HT receptor and disorders of the nervous system: an overview. Psychopharmacology 2009;206:345-54.

5. Şenol M. What is pruritus? Turkiye Klinikleri J Dermatol-Special Topics 2011;4(3):1-2.

6. Cevikbas F, Steinhoff M, Ikoma A. Role of spinal neurotransmitter receptors in itch: new insights into therapies and drug devolopment. CNS Neurosci Ther 2011;17:742-9.

7. Schlosburg JE, Boger DL, Cravatt BF, Lichtman AH. Endocannabinoid modulation of scratching response in an acute allergenic model: a new prospective neural therapeutic target for pruritus.J Pharmacol Exp Ther 2009;329:314-23.

8. Mallet C, Daulhac L, Bonnefont J, Ledent C, Etienne M, Chapuy E, et al. Endocannabinoid and serotonergic systems are needed for acetaminophen-induced analgesia. Pain 2008;139:190-200.

9. Högestätt ED, Jönsson BA, Ermund A, Andersson DA, Björk H, Alexander JP, et al. Conversion of acetaminophen to the bioactive N-acylphenolamine AM404 via fatty acid amide hydrolase-dependent arachidonic acid conjugation in the nervous system. J Biol Chem 2005;280(36):31405-12.

10. Dogrul A, Seyrek M, Akgul EO, Cayci T, Kahraman S, Bolay H. Systemic paracetamol-induced analgesic and anti-hyperalgesic effects through activation of descending serotonergic pathways involving spinal 5-HT7 receptors. Eur J Pharmacol 2012;677:93-101.

11. Dogrul A, Seyrek M, Yalcin B, Ulugol A. Involvement of descending serotonergic and noradrenergic pathways in cannabinoid CB1 receptor-mediated antinociception. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry 2012;38:97-105.

12. Türköz Y. Biochemistry of the pruritus. Turkiye Klinikleri J Dermatol-Special Topics 2011;4(3):7-11.

13. Arıcan Ö. Kaşıntının patofizyolojisi, kliniği ve tedavisi. TÜRKDEM 2005;39(2):88-97.

14. Potenzieri C, Undem BJ. Basic mechanisms of itch. Clin Exp Allergy 2012;42:8-19.

15. Altunay İK, Köşlü A. Psychogenic pruritus. Turkish J Dermatol 2008;2:116-20.

16. Drzezga A, Darsow U, Treede RD. Central activation by histamine-induced itch: analogies to pain processing: a correlational analysis of O-15 H_2O positron emission tomography studies. Pain 2001;92(1-2):295-305.

17. Ross ES. Pain and itch: insights into the neural circuits of aversive somatosensation in health and disease. CurrOpin Neurobiol 2011;21:880-887.

18. Yıldız S. Physiology of the Pruritus. Turkiye Klinikleri J Dermatol-Special Topics 2011;4(3):18-22.

19. Ikoma A, Cevikbas F, Kempkes C, Steinhoff M. Anatomy and neurophysiology of Pruritus 2011;30(2):64-70.

20. Paus R, Schmelz M, Biro T, Steinhoff M. Frontiers in pruritus research: scratching the brain for more effective itch therapy. J Clin Invest 2006;116(5):1174-86.

21. Mochizuki H, Tashiro M, Kano M. Imaging of central itch modulation in the human brain using positron emission tomography. Pain. 2003;105:339-46.

22. Sun YG, Zhao ZQ, Meng XL, Yin J, Liu XY, Chen ZF. Cellular basis of itch sensation. Science 2009;325(5947):1531-4.

23. Biro T, Toth BI, Marincsak R, Dobrosi N, Geczy T, Paus R. TRP channels as novel players in the pathogenesis and therapy of itch. Biochim Biophys Acta 2007;1772(8):1004-21.

24. Nakagawa H, Hiura A.Four possible itching pathways related to the TRPV1 channel, histamine, PAR-2 and serotonin. Malays J Med Sci 2013;20(4):5-12.

25. Twycross R, Greaves MW, Handwerker H, Jones EA, Libretto SE, Szepietowski JC, et al. Itch:scratching more than the surface. QJM2003;96:7-26.

26. Hosogi M, Schmelz M, Miyachi Y, Ikoma A. Bradykinin is a potent pruritogen in atopic dermatitis: a switch from pain to itch. Pain 2006;126:16-23.

27. Yamaguchi T, Nagasawa T,Satoh M, Kuraishi Y. Itch-associated response induced by intradermal serotonin through $5HT_2$ receptors in mice.Neurosci Res 1999;35:77-83.

28. Schmelz M, Schmidt R, Weidner C, Hilliges M, Torebiok HE, Handwarker HO. Chemical response pattern of different classes of C-nociceptors to pruritogens and algogens. J Neurophysiol 2003;89(5):2441-8.

29. Buddenkotte J, Steinhoff M. Pathophysiology and therapy of pruritus in allergic and atopic diseases. Allergy 2010;65:805-21.

30. Hagermark O, Hokfelt T, Pernow B. Flare and itch induced by substance P in human skin. J InvestDermatol 1978;71:233-5.

31. Han L, Dong X. Itch mechanisms and circuits. AnnuRev Biophys 2014;43:331-55.

32. Lotts T, Stander S. Research in practice: substance P antagonism in chronic pruritus. J Dtsch Dermatol Ges 2014;12(7):557-9.

33. Azimi E, Xia J, Lerner EA. Peripheral mechanisms of itch. Curr Probl Dermatol 2016;50:18-23.

34. Andoh T, Katsube N, Maruyama M, Kuraishi Y. Involvement of leukotriene B(4) in substance P-induceditch-associated response in mice. J Invest Dermatol 2001;117:1621-6.

35. Cormia FE, Dougherty JW. Proteolytic activity in development of pain and itching. Cutaneous reactions to bradykinin and kallikrein. J Invest Dermatol 1960;35:21-6.

36. Hassan I, Haji ML. Understanding itch: An update on mediators and mechanisms of pruritus. Indian J Dermatol Venereol Leprol 2014;80(2):106-14.

37. Sonkoly E, Muller A, Lauerma AI, Pivarcsi A, Soto H, Kemeny L, et al. IL-31: a new link between T cells and pruritus in atopic skin inflammation. J Allergy Clin Immunol 2006;117:411-7.

38. Soh UJ, Dores MR, Chen B, Trejo J. Signal transduction by protease-activated receptors. Br J Pharmacol 2010;160:191-203.

39. Tsujii K, Andoh T, Lee JB, Kuraishi Y. Activation of proteinase-activated receptors induces itch-associated response through histamine dependent and -independent pathways in mice. J Pharmacol Sci 2008;108(3):385-8.

40. Page K, Strunk VS, Hershenson MB. Cockroach proteases increase IL-8 expression in humanbronchial epithelial cells via activation of protease-activated receptor (PAR)-2 and extracellular-signal-regulated kinase. J Allergy Clin Immunol 2003;112:1112-8.

41. Rapport, M. M., Green, A. A., & Page, I. H. Crystalline serotonin. Science 1948;108(2804):329-330.

42. Rapport, M. M. Serum vasoconstrictor (serotonin) the presence of creatinine in the complex; a proposed structure of the vasoconstrictor principle. Journal of Biological Chemistry 1949;180(3), 961-969.

43. Berger M, Gray JA, Roth BL. The expanded biology of serotonin. Annu Rev Med 2009;60:355-66.

44. Szeitz A,Bandiera SM. Analysis and measurement of serotonin. Biomed Chromatogr 2018;32 e4135.

45. Slominski A, Wortsman J, Tobin DJ. The cutaneous serotonergic/melatonergic system: securing a place under the sun. FASEB J 2005;19:176-94.

46. Andoh T, Gotoh Y, Kuraishi Y. Milnacipran inhibits itch-related responses in mice through the enhancement of noradrenergic transmission in the spinal cord. J Pharmacol Sci 2013;123:199-202.

47. Weisshaar E, Ziethen B, Gollnick H. Can a serotonin type 3 (5-HT_3) receptor antagonist reduce experimentally-induced itch? Inflamm Res 1997;46:412-6.

48. Nojima H, Carstens E. 5-Hydroxytryptamine $(5\text{-HT})_2$ receptor involvement in acute 5-HT-evoked scratching but not in allergic pruritus induced by dinitrofluorobenzene in rats. J Pharmacol Exp Ther 2003;306(1):245-52.

49. El-Nour H, Lundeberg L, Abdel-Magid N, Lonne-Rahm SB, Azmitia EC, Nordlind K. Serotonergic mechanisms in human allergic contact dermatitis. Acta Derm Venereol 2007;87:390-6.

50. Katzung BG, Trevor AJ. Basic & Clinical Pharmacology. In: Katzung BG (Eds.). Histamine, Serotonin & the Ergot Alkaloids. 13th ed. Mc Graw Hill Education; 2015. p.279-80.

51. Goodman, Gilman. The Pharmacological Basic of Therapeutics. In: Brunton LL (Eds.). 5-Hydroxytryptamine (serotonin) and Dopamine. 12th ed. New york Mc Graw Hill Co; 2011. p.344-47.

52. Duvan K. Deneysel Olarak Oluşturulan Kaşıntı Üzerine Nosiseptin Reseptör Antagonizmasının Etkileri (tez). Edirne: Trakya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü;2014.

53. Aksu AG, Gunduz O, Ulugol A. Contribution of spinal 5-HT5A receptors to the antinociceptive effects of systemically administered cannabinoid agonist WIN 55,212-2 and morphine. Can J Physiol Pharmacol 2018;96(6):618-23.

54. Lu HC, Mackie K. An introduction to the endogenous cannabinoid system. Biol Psychiatry 2016;79(7):516-25.

55. Ulugol A. The endocannabinoid system as a potential therapeutic target for pain modulation. Balkan Med J 2014;31:115-20.

56. Fine PG, Rosenfeld MJ. The endocannabinoid system, cannabinoids, and pain. Rambam Maimonides Med J 2013;4(4):e0022.

57. Di Marzo V, Bifulco M, De Petrocellis L. The endocannabinoid system and its therapeutic exploitation. Nat Rev Drug Discov 2004;3(9):771-84.

58. Bradshaw HB, Walker JM. The expanding field of cannabimimetic and related lipid mediators. Br J Pharmacol 2005;144(4):459-65.

59. Breivogel CS, Childers S.R. The functional neuroanatomy of brain cannabinoid receptors. Neurobiol Dis 1998;5:417-31.

60. Çınar R, Çınar ÖG. Kannabinoid Tip 1 reseptör (CB1) ve terapötik yaklaşımlara genel bakış-I. MÜSBED 2011;1(2):149-54.

61. Todurga ZG, Gunduz O, Karadag CH, Ulugol A. Descending serotonergic and noradrenergic systems do not regulate the antipruritic effects of cannabinoids. Acta Neuropsychiatr 2016;28(6):321-6.

62. Özerol İH. Immunology of the pruritus. Turkiye Klinikleri J Dermatol-Special Topics 2011;4(3):23-37.

63. Jayamanne A, Greenwood R, Mitchell VA, Aslan S, Piomelli D, Vaughan CW. Actions of the FAAH inhibitor URB597 in neuropathic and inflammatory chronic pain models. Brit J Pharmacol 2006;147(3):281-8.

64. Pertwee RG, Howlett AC, Abood ME, Alexander SP, Di Marzo V, Elphick MR, et al. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXIX. Cannabinoid receptors and their ligands: beyond CB(1) and CB(2). Pharmacol Rev 2010;62(4):588-631.

65. de Oliveria Alvares L, Genro BP, Vaz Breda R, Pedroso MF, Da Costa JC, Quillfeldt JA. AM251, a selective antagonist of the CB1 receptor, inhibits the induction of long-term potentiation and induces retrograde amnesia in rats. Brain Res 2006;1975(1):60-7.

66. Rinaldi-Carmona M, Barth F, Millan J, Derocg JM, Casellas P, Congy C, et al.SR144528, the first potent and selective antagonist of the CB2 cannabinoid receptor. J Pharmacol Exp Ther 1998;284(2):644-50.

67. Woodhams SG, Wong A, Barrett DA Bennett AJ, Chapman V, Alexander SP. Spinal administration of the monoacylglycerol lipase inhibitor JZL184 produces robust inhibitory effects on nociceptive processing and the development of central sensitization in the rat. Br J Pharmacol 2012;167(8):1609-19.

68. Long JZ, Li W, Booker L, Burston JJ, Kinsey SG, Schlosburg JE, et al. Selective blockade of 2 arachidonoylglycerol hydrolysis produces cannabinoid behavioral effects. Nat Chem Biol 2009;5(1):37-44.

69. Yeşilyurt O, Cayırlı M, Sakin YS, Seyrek M, Akar A, Dogrul A. Systemic and spinal administration of FAAH, MAGL inhibitors and dual FAAH/MAGL inhibitors produce antipruritic effect in mice. Arch Dermatol Res 2016;308(5):335-45.

70. Rawls SM, Ding Z, Cowan A. Role of TRPV1 and cannabinoid CB1 receptors in AM 404-evoked hypothermia in rats. Pharmacol Biochem Behav 2006;83(4):508-16.

71. Mitchell VA, Greenwood R, Jayamanne A, Vaughan CW. Actions of the endocannabinoid transport inhibitor AM404 in neuropathic and inflammatory pain models. Clin Exp Pharmacol Physiol 2007;34(11):1186-90.

72. van Cleef KW, Overheul GJ, Thomassen MC, Marjakangas JM, van Rij RP. Escape mutations in NS4B render dengue virus insensitive to the antiviral activity of the paracetamol metabolite AM404. Antimicrob Agents Chemother 2016;60(4):2554-7.

73. Fegley D, Gaetani S, Duranti A,Tontini A, Mor M, Tarzia G, et al. Characterization of the fatty acid amide hydrolase inhibitor cyclohexyl carbamic acid 3′-carbamoyl-biphenyl-3-ylester (URB597): effects on anandamide and oleoylethanolamide deactivation. J Pharmacol Exp Ther 2005;313(1):352-8.

74. Russo R, Loverme J, La Rana G, Compton TR, Parrott J, Duranti A, et al. The fatty acid amide hydrolase inhibitor URB597 (cyclohexylcarbamic acid 3‘-carbamoylbiphenyl-3-yl ester) reduces neuropathic pain after oral administration in mice. J Pharmacol Exp Ther 2007;322(1):236-24.

75. Spradley JM, Davoodi A, Gee LB, Carstens MI, Carstens E. Differences in peripheral endocannabinoid modulation of scratching behavior in facial vs. spinally-innervated skin. Neuropharmacology 2012;63(4):743-9.

76. Saglam G, Gunduz O, Ulugol A. Blockade of cannabinoid CB1 and CB2 receptors does not prevent the antipruritic effect of systemic paracetamol. Acta Neurol Belg 2014;114(4):307-9.

77. Inagaki N, Nagao M, Nakamura N, Kawasaki H, Igeta K, Musoh K, et al. Evaluation of anti-scratch properties of oxatomide and epinastine in mice. Eur J Pharmacol 2000;400(1):73-9.

78. Dvorak M, Watkinson A, McGlone F,Rukwied R. Histamine induced responses are attenuated by a cannabinoid receptor agonist in human skin. Inflamm Res 2003;52(6):238-45.

79. Gingold AR, Bergasa NV. The cannabinoid agonist WIN 55, 212-2 increases nociception threshold in cholestatic rats: implications for the treatment of the pruritus of cholestasis. Life Sci 2003;73(21):2741-7.

80. Szepietowski JC, Reich A, Szepietowski T. Emollients with endocannabinoids in the treatment of uremic pruritus: discussion of the therapeutic options. Ther Apher Dial 2005;9(3):277-9.

81. Eberlein B, Eicke C, Reinhardt HW, Ring J. Adjuvant treatment of atopic eczema: assessment of an emollient containing N-palmitoylethanolamine (ATOPA study). J Eur Acad Dermatol Venereol 2008;22(1):73-82.

82. Kinsey SG, Long JZ, O'Neal ST, Abdullah RA, Poklis JL, Boger DL et al. Blockade of endocannabinoid-degrading enzymes attenuates neuropathic pain. J Pharmacol Exp Ther 2009;330(3):902-10.

83. Schlosburg JE, Kinsey SG, Lichtman AH. Targeting fatty acid amide hydrolase (FAAH) to treat pain and inflammation. AAPS J 2009;11(1):39-44.

84. Schlosburg JE, O'Neal ST, Conrad DH, Lichtman AH. CB1 receptors mediate rimonabant-induced pruritic responses in mice: investigation of locus of action. Psychopharmacology 2011;216(3):323-31.

85. Jhaveri MD, Richardson D, Chapman V. Endocannabinoid metabolism and uptake: novel targets for neuropathic and inflammatory pain. Br J Pharmacol 2007;152(5):624-32.

86. Kinsey SG, Nomura DK, O'Neal ST, Long JZ, Mahadevan A, Cravatt BF, et al. Inhibition of monoacylglycerol lipase attenuates nonsteroidal anti-inflammatory drug-induced gastric hemorrhages in mice. J Pharmacol Exp Ther 2011;338(3):795-802.

87. Lichtman AH, Shelton CC, Advani T, Cravatt BF. Mice lacking fatty acid amide hydrolase exhibit a cannabinoid receptor-mediated phenotypic hypoalgesia. Pain 2004;109(3):319-27.

88. Maione S, Costa B, Piscitelli F, Morera E, De Chiaro M, Comelli F, et al. Piperazinyl carbamate fatty acid amide hydrolase inhibitors and transient receptor potential channel modulators as ‘‘dual target’’ analgesics. Pharmacol Res 2013;76:98-105.

89. Starowicz K, Di Marzo V. Non-psychotropic analgesic drugs from the endocannabinoid system: ‘‘Magic bullet’’ or ‘‘multipletarget’’ strategies? Eur J Pharmacol 2013;716(1-3):41-53.

90. Haruna T, Soga M, Morioka Y, Hikita I, Imura K, Furue Y, et al.S-777469, a Novel Cannabinoid Type 2 Receptor Agonist, Suppresses Itch-Associated Scratching Behavior in Rodents through Inhibition of Itch Signal Transmission.Pharmacology. 2015;95(1-2):95-103.

91. Guindon J, Desroches J, Beaulieu P. The antinociceptive effects of intraplantar injections of 2-arachidonoyl glycerol are mediated by cannabinoid CB2 receptors. Br J Pharmacol 2007;150(6):693-701.

92. Guindon J, Hohmann AG. The endocannabinoid system and pain. CNS Neurol Disord Drug Targets 2009;8(6):403-21.

93. Nomura DK, Morrison BE, Blankman JL, Long JZ, Kinsey SG, Marcondes MCG, et al. Endocannabinoid hydrolysis generates brain prostaglandins that promote neuroinflammation. Science2011;334(6057):809-13.

94. Niphakis MJ, Johnson DS, Ballard TE, Stiff C, Cravatt BF. O-Hydroxyacetamide carbamates as a highly potent and selective class of endocannabinoid hydrolase inhibitors. ACS Chem Neurosci 2012;3(5):418-26.

95. Lazary J, Juhasz G, Hunyady L, Bagdy G. Personalized medicine can pave the way for the safe use of CB1 receptor antagonists. Trends Pharmacol Sci 2011;32(5):270-80.

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekiller **Sayfa no.**

Şekil 1. Kaşıntı yolakları 7

Şekil 2. Bazı mediyatörlerin intradermal enjeksiyonunun tetiklediği kaşıntı yanıtı 11

Şekil 3. Serotonin (5-hidroksitriptamin) ($C_{10}H_{12}N_2O$) 12

Şekil 4. Serotonin sentez şeması 13

Şekil 5. Serotonin metabolizması 13

Şekil 6. AM 251 17

Şekil 7. SR 144528 18

Şekil 8. JZL 184 18

Şekil 9. AM 404 19

Şekil 10. URB 597 19

Şekil 11. Traş edilmiş fareler 25

Şekil 12. İntradermal enjeksiyon 26

Şekil 13. İntraperitoneal enjeksiyon 26

Şekil 14. Kaşınma davranışı 26

Şekil 15. Kayıt düzeneği 27

Şekil 16. Endokannabinoid sistem modülatörlerinin kaşıntı üzerine etkisi 29

Şekil 17. Kannabinoid CB_1 ve CB_2 reseptör antagonistlerinin kaşıntı üzerine Etkisi 30

Şekil 18. Endokannabinoid sistem modülatörü URB 597'nin antipruritik etkisinde kannabinoid reseptörlerinin rolü 31

Şekil 19. Endokannabinoid sistem modülatörü JZL 184'ün antipruritik etkisinde kannabinoid reseptörlerinin rolü 32

ÖZGEÇMİŞ

1982 yılında Münih Almanya'da doğdum. İlk ve orta eğitimimi İzmir'de tamamladım. 2001 yılında girdiğim Akdeniz Üniversitesi Sağlık Yüksek Okulu Hemşirelik lisans bölümünden 2005 yılında mezun oldum. 2011 yılında Trakya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Farmakoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimime başladım ve yüksek lisans eğitimime halen devam etmekteyim.

EKLER

Ek 1

T.C.

TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU KARARLARI

EDİRNE

Oturum Sayısı: 05 **Karar Tarihi: 03.07.2012**
KARAR NO: 2012.05.08

Yürütücülüğünü Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi öğretim üyesi Yrd. Doç. Dr. Özgür GÜNDÜZ'ün yaptığı Yüksek Lisans Öğr. Hem. Nurcan ÇALIMLI'nın tezi olarak planlanan TÜHDYEK-2012/57 protokol nolu "**Serotoninle oluşturulan kaşıntı üzerine endokannabinoid sistem modülatörlerinin rolü** ***(The role of endocannabinoid system modulators in serotonin-induced itch)***"başlıklı çalışma hakkında görüşüldü; araştırmanın amaç, yaklaşım, gereç ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmesi sonucunda; Hayvan Hakları Evrensel Bildirgesi ve etik kurallara uygun olarak hazırlandığına ve çalışmanın yapılabileceğine mevcudun oy birliği ile karar verilmiştir.

Ünvani/Adı/Soyadı	Araştırma ile İlişki	Toplantı Katılımı	İmza
Yrd.Doç.Dr. Burhan AKSU Tıp Fakültesi Öğretim Üyesi	☐ var ☐ yok	☐ evet ☐ hayır	
Yrd.Doç. Dr. Hayati ARDA Fen-Edebiyat Fakültesi Öğretim Üyesi	☐ var ☐ yok	☐ evet ☐ hayır	
Vet.Hek. Ziya ÇUKUR Veteriner Hekim	☐ var ☐ yok	☐ evet ☐ hayır	
Hüseyin KOÇ Sivil Toplum Örgütü Üyesi Sivi Üye	☐ var ☐ yok	☐ evet ☐ hayır	
Yrd.Doç.Dr. Beytullah ÖZKAN Fen-Edebiyat Fakültesi Öğretim Üyesi	☐ var ☑ yok	☒ evet ☐ hayır	
Yrd.Doç.Dr. Y. Atakan SEZER Tıp Fakültesi Öğretim Üyesi	☐ var ☐ yok	☐ evet ☐ hayır	
Doç. Dr. Enis ULUÇAM Tıp Fakültesi Öğretim Üyesi	☐ var ☒ yok	☒ evet ☐ hayır	
Yrd.Doç.Dr.Hakan GÜRKAN Tıp Fakültesi Öğretim Üyesi	☐ var ☒ yok	☒ evet ☐ hayır	
Osman GÜLTEKİN Sivil Üye	☐ var ☐ yok	☐ evet ☐ hayır	