**TEZ ONAYI**

| | |
|---|---|
| Kurum | : Marmara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü |
| Programın seviyesi | : Yüksek Lisans |
| Anabilim Dalı | : Tıbbi Farmakoloji |
| Tez Sahibi | : Betilay TOPKARA |
| Tez Başlığı | : Gamma amino-bütirikasit Agonistlerinin Nükleus Akümbens Kabuk Bölgesine Lokal Olarak Uygulanmasının Naloksonla İndüklenmiş Morfin Yoksunluğı Üzerindeki Etkisi |
| Sınav Yeri | : Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı |
| Sınav Tarihi | : 22/10/2013 |

Tez tarafımızdan okunmuş, kapsam ve kalite yönünden Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

| **Danışman (Unvan, Adı, Soyadı)** | **Kurumu** | **İmza** |
|---|---|---|
| Doç. Dr. Hasan R. YANANLI | Marmara Üniversitesi Tıbbi Farmakoloji Ab.D. | |
| **Sınav Jüri Üyeleri (Unvan, Adı, Soyadı)** | | |
| Prof. Dr. M. Zafer GÖREN | Marmara Üniversitesi Tıbbi Farmakoloji Ab.D. | |
| Prof. Dr. Göksel ŞENER | Marmara Üniversitesi Eczacılık Farmakoloji Ab.D. | |

Yukarıdaki jüri kararı Enstitü Yönetim Kurulu'nun .31../.10./2013 tarih ve 114 sayılı kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Feyza ARICIOĞLU
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü Vekili
Prof. Dr. İnci ALİCAN

## BEYAN FORMU

Bu tezin kendi çalışmam olduğunu, planlanmasından yazımına kadar hiçbir aşamasında etik dışı davranışımın olmadığını, tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları kaynaklar listesine aldığımı, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

Betilay TOPKARA

# TEŞEKKÜRLER

Yüksek lisans eğitimim boyunca yanında çalışmaktan mutluluk ve onur duyduğum, bilgisi ve yüksek öngörüsüyle bana her daim yol gösterip yardımcı olan, desteğini her zaman hissettiren değerli danışman hocam

*Doç. Dr. Hasan Raci YANANLI'ya,*

Farmakoloji eğitimim boyunca yanında çalışmaktan onur duyduğum, her konuda göstermiş olduğu katkı ve hoşgörülü yaklaşımından dolayı çok değerli hocam

*Prof. Dr. M. Zafer GÖREN'e,*

Eğitimim süresince desteğini ve ihtiyaç duyduğum anlarda yardımlarını esirgemeyen, engin bilgi birikimini her daim içtenlikle paylaşan değerli hocam

*Prof. Dr. M. Kemal BERKMAN'a,*

Farmakoloji eğitimim boyunca her türlü konuda görüşlerini aldığım, danışabildiğim ve desteklerini hissettiğim değerli hocalarım

*Prof. Dr. Filiz ONAT'a, Prof. Dr. Ahmet AKICI'ya, Prof. Dr. Atila KARAALP'e ve Doç. Dr. Rezzan GÜLHAN'a,*

Hayatıma girmelerinden mutluluk duyduğum, yardımları ve arkadaşlıklarını benden esirgemeyen

*Uzm. Dr. Medine Gülçebi İDRİSOĞLU'na , Ece İSKENDER'e, Dr. Kutluhan TEZCAN'a, Başak DÖNERTAŞ'a, Sema KETENCİ'ye, Volkan AYDIN'a, Emine ÖZDAMAR'a, Tuğba ERYİĞİT'e, Afsaneh AZHARİ'ye, Dr. Mahluga JAFAROVA DEMİRKAPU'ya, Dr.Gökçe ACET'e, Şule BERKAY ve Nurettin DEMİRCİ'ye,*

Farmakoloji eğitimim boyunca yardımını esirgemeyen, beraber çalışmaktan mutluluk duyduğum

*Dr. Eren SAKALLI'ya,*

Hayatımın her aşamasında yanımda olmasından büyük mutluluk duyduğum değerli dostum

*Melisa KALELİ'ye,*

Bugüne kadar her konuda beni destekleyen, her zaman yanımda olan, sabır, özveri ve anlayışlarını esirgemeyen

*Aileme ve dostlarıma*

teşekkür ederim.

Betilay TOPKARA

Bu tez Marmara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu Başkanlığı tarafından SAG-C-YLP-110412-0064 numaralı proje ile desteklenmiştir.

# İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜRLER ..... iii

TABLO LİSTESİ ..... x

1.ÖZET ..... 1

2.SUMMARY ..... 2

3.GİRİŞ ve AMAÇ ..... 3

4.GENEL BİLGİLER ..... 5

4.1. Morfin ..... 5

4.2. Madde Kötüye Kullanımı ve Bağımlılık ..... 7

4.2.1.Tolerans ve Duyarlılaşma Kavramları ..... 11

4.3.Bağımlılık Tipleri ve Bağımlılık Yapan Maddeler ..... 12

4.3.1. Morfin (Opioid) Tipi Bağımlılık ..... 12

4.4.Endojen Opioidler ve Opioid Reseptörleri ..... 17

4.5.Opioid Sinyal Transdüksiyonu ..... 19

4.6.GABA (gama-aminobütirik asit) ..... 21

4.6.1. Baklofen ve Musimol ..... 27

4.7.Bağımlılıkla ilgili Beyin Bölgeleri ..... 30

4.7.1.Nükleus Akümbensin Madde Bağımlılığındaki Yeri ..... 31

5.GEREÇ ve YÖNTEM ..... 33

5.1.Hayvanların Özellikleri ..... 33

5.2.Morfin Bağımlılığı Oluşturma ve Yoksunluk Bulgularının Değerlendirilmesi ..... 33

5.3.Lokomotor Aktivite Ölçüm Deneyleri ..... 35

5.4.Stereotaksik Cerrahi Yöntemi ..... 37

5.5.Maddeler ve Mikroenjeksiyon ..... 37

5.6.Histolojik Doğrulama ..... 38

5.7.Deney Protokolü ..... 39

5.7.1. Morfin Bağımlılık Modeli Oluşturulmuş Grup ..... 40

5.7.2.Morfin Bağımlılık Modeli Oluşturulmamış Grup (Kontrol Grubu) ..... 41

5.8. Verilerin Analizi ..... 43

6. BULGULAR ..... 44

6.1. Lokomotor Aktivite Ölçümleri ..... 44

6.1.1. Morfin Yoksunluğunun Lokomotor Aktivite Üzerine Etkisi ..... 44

6.1.2. Morfin Bağımlısı Olmayan Sıçanlarda NAc'nin Kabuk Bölgesine Baklofen (62,5, 125, 250 ng) Uygulamalarının Lokomotor Aktivite Üzerine Etkisi ..... 46

6.1.3.Nükleus Akümbens Kabuk Bölgesine Uygulanan Baklofen (62,5, 125 ng) ve Musimolün Naloksonla İndüklenen Morfin Yoksunluğu Esnasında Lokomotor Aktivite Davranışları Üzerine Etkisi ..... 48

6.1.4. Nükleus Akümbens Kabuk ve Çekirdek Bölgesine Uygulanan Baklofenin (62,5 ng) Naloksonla İndüklenen Morfin Yoksunluğu Sendromu Esnasında LokomotorAktivite Davranışı Üzerine Etkisi ..... 50

6.2. Davranışsal Bulgular ..... 54

6.2.1. Nükleus Akümbens Kabuk Bölgesine Uygulanan Baklofen (62,5, 125 ng) ve Musimolün (50 ng) Yoksunluk Bulguları Üzerine Etkisi ..... 54

6.2.2. Nükleus Akümbens Kabuk ve Çekirdek Bölgesine Uygulanan Baklofenin (62,5 ng) Yoksunluk Bulguları Üzerine Etkisi ..... 57

7.TARTIŞMA ve SONUÇLAR ..... 61

8.KAYNAKLAR ..... 67

9.EKLER ..... 75

EK 1 ..... 75

EK 2 ..... 76

# KISALTMALAR VE SİMGELER

| | |
|---|---|
| **GABA** | **:** Gamma-Aminobütirik asit |
| **δ** | **:** Delta |
| **DA** | **:** Dopamin |
| **κ** | **:** Kappa |
| **μ** | **:** Mü |
| **MOR** | **:**Mü Opioid Reseptörleri |
| **NAc** | **:** Nükleus Akümbens |
| **NMDA** | **:**N-metil-D-aspartik asit |
| **sAMP** | **:** Siklik Adenozin Monofosfat |
| **VTA** | **:** Ventral Tegmental Alan |
| **VP** | **:** Ventral Pallidum |

# ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1 : Morfinin metabolitleri ..... 6

Şekil 2: Opioid sinyalizasyonu ..... 20

Şekil 3: $GABA_A$ reseptörlerinin izoformunun gösterimi ..... 24

Şekil 4: $GABA_B$ reseptörlerinin yapısı ve sinyalizasyonu ..... 25

Şekil 5: $GABA_B$ reseptörlerinin lokalizasyonu . ..... 26

Şekil 6: Baklofenin kimyasal yapısı ..... 27

Şekil 7: Bağımlılığın altında yatan iletişim ağı döngüsü için bir model ..... 31

Şekil 8: Lokomotor Aktivite Ölçüm Cihazı ..... 36

Şekil 9: Bazal lokomotor aktivite ölçümü, iki morfin peleti öncesi lokomotor aktivite ölçümü ve naloksonla indüklenen morfin yoksunluğunda lokomotor aktivite ölçümlerinin birbiri ile kıyaslanması. ..... 46

Şekil 10: NAc kabuk bölgesine bilateral olarak yBOS, baklofen 62,5 ng, baklofen 125 ng ve baklofen 250 ng uygulanmasının lokomotor aktivite ölçümleri üzerine etkisi. . ..... 48

Şekil 11: NAc kabuk bölgesine bilateral olarak yBOS, baklofen 62,5 ng, baklofen 125 ng ve musimol 50 ng uygulamalarının naloksonla indüklenen morfin yoksunluğu esnasında lokomotor aktivite ölçümleri üzerine etkisi.. ..... 50

Şekil 12: NAc çekirdek bölgesine yBOS, baklofen 62,5 ng veya NAc kabuk bölgesine yBOS, baklofen 62,5 ng uygulamalarının naloksonla indüklenen morfin yoksunluk sendromu sırasındaki stereotipik hareket sayısı üzerindeki etkisi. ..... 51

Şekil 13: NAc çekirdek bölgesine yBOS, baklofen 62,5 ng ve NAc kabuk bölgesine yBOS, baklofen 62,5 ng uygulamalarının naloksonla tetiklenen morfin yoksunluk sendromu sırasındaki ambulatuvar hareket sayısı üzerindeki etkisi.. ..... 52

Şekil 14: NAc çekirdek bölgesine yBOS, baklofen 62,5 ng ve NAc kabuk bölgesine yBOS, baklofen 62,5 ng uygulamalarının naloksonla tetiklenen morfin yoksunluk sendromu sırasındaki vertikal hareket sayısı üzerindeki etkisi. ..... 52

Şekil 15: NAc çekirdek bölgesine yBOS, baklofen 62,5 ng ve NAc kabuk bölgesine yBOS, baklofen 62,5 ng uygulamalarının naloksonla tetiklenen morfin yoksunluk sendromu sırasındakat edilen mesafe üzerindeki etkisi.. ..... 53

Şekil 16: NAc kabuk bölgesine yBOS, baklofen 62,5 ng, baklofen 125 ng, musimol 50 ng uygulamalarının morfin peleti yerleştirilmiş sıçanlarda, nalokson ile indüklenen yoksunluk belirtilerinden zıplama üzerine etkisi. ..... 55

Şekil 17: NAc kabuk bölgesine yBOS, baklofen 62,5 ng, baklofen 125 ng, musimol 50 ng uygulamalarının morfin peleti yerleştirilmiş sıçanlarda, nalokson ile indüklenen yoksunluk belirtilerinden ıslak köpek silkinmesi üzerine etkisi. ..... 55

Şekil 18: NAc kabuk bölgesine yBOS, baklofen 62,5 ng, baklofen 125 ng, musimol 50 ng uygulamalarının morfin peleti yerleştirilmiş sıçanlarda, naloksonile indüklenen yoksunluk belirtilerinin sonuçlarından ağırlık kaybı üzerine etkisi. ..... 56

Şekil 19: NAc kabuk bölgesine yBOS, baklofen 62,5 ng, baklofen 125 ng, musimol 50 ng uygulamalarının morfin peleti yerleştirilmiş sıçanlarda, nalokson ile indüklenen yoksunluk belirtilerinden diş gıcırdatma şiddeti üzerine etkisi..... 57

Şekil 20: NAc çekirdek bölgesine yBOS,baklofen 62,5 ng ve NAc kabuk bölgesine yBOS, baklofen 62,5 ng uygulamalarının morfin peleti yerleştirilmiş sıçanlarda, nalokson ile indüklenen yoksunluk belirtilerinden zıplama üzerindeki etkileri.. ..... 58

Şekil 21: NAc çekirdek bölgesine yBOS, baklofen 62,5 ng ve NAc kabuk bölgesine yBOS, baklofen 62,5 ng uygulamalarının morfin peleti yerleştirilmiş sıçanlarda, nalokson ile indüklenen yoksunluk belirtilerinden ıslak köpek silkinmesi. ..... 59

Şekil 22: NAc çekirdek bölgesine yBOS, baklofen 62,5 ng ve NAc kabuk bölgesine yBOS, baklofen 62,5 ng uygulamalarının morfin peleti yerleştirilmiş sıçanlarda, nalokson ile indüklenen yoksunluk belirtilerinin sonuçlarından ağırlık kaybı üzerine etkisi. ..... 60

Şekil 23: NAc çekirdek bölgesine yBOS, baklofen 62,5 ng ve NAc kabuk bölgesine yBOS, baklofen 62,5 ng uygulamalarının morfin peleti yerleştirilmiş sıçanlarda, nalokson ile indüklenen yoksunluk belirtilerinden diş gıcırdatma şiddeti üzerine etkisi. ..... 60

# TABLO LİSTESİ

Tablo 1: DSM-IV-TR ve ICD-10'un Alkol ve Madde Kötüye Kullanımı Tanı Kriterleri ..... 9

Tablo 2 : DSM-IV-TR ve ICD-10'un Madde Bağımlılık Tanı Kriterleri ..... 10

Tablo 3: Narkotik ajanın son dozunu takiben ortaya çıkan yoksunluk belirtileri ..... 16

Tablo 4: Opioid reseptörlerin analjezik etkileri ..... 21

Tablo 5: GABA nörotransmitinin özeti..... 23

Tablo 6: Deney grupları ve gruplardaki sıçan dağılımları ..... 39

Tablo 7: Deney protokolü ..... 42

# 1.ÖZET

Opioid bağımlılığı ciddi bir sağlık sorunudur. Opioidlerin kronik kullanımı bağımlılık ve toleransa neden olur. İlaca erişim engellendiğinde/bırakıldığında yoksunluk sendromu adı verilen çeşitli fizyolojik belirtiler ortaya çıkar. Yapılan çalışmalarda nükleus akümbensin (NAc) madde bağımlılığında önemli bir merkez olduğu; GABA (Gama-Aminobütirik asit) reseptörlerinin de kötüye kullanılan ilaçların mekanizmasında modülatör rol oynadığını gösterilmiştir. Bu çalışmanın amacı naloksonla tetiklenmiş morfin yoksunluğunda, GABA agonistlerinin NAc'ye uygulanmasının yoksunluk belirtileri üzerindeki etkisinin incelenmesidir. Çalışmada Sprague-Dawley sıçanlar kullanılmış, sıçanların NAc kabuk/çekirdek bölgesine stereotaksik cerrahi yöntemi ile bilateral klavuz kanüller yerleştirilmiştir. 75 mg baz morfin içeren 3 pelet sıçanların cilt altına hafif eter anestezisi altında 1.gün bir ve 3. gün iki adet olmak üzere implante edilmiş, 5.günde NAc'ye enjeksiyonlar (baklofen hidroklorür (62,5, 125 ng) ya da musimol hidrobromür (50 ng)) yapılmış, ardından nalokson uygulanarak morfin yoksunluğu tetiklenmiştir. NAc kabuk bölgesine uygulanan 62,5 ng baklofenin morfin yoksunluğundaki zıplama davranışını kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı derecede azalttığı, NAc çekirdek bölgesine uygulanan 62,5 ng baklofenin ise yoksunluk belirtilerinden zıplama, ıslak köpek titremesi ve ağırlık kaybını anlamlı derecede azalttığı saptanmıştır. NAc kabuk bölgesine uygulanan 62,5 ng baklofen morfin bağımlısı sıçanlarda lokomotor aktivite değişkenlerinden ambulatuvar, vertikal hareketlerde ve kat edilen mesafede kontrole göre anlamlı bir azalmaya neden olmuş, NAc çekirdek bölgesine uygulanan 62,5 ng baklofen ise vertikal hareketlerde istatistiksel olarak anlamlı bir azalmaya neden olmuştur. NAc kabuk bölgesine uygulanan musimol ise herhangi bir değişkende istatistiksel olarak anlamlı bir farka neden olmamıştır. Bu bulgular, NAc'deki GABAerjik iletimin morfin yoksunluğunun çeşitli belirtileri üzerinde etkili olduğunu ve opioid bağımlılığı tedavisinde potansiyel bir mekanizma olarak araştırılması gerektiğini göstermektedir.

**Anahtar kelimeler**: Baklofen, GABA, NAc, morfin yoksunluk sendromu, musimol

## 2.SUMMARY

**Administration of GABA agonists into nucleus accumbens shell on naloxone induced morphine withdrawal**

Opioid addiction is a serious public health problem. Chronic use of opioids results in tolerance to and dependence on the drug. Withdrawal syndrome is characterized by a number of physiological symptoms after the rapid cease of drugs. Studies have shown that the NAc is a crucial region in drug addiction and GABA receptors playa modulatory role in the mechanism of action of different drugs of abuse. The aim of this project is to investigate the effects of local GABA agonists in NAc during naloxone precipitated withdrawal in morphine dependent rats. Sprague-Dawley rats were stereotaxically implanted with a guide cannula to NAc shell/core and fixed to the skull.Morphine addiction was induced by subcutaneous morphine pellet (75 mg base) implantation. Three pellets were implanted on successive days, namely one on the first and two on the third day. On the fifth day local microinjections into NAc (baclofen hydrochloride (62.5, 125 ng), muscimol hydrobromide (50ng)) were administered bilaterally through guide cannulas. Baclofen microinjection into NAc shell/core (62.5 ng) significantly decreased the number of jumpings and into NAc core also significantly decreased the number of wet dog shakes and weight loss as compared to aCSF. Baclofen microinfection into NAc core/shell decreased vertical activity and into NAc shell also decreased ambulatory activity and distance as compared to aCSF. Muscimol had no effect on withdrawal symptoms. Our findings suggest that GABAergic transmission in NAc have some roles over some of the opioid withdrawal signs and should be examined as a potential mechanism that can be exploited for the treatment of opioid addiction.

**Keywords**: Baclofen, GABA, NAc, morfin withdrawal syndrome, muscimol

# 3.GİRİŞ ve AMAÇ

Madde bağımlılığı, tüm dünyada önemli sağlık problemlerinden biridir. Madde bağımlılığının ciddi bir alt bölümünü oluşturan opioid bağımlılığı da toplumda sosyal ve ekonomik açıdan büyük sorun olmaktadır (Hall, Doran, Degenhardt and Shepard 2006). Dünya çapında 80 milyon kişinin eroin veya diğer opioid maddeleri kullandığı tahmin edilmektedir (United Nations Office on Drugs and Crime 2004)

Madde bağımlılığı, psikoaktif maddelerin kullanımına bağlı olarak beyin fonksiyonlarında değişim sonucu oluşan bir bozukluktur. Bu maddeler beyindeki normal algısal, duygusal, dürtüsel süreçleri etkiler (DSÖ, WHO 2005). En yaygın kullanılan bağımlılık yapıcı ilaçlar; opioidler (morfin benzeri ilaçlar), barbitürat ve benzodiazepin türevi ilaçlar, psikomotor stimülanlar (kokain ve amfetaminler), fensiklidin ve benzeri ilaçlar, nikotin, kanabinoidler, etil alkol, inhalanlardır (Hyman and Malenka 2001).

Opiyoidler μ, κ ve/veya δ reseptörlerini doğrudan uyararak endojen opioidlerin (enkefalin, dinorfin, endomorfin) etkilerini taklit eden maddelerdir. Bu reseptörlerin uyarılması öfori, analjezi, sedasyon, diürez, konstipasyon veya solunum depresyonuna neden olur. Morfin ve benzeri opioidlerin pozitif pekiştirici etkisinden ağırlıklı olarak μ reseptörleri sorumludur (Pierce and Kumerasan 2006).

Morfin, ağrı kesici olarak ve birtakım terapötik endikasyonların tedavisinde kullanılmaktadır. Ancak morfine tekrarlayan dozlarda maruz kalmak tolerans, psikolojik ve fiziksel bağımlılığa sebep olmakta, ilacın kesilmesinden sonra ise yoksunluk semptomları karakterize edilmektedir (Koob and Le Moal 2006).

Mezolimbik dopaminerjik sistem nöronlarının aktivasyonu keyif verici bir etki sağlamaktadır ve bu tüm bağımlılık yapan maddeler için geçerlidir. Çok sayıda çalışma ventral tegmental alandan (VTA) nükleus akumbense (NAc) projeksiyon yapan mezolimbik dopaminerjik sistemin opioid pekiştirilmesinin başlamasında kritik bir öneme sahip olduğunu göstermiştir (Mansvelder, De Rover, McGehee and Brussaard 2003).

Bu çalışmada hedef bölge olarak seçilen NAc ödül ve pekiştirmeyle ilgili en iyi bilinen beyin bölgelerinden biridir (Koob and Bloom 1988). NAc, kabuk *(shell)* ve çekirdek *(core)* olarak iki alt bölüme ayrılır. Her iki alt bölümde öğrenme ve motivasyonel davranışlarda önemli rol oynamaktadır (Carlezon and Thomas 2008).

Opioidlerin, VTA'daki GABAerjik internöronları inhibe ettiği ve GABA salınımını azalttığı bununda VTA daki dopaminerjik nöronları disinhibe ederek NAc'de dopamin salınımına yol açtığı düşünülmektedir (Xi and Stein 2002). Yapılan pek çok çalışma GABAerjik sistemin opioid bağımlılığındaki rolünü ortaya koymuştur. GABA agonistleri baklofen ve musimolün ön tedavi olarak sistemik uygulanmasının sıçanlarda doza bağımlı olarak morfin kendine verme davranışını azalttığı saptanmış ve bu etkinin GABA antagonistleri SCH 50911 ve bikukulin ile geri döndüğü görülmüştür (Yoon et al 2007). Baklofenin sistemik olarak uygulanmasının, nalokson ile indüklenen morfin yoksunluğu sendromunda farelerde önemli bir yoksunluk belirtisi olan sıçrama davranışını azalttığı gözlemlenmiştir (Zarrindash and Mousa-Ahmadi 1999). Başka bir çalışmada ise yine baklofenin morfin yoksunluğunda sıçanlarda stereotipik kafa sallamaları, çiğneme, pitozis, diş gıcırdatma gibi yoksunluk belirtilerinin anlamlı derecede azalttığı saptanmıştır (Bexis, Ong and White 2001).

Bu çalışmada, bu bilgiler ışığında GABA agonistleri musimol ve baklofenin nükleus akümbense uygulanmasının morfin yoksunluğundaki davranışsal bulgulara ve lokomotor aktiviteye etkisi incelenmiştir.

# 4.GENEL BİLGİLER

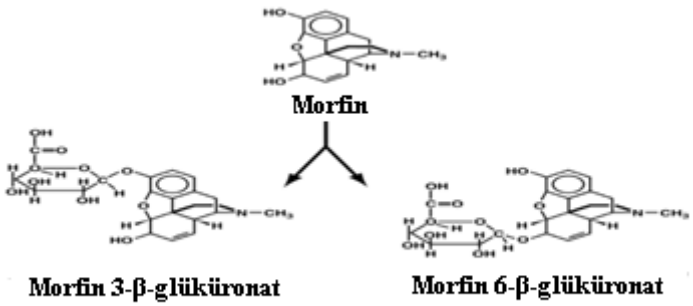
## 4.1. Morfin

Morfin güçlü bir opioid analjeziktir. Opiodlerin adını aldığı opyum (afyon), haşhaş (*papaver somniferum*) bitkisinin yaş meyve kapsülünün çizilmesi ile çıkan özsuyunun kurutulmuş şeklidir; bu özsuyun içinde 20'den fazla farklı alkaloid vardır ve %10'u kadarını morfin oluşturmaktadır (Waldhoer, Bartlett and Whistler 2004).

Opioidler tıpta kullanılan en etkili analjeziklerdir. Kullanımları uyuşukluk, sedasyon haline neden olur. Santral sinir sistemi üzerinde yaygın depresif etki yaparlar, bağımlılık yapma potansiyelleri yüksektir. Bu gruptaki ilaçlara narkotik analjezikler olarak da adlandırılır. Morfin ve kodein gibi doğal alkoloidlerlerle onların yarı-sentetik türevlerine opiyatlar denir (Koob and Le Moal 2006, Kayaalp 2012).

Morfin ilk defa 1806 yılında Frederich Serturner tarafından saflaştırılmıştır, santral sinir sistemi üzerinde terapötik olarak en önemli etkisi analjezidir. Antitusif etkiye de sahiptir. Solunumu baskılaması, bağımlılık yapması ve bırakıldığında yoksunluk belirtilerine neden olması kullanımını kısıtlayan en önemli faktörlerdendir (Koob and Le Moal 2006; Waldhoer, Bartlett and Whistler 2004).

Morfinin farmakokinetiği: Morfin plazma proteinlerine %25-35 oranında bağlanır. Karaciğerde büyük kısmı morfin 3-β-glüküronat ve az bir kısmı ise morfin-6β-glüküronata dönüşür (Osbourne Joel, Trew and Slevin 1990). Morfin 3-β- ve 6-β-glüküronat polar olmasına rağmen kan beyin bariyerini geçer (Christie, Williams and North 1987). Morfin 6-glüküronat aktif bir metabolittir ve farmakolojik etkileri morfininkinden ayırt edilemez. Sistemik olarak verilen morfin 6-β -glüküronat morfinin 2 katı güçlüdür. Kronik kullanımda morfinin analjezik etkisinin çoğundan sorumludur (Osbourne et al 1988). Morfin 3-β-glüküronat ise inaktif bir metabolittir, opioid reseptörlerine afinitesi azdır fakat morfinin eksitatör etkisinde payı vardır (Penson et al 2000).




**Şekil 1** : Morfinin metabolitleri **(**Koob and Le Moal 2006**)**

Morfin oral yoldan alındığında mide-barsak kanalından tamamen absorbe edilir; fakat bu yoldan alınan morfinin önemli bir kısmı karaciğerden ilk geçişte eliminasyona uğradığından biyoyararlanımı, kan düzeyi ve etki gücü düşük olur. Morfin genellikle 10-15 mg dozunda intramüsküler veya subkutan enjeksiyon yolu ile uygulanır. Doku içinden hızlı ve tam olarak absorbe edilir. Etkisi ortalama 20 dakikada başlar, 45-90 dakikada maksimum konsantrasyona erişir ve etkisi 4-6 saat kadar devam eder. İntravenöz yoldan uygulandığında analjezik etkisi 1-2 dakika içinde başlar, 10-20 dakikada maksimuma ulaşır ve kısa sürer. Verilen morfin dozunun %90'ı 24 saat içinde elimine edilir (Koob and Le Moal 2006, Kayaaalp 2012).

Morfin vücut sıcaklığında, hipofiz bezi fonksiyonlarında azalma, solunumda, öksürük refleksinde baskılanma, mide bulantısına neden olur (Gutstein and Akil 2001). Morfin ayrıca histamin salınımına neden olmakta ve bu etkisinden dolayı da bronkospazm ve hipotansiyon gibi yan etkileri ortaya çıkarmaktadır. (Trescot, Datta, Lee and Hansen 2008).

## 4.2. Madde Kötüye Kullanımı ve Bağımlılık

Tarihi süreçte bağımlılığın tanımı fiziksel bağımlılığın tanımlanmasıyla başlamıştır. Himmelsbach fiziksel bağımlılığı "geçmişteki uzamış ilaç kullanımının bir sonucu olarak, fizyolojik denge durumunun sağlanması için yeterli miktarda ilacın düzenli olarak verilmesi gerekliliği" olarak tarif etmiş ve fiziksel bağımlılık tanısının objektif olarak konulmasının tek yolunun ilacın kesilmesiyle ortaya çıkan karakteristik yoksunluk sendromunun gösterilmesi olduğunu belirtmiştir (Himmelsbach 1943).

Fiziksel bağımlılık kavramının bağımlılığın çoğu özelliğini kapsamaması üzerine ikinci bir kavram olarak psişik bağımlılık tanımlanmıştır. Psişik bağımlılık: "İlacın keyif oluşturmak ya da rahatsız duygu durumundan kurtulmak için periyodik veya sürekli olarak kullanılmasına neden olan psikolojik bir itkinin varlığı" olarak tanımlanmıştır (Eddy et al 1965).

Madde kullanımı günümüzde maddenin kontrollü ya da sosyal kullanımı, maddenin kötüye kullanımı, ve madde bağımlılığı olmak üzere 3 grupta incelenmektedir.

Madde kötüye kullanımı, belirli psikoaktif ilaçların insanda yaptığı keyif verici davranışsal etkileri nedeniyle tıbbi bakımdan gereksiz bir şekilde ve kişinin kendi inisiyatifiyle kullanmasıdır. Madde kötüye kullanımında, beyinde psişik bağımlılık ve fiziksel bağımlılık oluşması ile ilişkili davranışsal ve somatik fonksiyonları düzenleyen merkezlerde biyolojik adaptasyon olaylarının meydana gelmediği ya da henüz belirgin olmadığı kabul edilir (Kayaalp 2012).

Madde bağımlılığı; ilaç arama ve alma dürtüsü, ilaç alımını sınırlandırmada kontrol kaybı, ilaca erişim engellendiğinde negatif duygudurum belirmesi (disfori, anksiyete, sinirlilik gibi) ile karakterize kronik ve tekrar eden bir bozukluktur (Koob and Le Moal 1997). Bağımlılık çoğu zaman madde kötüye kullanımının bir sonraki aşamasıdır.

Madde bağımlılığının ve ve madde kötüye kullanımının tanı kriterleri DSM-IV-TR (*Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders Fourth Edition Text*

*Revision*-Ruhsal Bozuklukların Tanısal ve Sayımsal Elkitabı 4. Baskı Metin Revizyonu 2007)'de açıklanmıştır.

DSM-IV-TR madde bağımlılığının temel özelliklerini, kişinin maddeyle ilişkili önemli sorunlar yaşamasına rağmen maddeyi kullanmaya devam ettiğine işaret eden kognitif, davranışsal ve fizyolojik semptomlar kümesi olarak tanımlamıştır. Maddenin tekrarlanan kullanımı santral sinir sisteminde uyumsal değişikliklere neden olur ve bu değişiklikler tolerans, yoksunluk belirtileri ve kompülsif madde kullanımı ile sonuçlanabilmektedir. DSM-IV-TR'de tolerans ve yoksunluk kavramları bağımlılığın tanısında önemli kriterlerlerdir.

Madde kötüye kullanımının DSM-IV-TR kriterleri Tablo 1'de ve madde bağımlılığının tanı kriterleri Tablo 2'de verilmiştir.

**Tablo 1:** DSM-IV-TR ve ICD-10*' un Alkol ve Madde Kötüye Kullanımı Tanı Kriterleri

| DSM-IV | ICD-10 |
|---|---|
| **A.** 12 aylık period içerisinde aşağıdakilerden bir veya birden fazlasını içeren, klinik durumda bozulmaya yol açan madde kullanım paterni.<br>**1.** İş, okul ve ev hayatındaki yükümlülüklerin yerine getirilmesinin engellemesine yol açan tekrarlayıcı madde kullanımı.<br>**2.** Kullanımının fiziksel zarara sebep olabilecek koşullarda tekrarlayıcı madde kullanımı.<br>**3.** Tekrarlayıcı madde kullanılmasından kaynaklanan yasal sorunlarla karşılaşılması.<br>**4.** Maddenin etkisiyle sosyal ve bireyler arası ilişkilerde kalıcı ya da tekrarlayıcı sorunlar oluşmasına yada var olan sorunları artmasına rağmen madde kullanımına devam edilmesi.<br>**B.** Semptomlar söz konusu madde grubu için bağımlılık kriterlerini sağlamamalıdır. | **A.** Sağlığa zarar veren madde kullanım paterni.<br>Söz konusu zarar fiziksel ya da mental olabilir. Tanıda, kullanıcının sağlığına olan zararın fiziksel ya da mental olduğu belirtilmelidir.<br>**B.** Semptomlar söz konusu madde grubu için bağımlılık kriterlerini sağlamamalıdır. |

*ICD 10 (*10th revision of the International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems*-Hastalıklar ve Sağlık Problemlerinin Uluslararası İstatistiksel Sınıflaması Onuncu Revizyon)

**Tablo 2:** DSM-IV-TR ve ICD-10'un Madde Bağımlılık Tanı Kriterleri

| | DSM-IV-TR | ICD-10 |
|---|---|---|
| Sınıflandırma kriterleri | 12 aylık periyod içerisinde aşağıdakilerden üç veya daha fazlasını içeren, klinik durumda bozulmaya yol açan madde kullanım paterni. | Geçen yıl içerisinde aşağıdakilerden 3 tanesi yaşanmış ya da gösterilmiş olmalıdır. |
| Tolerans | İstenilen etkiyi ya da intoksikasyonu elde edebilmek için gittikçe daha fazla maddeye ihtiyaç duyulması; ya da aynı miktarda maddenin kullanılmasıyla gittikçe azalan etkinlik. | Tolerans kanıtı, başlangıçta düşük dozlarda sağlanan etkiyi elde edebilmek için doz yükseltmeye ihtiyaç duyulması. |
| Yoksunluk (çekilme sendromu) | Madde için karakteristik yoksunluk sendromu ya da yoksunluk sendromunu dindirme ya da bu sendromdan kaçınma için söz konusu maddenin veya benzer maddelerin kullanımı. | Madde kullanımının kesilmesi veya azaltılmasıyla ortaya çıkan, kullanılan maddeye özgü fizyolojik yoksunluk durumu ya da bu sendromdan kaçınma için söz konusu maddenin veya benzer maddelerin kullanımı. |
| Kontrol kaybı | Madde kullanımını bırakma isteği ya da bir veya daha fazla başarısız bırakma girişimi.<br>Maddenin planlanandan daha fazla miktarda ya da daha uzun süre kullanımı. | Maddeye başlangıç, bitiş ve kullanım seviyesinin kontrolündeki zorluklar. |
| Hayat aktivitelerin ihmali | Önemli sosyal, iş ya da dinlenme aktivitelerinin madde kullanımı sebebiyle azaltılması ya da terk edilmesi. | Alternatif zevklerin veya ilgilerin gittikçe artan bir şekilde ihmali. |
| Harcanan zaman | Kullanılan maddeyi temin etme, kullanma ve etkisinden arınma için büyük miktarda zaman harcama. | Kullanılan maddeyi temin etme, kullanma ve etkisinden arınma için büyük miktarda zaman harcama |
| Sorunlara rağmen kullanıma devam edilmesi | Kalıcı ya da tekrarlayıcı fiziksel ya da psikolojik problemler oluşturduğu ya da var olan sorunları arttırdığı bilinmesine rağmen madde kullanımına devam edilmesi. | Madde kullanımının açık bir şekilde fizyolojik ya da psikolojik zararları olmasına rağmen, madde kullanımına devam edilmesi. |
| Kompülsif kullanım | Yok | Madde kullanımı için güçlü istek veya kompülsif duygunun varlığı. |
| Bağımlılık alt grubu için kriterler | Fiziksel bağımlılık: Tolerans ve yoksunluk kanıtının varlığı<br>Fiziksel bağımlılığın olmaması: Tolerans ve yoksunluk kanıtının olmaması | Yok |

### 4.2.1.Tolerans ve Duyarlılaşma Kavramları

Tolerans, maddenin intoksikasyonu veya istenilen etkisi için gereken madde miktarının önemli ölçüde artması ya da aynı miktarda maddenin devam eden kullanımı sırasında ortaya çıkan etkinin önemli ölçüde azalmasıdır (DSM-IV-TR 2007).

Kötüye kullanılan maddelere karşı gelişen tolerans doğuştan veya kazanılmış olur. Toleransın hızı ve derecesi ilaca göre değişkenlik gösterir. Morfin ve eroin gibi opioidlere karşı gelişen tolerans, diğer maddelerden daha hızlı ve daha belirgindir. Morfinin mide bulantısı etkisine çok çabuk tolerans gelişirken, miyozise tolerans hiçbir zaman gelişmez (Koob and Le Moal 2006).

Aynı farmakolojik gruptaki maddelerden birine karşı tolerans gelişirse o gruptaki diğer maddelere karşı da tolerans gelişir. Bu fenomene 'çapraz tolerans' denir (Kayaalp 2012).

Duyarlılaşma toleransın tam tersidir, yani bir ilacı kullandıkça etkisinin giderek artmasıdır. Duyarlılaşma ile ilgili bilgilerin çoğu kokain, amfetamin, nikotin, alkol, fensiklidin ve morfin gibi maddelerle yapılan deneylere dayanmaktadır. Bu maddeler düşük dozda lokomotor aktivite artışına neden olmuşlardır. Bu maddelerin aynı dozunun tekrar verilmesi durumunda ise lokomotor aktivitede her seferinde giderek artan bir stümülasyon görülmüştür (Robinson and Berridge 1993). İlaçların lokomotor duyarlılaşma oluşturucu etkileri ile bağımlılık oluşturma potansiyelleri arasında bir ilişki bulunduğu kabul edilir.

Tolerans gelişiminde olduğu gibi, bazı maddeler arasında 'çapraz duyarlılaşma' söz konusudur. Bu durum özellikle bazı bağımlılık yapıcı maddelerden birine gelişen duyarlılaşmanın diğerine karşı da gelişmiş olması ile karakterizedir. Morfin, kokain ve alkol ile amfetamin, kafein ve nikotin arasında çapraz duyarlılaşma olduğu deneysel çalışmalarla gösterilmiştir (Kayaalp 2012).

## 4.3.Bağımlılık Tipleri ve Bağımlılık Yapan Maddeler

Bağımlılık yapan maddeler, santral sinir sisteminde büyük ölçüde psişik stimülasyon veya depresyon oluşturan, algılama, duygudurum, mental durum, davranış ve motor fonksiyonlarda bozukluk yapan psikoaktif maddelerdir (Sağlam, Uzbay ve Beyazyürek 2003).

Dünya Sağlık Örgütü 10 çeşit madde bağımlılığı tanımlamıştır. Buna göre; morfin (opioid), alkol, barbitürat, tütün, amfetamin, kokain, esrar, halüsinojen (LSD), uçucu solvent ve khat tipi bağımlılık söz konusudur (DSÖ 2005).

### 4.3.1. Morfin (Opioid) Tipi Bağımlılık

Morfin ve morfin-benzeri ilaçların ayırıcı özellikleri tekrarlayan kullanımlarında, düşük dozlarda kullanıldıklarında bile gelişen ve dozla doğrudan ilişkili olan, psişik ve fiziksel bağımlılığa, tolerans gelişimine neden olmalarıdır.

Morfin tipi bağımlılığın karakteristikleri şunlardır:

**(i)** Güçlü psişik bağımlılığa neden olurlar. İlacı kullanmada kontrol kaybı ya da ilacı almaya kompulsif bir şekilde devam etme isteği başlar (Eddy et al 1965).

**(ii)** Fiziksel bağımlılık erken başlar, bununla birlikte tolerans gelişir. Kullanma süresi arttıkça fiziksel bağımlılığın ve toleransın derecesi paralel olarak artar. 7-10 gün devamlı opioid uygulanması, ilaç kesildiğinde, hafif fakat fark edilebilir yoksunluk belirtilerine neden olmaktadır. İnsanda tek bir terapötik dozda verilen morfinden 6-8 saat sonra verilen morfin antagonisti nalokson'un hafif de olsa yoksunluk belirtilerini tetiklemesine dayanarak morfinin ilk dozundan itibaren fiziksel bağımlılığının başladığı düşünülmektedir (Koob and Le Moal 2006).

**(iii)** Morfinin öfori yapıcı (keyif verici) etkisine karşı tolerans geliştiği halde, solunum merkezinin inhibisyonu, miyozis, konstipasyon gibi etkilerine karşı tolerans gelişmemekte veya çok daha az gelişmektedir (Kayaalp 2012).

#### 4.3.2.1. Morfine Karşı Gelişen Tolerans ve Morfin Yoksunluk Sendromu

Yoksunluk belirtileri, uzun süre alınan bir madde bırakıldığında ya da azaltıldığında ortaya çıkan fizyolojik belirtilerdir. Bir madde kullanımı bırakıldığında yoksunluk belirtileri yaşayanların, o maddeye fiziksel bağımlılık geliştirdikleri kabul edilir (Himmelsbach 1943).

Kronik tolerans ve fiziksel bağımlılık ve dolayısıyla yoksunluğun altında yatan mekanizmalar konusunda birden fazla olasılık tartışılmaktadır. Bunlar arasında reseptörlerin ortadan kaldırılması (internalizasyon gibi), opioid reseptör bulunduran nöronların hücre içi ileti mekanizmalarında adaptasyon gelişmesi, sistem düzeyinde karşı-adaptasyon ve farklılık gösteren tolerans ve fraksiyonel işgal gerekliliği teorileri yer almaktadır.

Radyoligant bağlama yöntemleri ile yapılan deneylerde bazı opioid agonistlerinin uzun süre uygulanmasının etkiledikleri hücrelerde reseptör sayısını azalttığı saptanmıştır. Bu durum reseptörlerin azaltılması *(down-regulation)* ile hücrelerin ilacın devamlı etkisine karşı kendilerini savunmaları olarak yorumlanmaktadır. Bu mekanizmanın kronik toleransın başlangıcında rol alabileceği kabul edilmektedir ancak kronik maruziyetin yol açtığı kalıcı değişiklikleri açıklamakta yetersiz kalmaktadır. (Brunton and Parker 2011). Ayrıca, diğer μ agonistlerinden farklı olarak morfinin reseptör internalizasyonuna, fosforilasyonuna ve desensitizasyonuna yol açmadığı gösteren çalışmalar da mevcuttur (Koch et al 2005).

Kronik opioid uygulaması hücre içinde adaptif karşıt-düzenleyici mekanizmaları indüklemektedir. Buna örnek olarak adenilat siklaz enziminin superaktivasyonuna ve miktarındaki artışa bağlı olarak hücre içi siklik adenozin monofosfat (sAMP) seviyelerinin artması gösterilebilir. Bu da protein kinaz A (PKA) aktivayonu dolayısıyla hücre içi katyon akımını artırmaktadır (Brunton and Parker 2011). Buna bağlı olarak yoksunluk sırasında genellikle nöron terminallerinden nörotransmitter salınımında artış görülmektedir (Bailey and Connor 2005).

Kronik opioid uygulaması sırasında tolerans gelişiminde önemli bir teori de, opioidlerce düzenlenen bir sistem üzerindeki inhibitör etkinin bu sistemin egzitabilitesindeki artışa bağlı olarak azalmasıdır. Bununla uyumlu olarak, kronik opioid uygulamasına bağlı olarak gelişen protein kinaz C (PKC) aktivasyonu N-metil-D-aspartik asit (NMDA) reseptörlerinin fosforillenmesi yoluyla aktivasyonunun artmasına neden olduğu düşünülmektedir. Bu reseptörlerin bloke edilmesinin morfinin analjezik etkilerine karşı tolerans gelişimini kısmen de olsa engellediği gösterilmiştir (Trujillo and Akil 1991). Sistem seviyesinde görülen bu adaptasyon hipotezlerinin analjezi gibi bazı etkiler için geçerli olabileceği buna karşın sedasyon ve miyozis gibi bazı etkiler için geçerli olmadığı belirtilmiştir (Christie 2008).

Farklı etkilere karşı farklı hız ve şiddette tolerans gelişimi, toleransın reseptörün belirli bir fraksiyonunun reseptörün fonksiyonel ayrılmasıyla (*uncoupling*) ilişkili olduğu ve farklı fizyolojik yanıtlar için fonksiyonla eşleşmiş farklı reseptör fraksiyonlarının gerekli olduğu öne sürülmektedir. Bu hipoteze göre, miyozis oluşumundan sorumlu yolaklarda bu etkinin gerçekleşmesi için gerekli fonksiyonel reseptör fraksiyonunun ağrı yolaklarında etki gösterenlere kıyasla çok daha düşük olması gerekmektedir (Brunton and Parker 2011).

Morfin yoksunluk belirtileri vücudun çeşitli bölgelerinde ağrılar, insomniya, esneme, lakrimasyon, burun akıntısı (rinore), terleme, midriyazis, tüylerin diken diken olması, sıcak basması, mide bulantısı, kusma, vücut sıcaklığında artış, solunum sayısında azalma, kan basıncında düşüş, abdominal kas krampları, dehidrasyon, anoreksiya ve kilo kaybıdır (Isbell and White 1953, Eddy et al 1965). Bu belirtiler genel olarak morfin yoksunluğunun otonom sinir sistemi üzerindeki etkilerinden kaynaklanmaktadır ancak bu belirtilere anksiyete-benzeri ve depresyon-benzeri negatif duydudurum bozuklukları da eşlik etmektedir. Yoksunluktaki negatif duygudurum disfori olarak tanımlanmıştır ve bu duruma eşlik eden anksiyete ve depresyon-benzeri belirtiler major depresif evre ya da anksiyete bozukluğu gibi major bir mental bozukluğun kriterleriyle tam olarak uyuşmamaktadır (Koob and Le Moal 2006).

Opioid yoksunluk sendromunda deney hayvanlarında sıçrama, ıslak köpek silkinmesi, pitozis, diyare, davranışsal aktivasyon, motivasyonel fonksiyon bozuklukları gibi davranışsal ve fizyolojik semptomlar görülmektedir. Opioid yoksunluk sendromunun aktive edici etkilerinin lokus koruleus (LC) aracılığı ile gerçekleştiği, diyare ve lakrimasyonunda periferal opioid reseptörlerine bağlı olabileceği düşünülmektedir. Opioid yoksunluk sendromunun motivasyonel etkisi olan aversif uyarıcı ve negatif pekiştirici etkilerinin ise NAc ile bağlantılı olduğu düşünülmektedir (Koob, Maldonado and Stinus 1992).

**Tablo 3:**Narkotik ajanın son dozunu takiben ortaya çıkan yoksunluk belirtileri

| **Yoksunluk derecesi** | **Yoksunluk semptomları** | **Son dozu takiben geçen saatler** | |
|---|---|---|---|
| | | Morfin | Eroin |
| 0 | Anksiyete<br>Aranma | 6 | 4 |
| 1 | Esneme<br>Terleme<br>Burun akıntısı<br>Göz yaşarması | 14 | 8 |
| 2 | Midriyazis<br>Piloereksiyon<br>Tremor<br>Kas seyirmeleri<br>Anoreksiya<br>Kas ve kemik ağrıları | 16 | 12 |
| 3 | İnsomniya<br>Kan basıncında düşüş<br>Vücut sıcaklığında düşüş<br>Solunum sayısında azalma<br>Nabız sayısında azalma<br>Tedirginlik<br>Mide bulantısı | 24-36 | 18-24 |
| 4 | Kan şekerinde düşüş<br>Eozinopeni<br>Kilo kaybı<br>Diyare<br>Ani ejakülasyonve orgazm<br>Kusma | 36-48 | 24-36 |

(Koob and Le Moal 2006)

## 4.4.Endojen Opioidler ve Opioid Reseptörleri

Pert ve Synder radyoaktif morfinin beyinde spesifik bölgelere bağlandığını göstermiştir (Pert and Synder 1973). Daha sonra Hughes ve ark. enkefalin olarak adlandırdıkları, opiyat benzeri endojen bir maddeyi tanımlamışlardır (Hughes et al 1975). Takip eden yıllarda, endorfinler ve dinorfinler olmak üzere iki endojen opioid peptid sınıfı daha izole edilmiştir (Akil et al 1984).

Endojen opioid peptidler günümüzde POMK sistemi, proenkefalin sistemi, prodinorfin sistemi ve Nosiseptin/Orfanin FQ (N/OFQ) sistemi olmak üzere dört ana grupta sınıflandırılırlar.

POMK (pro-opiomelanokortin) sistemi: Bu grupta β-endorfin adlı 31 amino asitli opioid peptid bulunur, bu madde POMK adlı öncülün yıkılması sonucu meydana gelir. β-endorfin mü reseptörlere yüksek afinite gösterir, beyin ventrikülleri içine enjekte edildiğinde güçlü analjezi yapar; gravimetrik etki gücü morfine göre 50 kat yüksektir.

Proenkefalin sistemi: Bu grupta bulunan başlıca endojen opioid peptidler met-enkefalin, lö-enkefalin, bir heptapeptid olan met-enkefalin-$Arg^6$-$Phe^7$ ve bir oktapeptid olan met-enkefalin-$Arg^6$-$Gly^7$-$Leu^8$'dir. Enkefalinler opioid reseptörlerinden delta ve $mü_1$ reseptörlere yüksek afinite gösterirler.

Prodinorfin sistemi: Bu prekürsörden oluşan başlıca opioid peptidler dinorfin A, dinorfin B, α-neoendorfin ve β-neoendorfin'dir. Opioid reseptörlerin kappa türüne yüksek afinite gösterirler. İntratekal uygulamada güçlü analjezik etki gösterirler.

Nosiseptin/Orfanin FQ (N/OFQ): Bu sistemdeki opioid peptidler nosisseptin, orfanin-2 ve nosistatin'dir. Propeptid şekli proorfanindir. μ, κ,δ, reseptörlerine az miktarda afinite gösterirler (Trescot et al 2008). Deney hayvanlarında, hayvanın davranışsal durumuna göre ağrı eşiğini değiştirirler ve böylece anti-analjezik etki yaparlar (Kayaalp 2012).

Opioid reseptörleri μ (mü, $OP_3$), κ (kappa, $OP_2$), δ (delta, $OP_1$), Nosiseptin/Orfanin FQ'dur. Bu reseptörlerin hepsi G-protein kenetlidir.

μ opioid reseptörleri (MOR),β-endorfinve morfinin yüksek afiniteli şekilde bağlandığı reseptörlerdir. Medialtalamus ve beyin sapında bulunurlar. $\mu_1$ ve $\mu_2$ alttipleri bulunmaktadır. $\mu_1$, analjezi ve öforiden, $\mu_2$ ise solunum depresyonu, pruritus (kaşıntı), prolaktin salınımı, bağımlılık gelişimi, anoreksiya ve sedasyon gibi etkilerden sorumludur (Trescot, Datta, Lee and Hansen 2008).

κ reseptörleri beyin sapı, spinal kordda, serebral korteksin derin tabakalarındaki nöronlarda, omurilik arka boynuzunda ağrı duyusunu taşıyan birinci sıra duyusal nöronların akson uçlarında, limbik sistem, talamus ve striyatum gibi bölgelerde bulunurlar. Spinal analjezi, sedasyon, nefes darlığı, disfori ve solunum depresyonuna neden olur (Trescot et al 2008). Genelde opioid agonistlerin κ reseptörler aracılığı ile oluşturdukları etkiler, μ veya δ reseptörler üzerinden oluşturdukları etkilere zıt yöndedirler (Kayaalp 2012)

δ reseptörleri enkefalinlere selektif olan reseptörlerdir. Limbik sistemde bol miktarda saptanmıştır. Psikomimetik ve disforik etkilerden sorumlu olduğu düşünülmektedir (Trescot et al 2008).

Nosiseptin/Orfanin FQ, N/OFQ sistemine ait opioid peptidlerin etkilerine aracılık ederler. Dağılımları ve transdükleme sistemleri halen diğer opioid reseptörlerinki kadar incelenmemiştir.

μ , κ , δ reseptörlerinin üçü üzerinde de nalokson antagonist etki gösterir.

### 4.5. Opioid Sinyal Transdüksiyonu

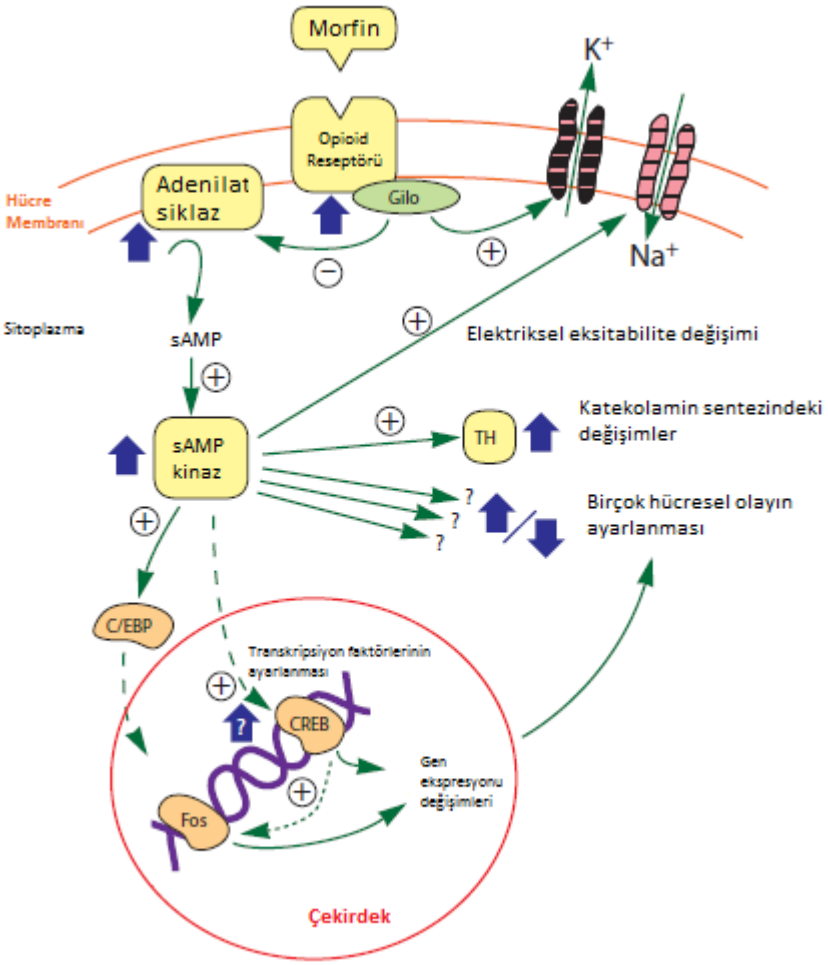
Opioidlerin nöronlarda hiperpolarizasyon ve inhibisyon yaptığı çeşitli elektrofizyolojik incelemelerde gösterilmiştir. Öte yandan opioid peptidlerin ve ilaçların beyinde belirli nöron topluluklarını veya mekanizmaları stimüle ettikleri bilinmektedir. Nöron düzeyindeki etkiyle nöron topluluğu düzeyindeki zıt yönlü etki bir çelişki göstermez; çünkü nöron topluluklarında söz konusu maddelerin yaptığı eksitatör etki, disinhibisyon olayına dayanır. Yani inhibitör bir nöronun inhibe edilmesi, o nöronun inhibe ettiği nöronun eksitasyonu ile sonuçlanır.

Opioidlerin inhibitör etkilerine aracılık eden üç transmembranal transdükleme mekanizmasının varlığı gösterilmiştir:

1. Adenilat siklazın inhibisyonu: Opioid reseptörlerinin her üç alt tipi de $G_{i/0}$-proteinleri aracılığı ile nöronlarda adenilat siklazı inhibe eder ve sAMP düzeyini azaltır. sAMP, protein kinaz aktivasyonu, gen transkripsiyon proteinleri aktivasyonu ve/veya gen transkripsiyonu ile sonlanacak pek çok hücre içi olayda ikinci ulak olarak görev yapar (Şekil 2). Dolayısıyla nöronda sAMP düzeyinin azalmasına bağlı olarak inhibitör etki oluşur. (Trescot et al 2008).

2. Nöron membranındaki voltaja-bağımlı kalsiyum kanallarından hücreye $Ca^{2+}$ girişinin azaltılması: Bu etki sonucu akson uçlarında veya nöron somalarında intraselüler $Ca^{2+}$ düzeyinin azalması da inhibitör etkilerine katkıda bulunur.

3. $G_i$ proteinin aracılığı ile nöron membranındaki $K^+$ kanallarının açılması: Potasyum kanallarının açılması nöronlarda hiperpolarizasyona (inhibisyon) sebep olur (Trescot et al 2008, Kayaalp 2012).




**Şekil 2:** Opioid sinyalizasyonu (Trescot et al 2008**)**

**Tablo 4:**Opioid reseptörlerin analjezik etkileri

| | **Mü (μ)** | **Delta (δ)** | **Kappa (κ)** |
|---|---|---|---|
| **EndojenPeptidler** | | | |
| Enkefalinler | Agonist | Agonist | |
| β-endorfin | Agonist | Agonist | |
| Dinorfin A | Agonist | | Agonist |
| **Agonistler** | | | |
| Morfin | Agonist | | Zayıf agonist |
| Kodein | Zayıf agonist | Zayıf agonist | |
| Fentanil | Agonist | | |
| Meperidin | Agonist | Agonist | |
| Metadon | Agonist | | |
| **Antagonistler** | | | |
| Nalokson | Antagonist | Zayıf antagonist | Antagonist |
| Naltrakson | Antagonist | Zayıf antagonist | Antagonist |

(Trescot et al 2008).

### 4.6.GABA (Gama-aminobütirik asit)

GABA, memeli santral sinir sisteminde en yaygın bulunan inhibitör nörotransmiterdir. GABA salıveren (GABAerjik) nöronlar yoğun olarak beynin ve az oranda da omuriliğin etrafına yayılmışlardır.

GABA, GABAerjik sinir uçlarında glutamik asidin dekarboksillenmesi ile oluşmaktadır. Bu olayı glutamik asit dekarboksilaz (GAD) enzimi katalize eder. Bu yolla oluşan GABA, sitoplazma içinde kendine özgü veziküller içinde toplanır. Sinir ucu depolarize edildiğinde, GABA ekzositoz ile salıverilir. Sinaps aralığına salıverilen GABA'nın inaktivasyonu, esas olarak salıverildiği uca geri-alım (*re-uptake*) ve çevredeki glia hücreleri içine alım (*up-take*) ve kısmende difüzyon ile meydana gelir. Bu olaylar hücre membranına yerleşmiş yüksek afiniteli ve düşük afiniteli iki transportör tarafından gerçekleştirilir. Düşük afiniteli almı mekanizması

sadece, sinapstaki GABA konsantrasyonu aşırı derece yükseldiğinde çalışır. Sitoplazmaya geçen GABA, GABA transaminaz (GABA-T) enzimi tarafından süksinik semialdehid'e yıkılır; inaktif olan bu madde trikarboksilik asit siklusuna girer ve sonuçta GABA öncülü olan glutamik aside dönüşmüş olur.

GABA, postsinaptik membranda veya akso-aksonik sinapslarda ana sinapsın presinaptik membran üzerinde yer alan GABA reseptörlerini aktive eder. Böylece GABA hiperpolarizasyon ve buna bağlı postsinaptik ve presinaptik inhibisyon yapar. GABA içeren inhibitör sinapslar daha net olarak serebral Purkinje nöronları ve bunların hedef yapısı olan Deiter çekirdeği arasında; serebellar korteks, olfakor bulbus, kuneat çekirdek, hipokampus ve lateral septal çekirdeğin küçük internöronları ile ana çıkan nöronları arasında ve vestribüler çekirdekle troklear motor nöronlar arasında gösterilmiştir. GABA serebral korteksin içindeki ve kaudat çekirdekle substansiya nigra arasındaki inhibisyona aracılık eder. GABA içeren nöronlar çoğunlukla aynı zamanda bir veya birden fazla sayıda nöropeptidi de içerir (Kayaalp 2011).

GABA etkili aracılı etkilerin doğrulanmasında en etkili bileşikler bikukulin ve pikrotoksindir ancak daha önce etkileri açıklanamayan birçok konvülzan bileşik (pentilentetrazol ve penisilin de dahil) GABA'nın etkilerini seçici olarak antagonize etmektedir. GABA'yı taklit eden (musimol gibi) altif gerialımını inhibe eden (2,4-diamin butirat, nipekotik asit ve guvasin gibi) veya yenilenmesini değiştiren (aminooksiasetik asit gibi) ajanlardan henüz yararlı terapötik etkiler elde edilmemiştir (Brunton and Parker 2011) .

GABA reseptörleri 3 grupta toplanır: A, B ve C. $GABA_A$ reseptörleri genellikle postsinaptik yerleşimlidir. Çok fazla türü bulunan altbirimlerin ortalarında klorür kanalı oluşturacak şekilde, genellikle tetramerik ve pentamerik bir protein kompleksi oluşturacak şekilde bir araya gelmeleriyle oluşur. En fazla incelenen birimler $\alpha$, $\beta$, $\gamma$, $\delta$ ve $\sigma$ altbirimleridir. Bunlardan reseptör yapısına en fazla katılanlar $\alpha$, $\beta$, $\gamma$ monomerleridir ve hepsin alt-tipleri vardır ($\alpha_2$, $\alpha_3$, $\beta_2$, $\gamma_3$ gibi). Genel bir monomer stekiyometrisi; iki tane $\alpha$, iki tane $\beta$ ve bir tane de $\gamma$'dir. Tanımlanan altbirim protein sayısı 19'dur (Zheleznova, Sedelnikova and Weiss 2009). Bunların her biri kendilerine özgü, genler tarafından kodlanır.

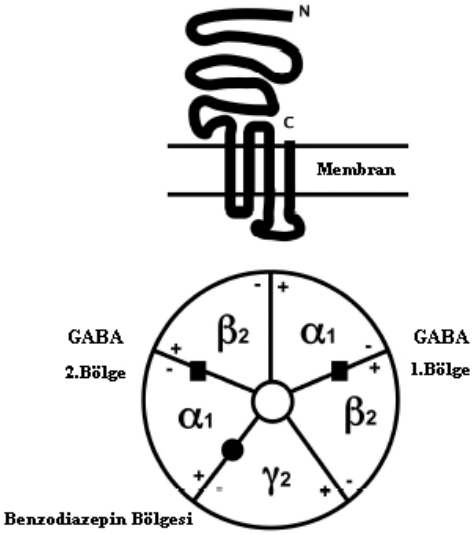
**Tablo 5:**GABA nörotransmitinin özeti

| TRANSMİTTER | ANATOMİ | RESEPTÖR ALT TİPLERİ VE TERCİH EDİLEN AGONİST | RESEPTÖR ANTAGONİSTLERİ | MEKANİZMALARI |
|---|---|---|---|---|
| GABA | Supraspinal ve spinal internöronlar pre- ve post-sinaptik inhibisyona yol açar. | $GABA_A$: Musimol | Bikukulin<br>Pikrotoksin | İnhibitör:<br>$Cl^-$ iletkenliğini arttırır. |
| | | $GABA_B$: Baklofen | 2-OH saklofen | İnhibitör(presinaptik):<br>$Ca^{+2}$ iletkenliğini azaltır.<br>İnhibitör(postsinaptik):<br>$K^+$ iletkenliğini arttırır. |

(Katzung, Masters and Trevor 2009)

$GABA_A$, ligant kapılı $Cl^-$ iyon kanalı yapıdaki iyonotrop bir reseptördür; presinaptik nöronlardan GABA salıverilmesi ile açılır. Beyinde yaygın olarak bulunurlar, bu reseptöraynı zamanda benzodiazepinler, barbitüratlar, etanol, anestezik steroidler ve volatil anestezikler gibi bazı nöroaktif maddelerin etki bölgesi olarak tanımlanmıştır.

$GABA_B$ reseptörleri G protein kenetlidir. G proteinlerin aracılığı ile adenilil siklaz veya kalsiyum kanalları ile ya da $K^+$ kanalları ile kenetlenmişlerdir. Bu tür reseptörlerin aktivasyonu adenilil siklazı ve $Ca^{2+}$kanallarını inhibe eder, $K^+$ kanallarını ise açar. Benzodiazepinler ve barbitüratlar $GABA_B$ reseptörlerini etkilemezler (Katzung, Masters and Trevor 2009).



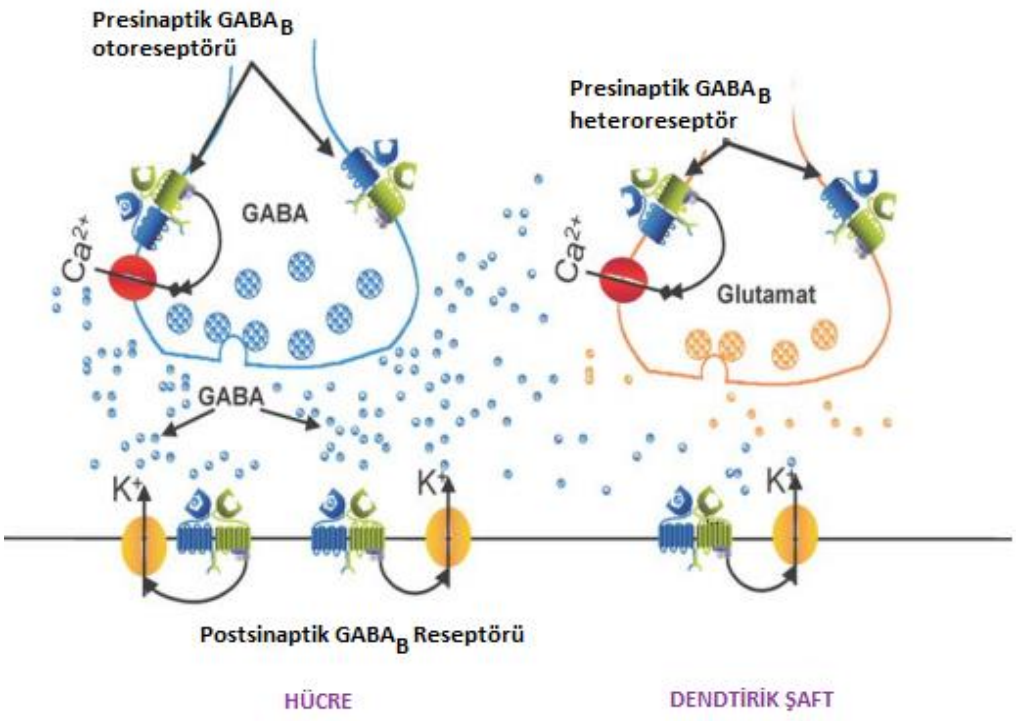

**Şekil 3:** $GABA_A$ reseptörlerinin izoformunun gösterimi (Sigel and Steinmann 2012)

$GABA_B$ reseptörler benzodiazepinler ve diğer sedatif-hipnotiklere karşı düşük afiniteye sahiptirler (Katzung, Masters and Trevor 2009). İlk başlarda, ayırıcı özelliğinin antispastik bir ilaç olan baklofen tarafından aktive edilmek olduğu kabul edilmiştir ancak daha sonra baklofene duyarsız alt-tipi de bulunmuştur. Baklofenin fosfonik asid türevi olan 2-hidroksi-s-saklofen, bu reseptörlerinin birçok türünün antagonistidir. Daha sonra bulunan CGP35348 maddesi, daha güçlü kan-beyin bariyerini aşabilen bir antagonisttir. $GABA_B$ reseptörleri baklofene duyarlı olup olmadıklarına göre iki gruba ayrılırlar. Bunlardan baklofene duyarlı olanlar saklofen ve/veya CGP35348'e duyarlı olup olmamalarına göre üç-alt tipe ayrılırlar (Kayaalp 2012).

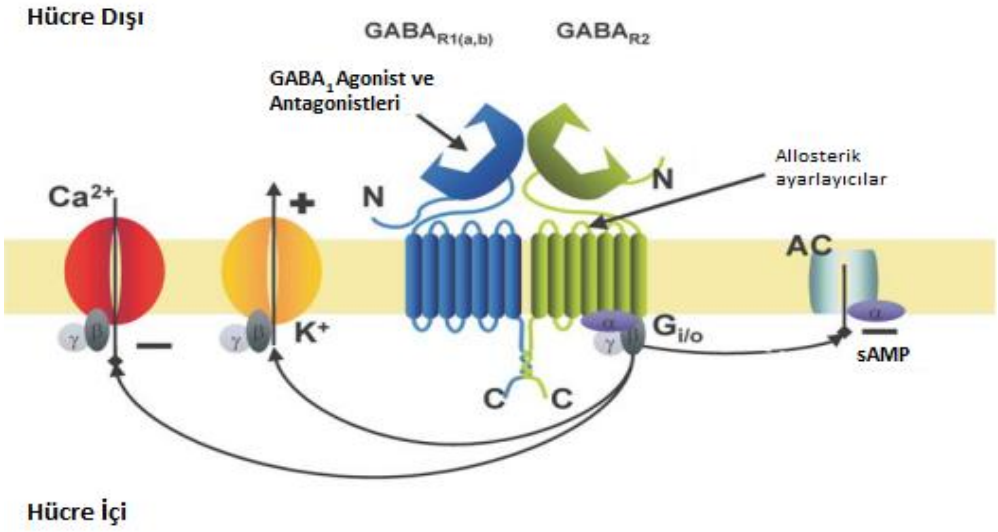
$GABA_B$ reseptörleri $GABA_{B1}$ ve $GABA_{B2}$ heterodimer alt-birimlerden oluşur. $GABA_B$ reseptörlerinin hem sentral hem de periferik sistemde bulunduğu gösterilmiştir. $GABA_B$ reseptörleri santral sinir sisteminde en yoğun talamik çekirdek, serebellum, amigdala ve kortekste bulunur. Hipokampüs, habenula, substansiya nigra, ventral tegmental alan, nükleus akümbens septi, globus pallidus ve

hipotalamusta da büyük miktarda saptanmıştır. Farklı çalışmalar da $GABA_B$ reseptörlerinin spinal kordda eksprese edildiklerini göstermiştir. $GABA_B$ reseptörleri periferde, otonom gangliya, olfaktör bulb, dalak, mesane, ince bağırsak, akciğer, testisler, pankreas, böbrek, karaciğer, miyokardiyum, iskelet kaslarında bulunur (Filip and Frankowska 2008).

$GABA_B$ reseptörleri, GABAerjik nöronların gövdeleri ve/veya dentritlerinde (otoreseptörler) presinaptik, GABAerjik olmayan nöronlarda (heteroreseptörler) presinaptik ya da postsinaptik yerleşimlidir (Filip and Frankowska 2008).




**Şekil 4**: $GABA_B$ reseptörlerinin yapısı ve sinyalizasyonu (Filip and Frankowska 2008)

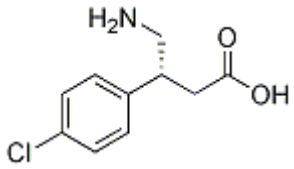



**Şekil 5:** $GABA_B$ reseptörlerinin lokalizasyonu (Filip and Frankowska 2008).

$GABA_A$ ve $GABA_B$ reseptörleri DAerjik hücre gövdelerinde de bulunmaktadır (Kalivas, Duffy and Eberhardt 1990). $GABA_B$ reseptörlerinin ilaçların pekiştirici etkisi üzerinde rolünün $GABA_A$'ya göre daha fazla olduğu düşünülmektedir (Fadda, Scherma, Fresu, Collu and Fratta 2003). $GABA_B$ agonistlerinin sıçanlar ve fareler üzerinde yapılan çalışmalarda kokain (Roberts, Andrews and Vickers1996), metamfetamin (Ranaldi and Poeggel 2002), eroin (Xi and Stein 1999), nikotin (Colombo et al 2000), GABA (Fattore, Cossu, Martellotta, Deiana and Fratta 2001) ve alkol (Colombo et al 2000) kendine verme davranışını azalttığı görülmüştür. Ayrıca $GABA_B$ agonistlerinin klinik çalışmalarda (Akhondzadeh et al 2002) ve deney hayvanlarında opioid (Zarrindash and Mousa-Ahmadi 1999) ve alkol yoksunluğunun semptomlarını azalttığı da saptanmıştır.

### 4.6.1. Baklofen ve Musimol

Baklofen bir $GABA_B$ reseptör agonistidir. Kimyaca β-p-klorofenil-GABA'dır. GABA sistemik olarak kullanıldığında santral sinir sistemine geçemediği halde baklofen geçmektedir. $GABA_B$ reseptörlerini aktive ederek akso-aksonik sinapslarda presinaptik inhibisyonu güçlendirmektedir. Reseptörün baklofen tarafından aktive edilmesinin sonucunda $K^+$ iletiminin artması ile hiperpolarizasyon meydana gelir. Bu hiperpolarizasyon $Ca^{2+}$ akışının azalması ile presinaptik inhibisyon oluşturur, beyin ve spinal kord da eksitatör transmitlerin salınımı azalır (Katzung, Masters and Trevor 2009).




**Şekil 6**: Baklofenin kimyasal yapısı

(Mann et al 1991)

Baklofenin spastisiteyi giderici etkisinin omurilik üzerinden olduğu düşünülmektedir. Baklofen beyinde dopaminerjik yolakların ucundan dopamin salınımı inhibe etmektedir.

Baklofen mide barsak kanalından yüksek oranda absorbe edilir. Eliminasyonu böbreklerden değişmeden itrah yolu ile olur. Absorpsiyon oranı ve eliminasyon hızı bireyler arasında fazla değişkenlik gösterdiğinden dozu bireye göre tespit etmek gerekir. Uzun süre kullanımında tolerans gelişir

Multipl skleroz, amyotrofik lateral skleroz, ve omurilik lezyonlarına bağlı diğer nörolojik hastalıklarda gelişen ağır kronik spastisiteye karşı kullanılır. (Katzung, Masters and Trevor 2009; Kayaalp 2012).

En sık görülen yan tesirler sedasyon, uyuşukluk, baş dönmesi konfüzyon, hipotansiyon ve bulantıdır (Katzung, Masters and Trevor 2009).

Musimol, *amanita muscaria* (sinek mantarı) ve *amanita pantherina* isimli mantarlarda bulunan başlıca psikoaktif bileşendir. Sedatif-hipnotik etkilere sahiptir (Chandra et al 2010). Musimol ve konformasyonel analoğu 4,5,6,7-tetrahidroisoksazol [5,4-c] piridin-3-ol (THIP), $GABA_A$ ve $GABA_C$ reseptörleri üzerinde etki gösterirler. Musimolün $GABA_A$ ve $GABA_C$ reseptörleri üzerideki etkisi benzerdir (Chebib and Johnston 1999)

Yapılan çalışmalarda GABA agonistleri baklofen ve musimolün ilaç kötüye kullanımı, bağımlılık ve yoksunluk sendromunda rol oynadığı gösterilmiştir.

Baklofenin morfin yoksunluk sendromunda etkili olabileceğini ilk kez Bowery 1982 yılında öne sürmüştür. Baklofenin intraperitoneal (i.p.) ve intraserebroventriküler (i.c.v.) olarak uygulanmasının, nalokson ile indüklenen morfin yoksunluğu sendromunda farelerde sıçrama davranışını azalttığı gösterilmiştir (Zarrindash and Ahmadi 1999). Başka bir çalışmada ise yine naloksonla indüklenmiş morfin yoksunluk sendromunda baklofenin sistemik (i.p.) olarak uygulanmasının sıçanlarda stereotipik kafa hareketleri, çiğneme hareketi, pitozis, ağırlık kaybı, diş gıcırdatma gibi bulgu ve davranışlarda anlamlı bir azalmaya sebep olduğu görülmüştür (Bexis et al 2000).

GABA agonistleri morfin kendine verme çalışmalarında da kullanılmıştır. Baklofen ve musimolün ön tedavi olarak i.p. uygulanmasının sıçanlarda doza bağımlı olarak bir morfin kendine verme çalışmasında morfin alımını azalttığı gözlemlenmiştir ve bu etkinin GABA antagonistleri SCH 50911 ve bikukulin ile geri döndüğü saptanmıştır (Yoon et al 2007). Yine baklofen ve musimolun kullanıldığı bir başka çalışmada da, baklofen ve musimolün sıçan NAc 'ine bilateral olarak uygulanmasının morfin kendine verme davranışındaki etkisi incelenmiş, musimolün kendine verme cevabını anlamlı olarak azalttığı ancak baklofenin böyle bir etki yapmadığı görülmüştür (Yoon et al 2009).

İn vivo bir çalışmada baklofenle ön tedavinin morfin, nikotin ve kokain uygulanmış sıçanlarda intraperitoneal (i.p.) olarak uygulanmasının doza bağımlı olarak, sıçan NAc kabuk bölgesinde dopamin salınımını azalttığı saptanmıştır (Fadda et al 2003). Baklofenin lokal uygulamasının nükleus akümbens ve VTA gibi

beyin bölgelerinde ekstraselüler dopamin seviyelerini azalttığına dair başka çalışmalar da mevcuttur (Yoshida et al 1996). Xi ve Stein yaptıkları çalışmada baklofenin VTA'ya uygulanmasının eroin kendine vermeyle indüklenmiş dopamin salınımını azalttığını göstermişlerdir ve bu etkinin VTA'da bulunan $GABA_B$ reseptörleri aracılığıyla ortaya çıktığını iddia etmişlerdir (Xi and Stein 1999).

NAc kabuk bölgesine uygulanan musimolün bilateral infüzyonunun sıçanlarda motivasyonal bir davranış olan yeme davranışı üzerine etkili olduğu gözlemlenmiştir (Söderpalm and Berridge 2000). Başka bir çalışmada da yine yine bu çalışmayı destekler nitelikte NAc kabuk bölgesine uygulanan musimolün sıçanlarda yeme davranışını artırdığı saptanmıştır (Stratford and Wirtshafter 2004). Baklofen ve musimol sıçan medial akümbens kabuk bölgesine bilateral olarak uygulandıklarında yeme davranışında anlamlı artışa neden olmuşlardır (Lopes et al 2007). Musimol ventral tegmental alana uygulandığında (VTA) sıçanda morfinle indüklenmiş şartlı yer tercihini azaltmıştır (Sahraei et al 2005 ).

GABA reseptör agonistleri musimol ve baklofenin lokomotor aktivite davranışlarında etkisi de incelenmiş ve lokomotor aktivitede azalmaya neden olduğu bazı çalışmalarca gösterilmiştir. Yapılan bir çalışmada dorsal rafe çekirdeğine lokal olarak uygulanan baklofen ya da musimolün lokomotor aktiviteyi azalttığı saptanmıştır (Przewłocka, Stala and Scheel-Krüger 1979). Baklofenin VTA'ya bilateral olarak uygulanmasının doza bağımlı olarak morfinle indüklenmiş lokomotor aktivite davranışında anlamlı oranda azalmaya neden olduğu gözlemlenmiştir (Leite-Morris et al. 2002). Lokomotor aktivite deneyleri kullanılan bir başka çalışmada ise sistemik uygulanan baklofenin morfin sensitizasyonunu gelişimini inhibe ettiği saptanmıştır (Fu, Yang, Xiao, Zhao and Huang 2012).

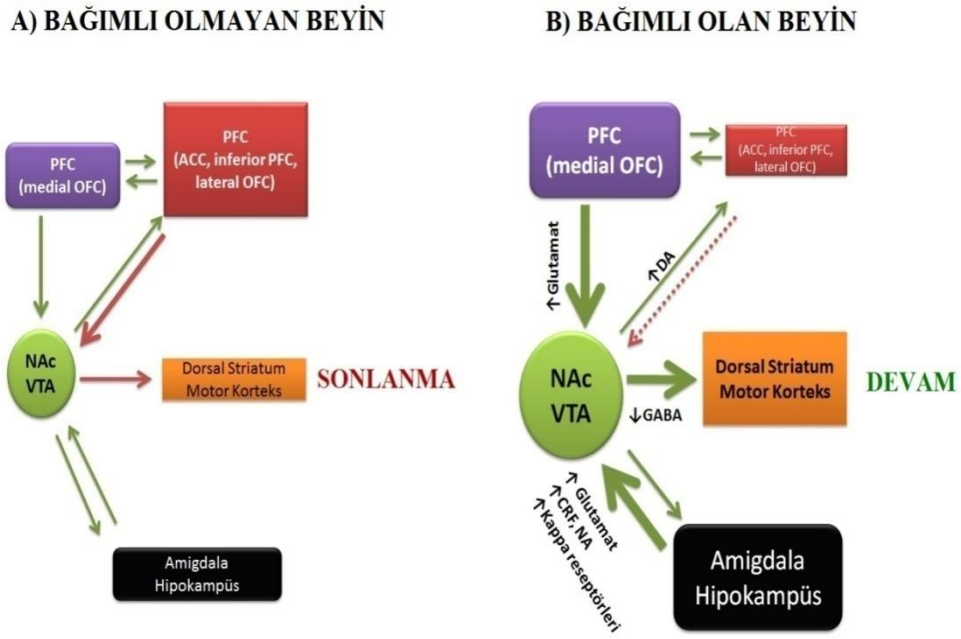
### 4.7.Bağımlılıkla ilgili Beyin Bölgeleri

Volkow bağımlılıkta üç temel evre olduğunu ve bu evrelerde farklı nörotransmitterlerin ve farklı yolakların görev aldığı teorisini ortaya atmıştır. Bu teoriye göre, bağımlılığa geçiş evresinde ve bu evreye kadar olan akut ilaç etkisinde dopamin, bağımlılığın son evresinde ise glutamat görevlidir. Bağımlılıkta rolü olan yolaklar ise ilk iki evrede lokus sereloustan ventral tegmental bölgeye (VTA) oradanda nükleus akümbensin kabuk bölgesine uzanan yolaktır. Bağımlılığın son evresinde ise prefrontal bölgeden NAc'nin çekirdek bölgesine uzanan yolaktır. Dopamin sistemi akut ilaç etkisinin başlamasında ve ilaç–cevap ilişkisinde, glutamaterjik sistem ise bağımlılığa geçişte rol oynadığı düşünülmektedir. Glutamaterjik projeksiyonun prefrontal korteks, amigdala ve hipokampustan kaynak aldığı, etkisini nükleus akümbenste direkt veya VTA'da dopamin salınımını arttırarak dolaylı olarak yaptığı düşünülmektedir. (Volkow, Wang, Fowler, Tomasi and Telang 2011) (Şekil 7).

NAc, VTA ve ventral pallidumun ödüllendirici etkilerden; amigdala, medial orbitofrontal korteks (medial OFC), hipokampüs ve dorsal striyatum şartlanma/hafızadan; anteriyor singulat korteks (ACC), inferor frontal korteks ve lateral orbitofrontal korteks kognitif fonksiyonları yöneten yönetimsel kontolden (*executive control*); motor korteks, medial OFC, ventral ACC, substansiya nigra (SN), dorsal striyatum, VTA'da motivasyondan sorumludur. Şekil 7(A) Bu sistemin çevrimi denge halinde olduğunda (bağımlı olmayan beyin) karar verme ve kontrol mekanizmaları düzgün çalışır. (B) İlaç bağımlılığında (ilaç beklentisi arttığı durumda) ödül, motivasyon ve hafıza çevrimleri kontrolden çıkar, ilacın alımı ile başlayan bir pozitif bir geribildirim (*feedback)* döngüsü ortaya çıkar, ve aralıksız devam eder. Bu devreler ayrıca ruh hali, stres reaktivitesi (amigdala ve hipokampüsle ilişkili) ile ilişkisi olan diğer çevrimlerle de etkileşim halindedir. Bu nöroadaptasyonlarda glutamat, GABA, norepinefrin ve opioid reseptörleri gibi pek çok nörotransmiter rol oynamaktadır (Volkow et al 2011).

Ventral ön beyin ile ventral orta beyini birbirine bağlayan halkanın, ilaçların ödüllendirici etkileri ile ilişkisi olduğu ileri sürülmektedir. Medial ön beyin demeti olarak da adlandırılan bu yol ventral tegmental alan (VTA) ve hipotalamus ile

olfaktör tüberkül, septum ve NAc'yi birbirine bağlar. Yine VTA'daki kaynak alarak, nükleus akümbens, olfaktör tüberkül, kaudat putamenin ventral striatal bölgeleri ve frontal kortekse projeksiyon yapan liflerden olusan mezokortikal ve mezolimbik dopaminerjik yolakların psikostimülan ödüllendirme ve pekiştiride önemli bir role sahip olduğu çok sayıda çalışmada gösterilmiştir. Bu iki yolak birlikte mezokortikolimbik yolak olarak anılır (Koob and Bloom 1988).




**Şekil 7**:Bağımlılığın altında yatan iletişim ağı döngüsü için bir model (Volkow, Wang, Fowler, Tomasi and Telang 2011)

### 4.7.1.Nükleus Akümbensin Madde Bağımlılığındaki Yeri

Nükleus akümbens limbik sistemden bilgiyi alıp bunu motor sistem bağlantıları yoluyla motivasyona dönüştüren bir anatomik yapıdır (Koob and Bloom 1988). NAc'nin, opioidlerin bağımlılıkla ilişkilendirilen ödüllendirici ve motivasyonel etkileriyle ilişkili olduğu düşünülmektedir ve bu teori pek çok çalışmada desteklenmiştir (Koob, Sanna and Bloom 1998). Amigdala, frontal korteks ve hipokampus gibi yapılar da nükleus akümbens aktivitesinin modülasyonu aracılığı ile ödüllendirmede rol oynamaktadırlar.

NAc; medioventral kabuk *(shell)* bölgesi ve dorsolateral çekirdek *(core)* bölgesini içermektedir. Kabuk ve çekirdek bölgelerinin farklı fonksiyonel rolleri olduğu bilinmektedir. Kötüye kullanılan ilaçların alınmasının NAc kabuk bölgesinde dopamin salınımını artırdığı görülmüştür (Di Chiara, Tanda, Frau and Carboni 1993). Çekirdek bölgesinin ise ilaç arama davranışının koşullandırma modellerinde kritik role sahip olduğu görülmüştür (Di Ciano, Cardinal, Cowell, Little and Everitt 2001). NAc kabuk bölgesinin genel olarak motivasyonel mekanizmalarda (kötüye kullanılan ilaçların pekiştirici etkilerinin düzenlenmesinde) (Yoon et al, 2007) ve çekirdek bölgesinin ise motor fonksiyonlarda rol aldığı düşünülmektedir (Kelley 1999). Çekirdek ve kabuk bölgesinin aferent impulsları ve projeksiyonları da farklı beyin bölgelerine olmaktadır (Brog, Salyapongse, Deutch and Zahm 1993).

NAc deki nöronların çoğu GABAerjiktir ve bu GABAerjik nöronlar çoğunlukla VTA'ya ve ventral pallidiuma (VP) projeksiyon yaptıklarından, *medium spiny* GABAerjik nöronların opiyat reseptör aracılı inhibisyonunun opiyat pekiştirilmesi ve lokomotor davranışlarında direkt olarak aracılık edebileceği hipotezi kurulmuştur. Morfin, eroin ve dopaminin NAc'ye lokal uygulanmasının ya da sistemik olarak verilmesinin NAc'deki nöronal aktiviteyi inhibe ettiği ve NAc'deki dopamin reseptör aktivasyonunun VTA ve VP'de GABA salınımını inhibe ettiği saptanmıştır ve bunlar da bu hipotezi doğrular niteliktedir. NAc'nin nöronal inhibisyonun GABA transaminaz veya GABA alım inhibitörleri ile VTA ve VP'de endojen GABA konsantrasyonu artırılarak antagonize edilebilir, bunun da doza bağımlı olarak sıçanlarda eroin kendine verme davranışını azalttığı saptanmıştır. (Xi and Stein 2000). Bu bilgiler ışığında NAc'deki *medium spiny* GABAerjik projeksiyon nöronlarının dopaminerjik ve non-dopaminerjik nörotransmiter ve nöromodülatörler için ortak bir hedef olduğu düşünülmektedir (Xi and Stein 2002).

Bu çalışmada tüm bu literatür bilgilerine dayanarak beyinde morfin bağımlılığı ve yoksunluğunda önemli rolü olduğu düşünülen NAc seçilerek GABA agonistleri baklofen ve musimolün bu bölgeye uygulanmasının yoksunluk esnasındaki bulgulara etkisi incelenmiştir.

# 5.GEREÇ ve YÖNTEM

Bu araştırmada uygulanan çalışma protokolü Marmara Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından onaylanmıştır (08.2012.mar). Deneyler Marmara Üniversitesi Deney Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde ve Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı'nda gerçekleştirilmiştir.

## 5.1.Hayvanların Özellikleri

Bu çalışmada 3-6 aylık, 250-350 gram ağırlığında toplam 77 adet, erişkin erkek Sprague Dawley sıçan kullanılmıştır. Sıçanlar, Marmara Üniversitesi Deney Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezi'nden, temin edilmiştir. Çalışma süresince sabit ısı (21±4ºC) ve nem kontrolünde 24 saat su ve yeme ulaşımları sağlanmıştır. Sıçanlar, ışıkların sabah 07.00 da açıldığı 12 saat aydınlık-karanlık döngüsüne uygun olan ortamda barındırılmıştır. Deney boyunca her kafeste bir hayvan barındırılmıştır.

## 5.2.Morfin Bağımlılığı Oluşturma ve Yoksunluk Bulgularının Değerlendirilmesi

Stereotaksik cerrahi yöntemi uygulanmış sıçanlar bir hafta dinlenmeye bırakılmış bu sürenin sonunda morfin bağımlılığı oluşturma prosedürüne başlanmıştır.

Morfin bağımlılığı, sıçanların cilt altına hafif eter anestezisi altında, her biri 75 mg baz morfin içeren yavaş salınımlı peletlerin yerleştirilmesiyle sağlanmıştır.

Deneyin ilk gününde 75 mg baz morfin içeren bir pelet, hafif eter anestezisi altında sıçanların cilt altına yerleştirilmiştir. Deneyin 2. gününde sıçanlar dinlenmeye bırakılıp, herhangi bir işlem uygulanmamıştır.

Deneyin 3. gününde sıçanın cilt altına, hafif eter anestezisi altında 75 mg baz morfin içeren peletlerden iki adet yerleştirilmiştir. Deneyin 4. gününde sıçanlar yine dinlenmeye bırakılıp, herhangi bir işlem uygulanmamıştır. Böylece sıçanlarda morfin bağımlılığı oluşturma prosedürü tamamlanmıştır.

Deneyin 5. gününde önce sıçanların ağırlıkları ölçülmüş ardından sıçanlara mikroenjeksiyon yapılmış, birkaç dakika sonra nalokson (2 mg/kg, i.p) uygulanmıştır. Nalokson uygulaması ile ve morfin bağımlılığı oluşturulmuş sıçanlarda yoksunluk sendromu tetiklenmiştir. Nalokson uygulamasını takiben sıçanlar lokomotör aktivite kafesine yerleştirilip lokomotor aktivite ölçümü ile eşzamanlı olarak 15 dakikalık süre içindeki yoksunluk bulguları gözlemlenmiştir.

Gözlemlenen davranış ve bulgular:

Sıçrama,

ıslak köpek silkinmesi,

diş gıcırdatma,

diyare,

pelet sayısı,

kanlı gözyaşı,

dokununca çığlık atma,

pitozisdir.

Sıçrama, ıslak köpek silkinmesi gibi davranışlar sayılarak, diyare, diş gıcırdatma, pitozis gibi bulgular ise derecelendirilerek her sıçan için kantitatif bir puanlama gerçekleştirilmiştir. 15 dakikanın sonunda sıçanların ağırlıkları tekrar ölçülmüş ve ağırlık kaybı da bir bulgu olarak incelenmiştir.

İncelenen yoksunluk belirtilerinden sıçrama, ıslak köpek silkinmesi, diş gıcırdatma ve ağırlık kaybı istatistiksel olarak değerlendirmeye alınmıştır.

### 5.3.Lokomotor Aktivite Ölçüm Deneyleri

Lokomotor aktivite ölçümleri AMS 9701 lokomotor aktivite görüntüleme sistemi ile gerçekleştirilmiştir. Bu sistem, yatay ve dikey eksendeki hareketleri algılayan kızıl ötesi ışık kaynakları içeren iki sıra kenar ve bu hareketleri kaydeden bir bilgisayardan oluşmaktadır.

Kenarlar, şeffaf pleksiglastan yapılmış bir kafesi çevrelemektedir. Bu kafesin taban kenarları ve yüksekliği 41 cm'dir. Deney hayvanları bu kafesin içine bırakılmakta ve sistem deneğin lokomotor hareketlerini otomatik olarak kaydetmektedir.

Çalışmada kullanılan tüm sıçanlar için iki kez bazal lokomotor aktivite ölçümü yapılmıştır. Lokomotor aktivite ölçümlerinin günün yaklaşık olarak aynı saatlerinde yapılmasına dikkat edilmiştir. Ölçümler 15 dakika süreyle gerçekleştirilmiş ve hiçbir hayvan için aynı gün içinde birden fazla lokomotor aktivite ölçümü yapılmamıştır.

Cerrahi sonrası iyileşme dönemi olarak belirlenen 7 gün sürenin ardından sıçanların bazal lokomotor aktivite ölçümleri gerçekleştirilmiştir. Sıçanların 15 dakikalık süre boyunca lokomotor aktivite kaydı ölçülmüştür. Lokomotor aktivite ölçümü sessiz bir ortamda yapılmıştır. Kayıt alınmadan önce %10 luk etanol çözeltisiyle kafesin zemini temizlenmiştir. Çalışmada kullanılan her sıçan için 2 kez bazal lokomotor aktivite ölçümü yapılmıştır ancak ilk bazal aktivite ölçümü kullanılmamıştır.

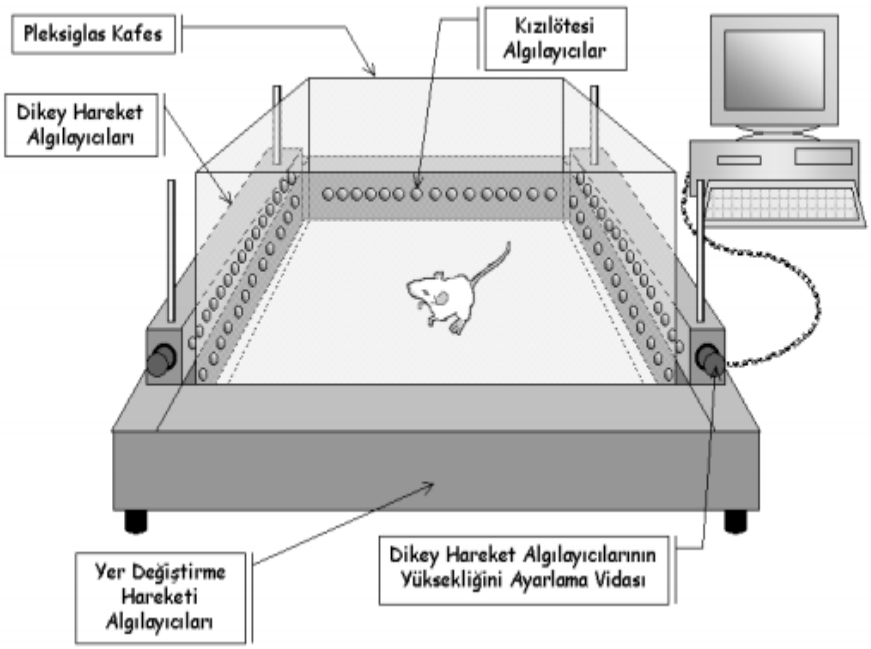
İkinci bazal aktivite, ilk bazal aktivite ölçümünden sonraki gün alınmıştır. Bu aktivite ölçümünden sonra sıçanlara ilk morfin peleti takılmış ve morfin bağımlılığı oluşturma deneyi başlamıştır.

Deneyin 4. gününde sıçanlara iki morfin peleti yerleştirilmeden önce tekrar lokomotor aktivite ölçümü yapılmıştır. Bu ölçümle morfinin lokomotor aktivite ölçüm değerleri üzerindeki etkisi gözlemlenmiştir.

Deneyin 6. gününde ise nalokson ile tetiklenen yoksunluk sendromu ile eşzamanlı lokomotor aktivite ölçümü yapılır. Yoksunluk sendromunun lokomotor aktivite ölçüm değerleri üzerindeki etkisi gözlemlenmiştir.

Deney prosedürüne göre morfin bağımlılığı oluşturulmuş gruplardaki her bir sıçanın toplam 4 kez, morfin bağımlılığı oluşturulmamış gruptaki her bir sıçanların ise toplam 3 kez lokomotor aktivite kafesinde ölçümü yapılmıştır.

Kafes içinde; gerçekleştirilen stereotipik hareket sayısı, ambulatuvar hareket sayısı, vertikal hareket sayısı ve kafes içinde kat edilen toplam mesafe her bir hayvan için kaydedilmiştir ve incelenmiştir.




**Şekil 8:**Lokomotor Aktivite Ölçüm Cihazı

(Uzbay 2004)

## 5.4.Stereotaksik Cerrahi Yöntemi

Stereotaksik cerrahi yöntemi uygulanarak sıçanların NAc bölgesine bilateral kanül yerleştirilmiştir.

Sıçanlar ketamin (100 mg/kg, ip) ve ksilazin (10 mg/kg, ip) anestezisi altında stereotaksik cerrahi aletine (Stoelting, model 51600, A.B.D) yerleştirilmiştir. Kafa derileri orta hattan bir insizyonla önde bregma arkada lambda noktaları görünecek şekilde açılıp periyost temizlenmiştir. Yapısal destek sağlamak amacıyla üç adet sabitleme vidası frontal ve paryetal kemiklere takılmıştır.

Sıçanların nükleus akümbens kabuk bölgesinin kafatası üzerindeki izdüşümü, sıçan beyin atlasından (Paxinos and Watson2007) bregma noktası referans alınarak sağlanan koordinatlara göre (8 derece açı ile AP: +1.7 mm, L:±2.0 mm, V: 6.7 mm) belirlenmiştir. Nükleus akümbens çekirdek bölgesinin koordinatları da (AP: +1.2 mm, L:±2.2 mm, V: 6.5 mm) aynı yöntemle belirlenmiştir. Bu koordinatların izdüşümü kafatası üzerinde belirlenerek mikrodrill vasıtası ile delinmiş ve paslanmaz çelik kılavuz kanüller hedeflenen bölgelere yerleştirilmiştir. Kafaya yerleştirilen kılavuz kanülleri, üç sabitleme vidası ile mikrokonektör soğuk akrilik sement ile kafatasına sabitlenmiştir. Kılavuz kanülün tıkanmasını önlemek için muhafaza *(dummy)* takılmıştır.

## 5.5.Maddeler ve Mikroenjeksiyon

Baklofen hidroklorür (G013), musimol hidrobromür (G019) ve nalokson hidroklorür (N7758) Sigma'dan temin edilmiştir. Baklofen hidroklorür, Musimol hidrobromür yapay beyin omurilik sıvısı (yBOS) [2.5 mM KCl, 125 mM NaCl, 1.26 mM $CaCl_2$ ($2H_2O$), 1.18 mM $MgCl_2$ ($6H_2O$) ve 0.2 mM $NaH_2PO_4$ ($2H_2O$); pH: 7.0] içerisinde içinde çözülmüştür ve bu sıvı ile enjeksiyon konsantranyonuna seyreltilmiştir. Nalokson ise fizyolojik tuzlu su içinde çözülmüştür ve yine bu sıvı ile enjeksiyon konsantrasyonuna seyreltilmiştir.

Mikroenjeksiyonlar, sıçanlara daha önceden stereotaksik cerrahi ile yerleştirilen kılavuz kanüllerden geçirilen ve bir polietilen tüp aracılığıyla 1 µl hacmindeki Hamilton mikroşırıngaya bağlı paslanmaz çelik internal kanüller

aracılığıyla yapılmıştır. Mikroenjeksiyon sırasında hayvanlar nazikçe tutulmuş ve enjeksiyonlar1 µl/dk hızında gerçekleştirilmiştir. Verilen maddenin geri kaçmasını engellemek için internal kanüller 1 dakika daha kılavuz kanül içerisinde bırakılmıştır.

Nükleus akümbens kabuk bölgesine 1µl hacminde yapay beyin omurilik sıvısı, yapay beyin omurilik sıvısında çözünmüş baklofen (her bir hemisfere 62.5, 125 veya 250 ng/0,5µl olacak şekilde) bilateral olarak uygulanmıştır. Nükleus akümbens çekirdek bölgesinede 1µl hacminde yapay beyin omurilik sıvısı, yapay beyin omurilik sıvısında çözünmüş baklofen (her bir hemisfere 62.5 ng/0,5µl olacak şekilde) bilateral olarak uygulanmıştır. Musimol 50 ng ise nükleus akümbens kabuk bölgesine 0,5µl hacminde bilateral olarak uygulanmıştır (her bir hemisfere 50 ng/0,25µl olacak şekilde). Nükleus akümbens çekirdek bölgesine ise 1µl hacminde yapay beyin omurilik sıvısı ve yapay beyin omurilik sıvısında çözünmüş 62.5 ng baklofen bilateral olarak uygulanmıştır.

### 5.6.Histolojik Doğrulama

Deney bitiminde sıçanların yüksek doz sodyum tiyopental anestezisi uygulanmıştır. Bu anestezi altında dekapite edilmişlerdir. Bunu takiben beyinleri çıkartılmıştır. Çıkarılan beyinler 48 saat boyunca % 20 formol sukroz karışımında bekletildikten sonra, kriyostatla koronal düzlemde 40 µm kalınlığında kesilmiş ve kesitler lamlara yerleştirilmiştir. Lamlara alınan kesitler bir gün süreyle etüvde kurutulduktan sonra, tiyoninle boyanarak, ışık mikroskopu altnda değerlendirilmiştir. Histolojik değerlendirmenin sonunda hedeflenen beyin bölgelerine ulaşıldığı doğrulanan sıçanların sonuçları değerlendirmeye alınmıştır.

### 5.7.Deney Protokolü

Çalışmaki deney grupları ve her bir grupta kullanılan sıçan sayısı aşağıdaki tabloda gösterilmiştir:

**Tablo 6:** Deney grupları ve gruplardaki sıçan dağılımları

| Deney Grupları | | Hayvan sayısı |
|---|---|---|
| Morfin bağımlılığı geliştirilmemiş sıçanlarda nükleus akümbens kabuk bölgesine bilateral olarak yBOS, baklofen (62,5, 125, 250 ng), uygulanmasının lokomotor aktivite bulgularına etkisinin değerlendirildiği grup | yBOS | 6 |
| | Baklofen (62,5 ng) | 6 |
| | Baklofen (125 ng) | 6 |
| | Baklofen (250 ng) | 4 |
| Morfin bağımlılığı geliştirilmiş sıçanlarda naloksonla tetiklenen yoksunluk sendromunun lokomotor aktivite bulgularına etkisinin değerlendirildiği grup | | 13 |
| Morfin bağımlılığı geliştirilmiş sıçanlarda nükleus akümbens kabuk bölgesine bilateral olarak yBOS,baklofen (62,5, 125 ng) ve musimol (50 ng) uygulanmasının naloksonla tetiklenen morfin yoksunluk sendromunun davranış lokomotor aktivite bulgularına etkisinin değerlendirildiği grup | yBOS | 6 |
| | Baklofen (62,5 ng) | 8 |
| | Baklofen (125 ng) | 6 |
| | Musimol (50 ng) | 6 |
| Morfin bağımlılığı geliştirilmiş sıçanlarda nükleus akümbens çekirdek bölgesine bilateral olarak yBOS ve baklofen 62.5ng/1µl uygulanmasının naloksonla tetiklenen morfin yoksunluk sendromunun davranış ve lokomotor aktivite bulgularına etkisinin değerlendirildiği grup | yBOS | 8 |
| | Baklofen (62,5 ng) | 8 |
| **Toplam** | | **77** |

### 5.7.1. Morfin Bağımlılık Modeli Oluşturulmuş Grup

Stereotaksik cerrahiyle nükleus akümbens kabuk/çekirdek bölgesine kanül yerleştirilen sıçanlar, cerrahi sonrası bir haftalık dinlenmeye bırakılmıştır. Bir haftalık süre sonunda ilk gün sıçanların ilk bazal lokomotor aktivite ölçümü yapılmıştır. Sonraki gün ikinci bazal aktivite ölçümü yapılmıştır ve aynı gün içerisinde sıçanlara hafif eter anestezisi altında 75 mg lık yavaş salınımlı bir baz morfin peleti yerleştirilmiştir. Deneyin üçüncü gününde sıçanlar dinlenmeye bırakılmıştır ve herhangi bir işlem uygulanmamıştır. Deneyin dördüncü gününde ise yeniden lokomotor aktivite ölçümü yapılmış ve morfinin lokomotör aktivite üzerine etkisi incelenmiştir. Lokomotor aktivite ölçümünü takiben, sıçanlara yavaş salınımlı iki adet morfin peleti hafif eter anestezisi altında yerleştirilmiştir ve bağımlılık prosedürü tamamlanmıştır. Deneyin beşinci gününde hayvanlar yine dinlenmeye bırakılmış ve herhangi bir işlem uygulanmamıştır.

Deneyin altıncı gününde morfin bağımlılığı geliştirilmiş sıçanların önce ağırlığı ölçülmüş sonrasında nükleus akümbens kabuk/çekirdek bölgesine, yapay beyin omurilik sıvısı (yBOS) ya da yapay beyin omurilik sıvısı içinde çözünmüş baklofen her bir hemisfere 62,5 ng, kabuk bölgesine musimol (her bir hemisfere 50 ng) veya baklofen (her bir hemisfere 125 ng) mikro enjeksiyonu bilateral olarak uygulanmıştır. yBOS grubu kontrol grubu olarak kullanılmıştır. Bu uygulamanın birkaç dakika sonra nalokson (2 mg/kg,i.p) enjeksiyonu yapılmıştır. Nalokson uygulanması ile ve morfin bağımlılığı oluşturulmuş sıçanlarda yoksunluk sendromu tetiklenmiştir.

Nalokson uygulamasını takiben sıçanlar lokomotor aktivite kafesine yerleştirilip lokomotor aktivite ölçümü ile eşzamanlı olarak 15 dakikalık süre içindeki yoksunluk bulguları gözlemlenmiştir.

15 dakika süreyle zıplama, ıslak köpek silkinmesi, diş gıcırdatma, kafa ve el tremoru, pelet sayısı gibi parametreler sayılmış, pitoz ve diyare şiddeti gibi parametreler derecelendirilmiş ve eş zamanlı olarak lokomotor aktivite ölçümleri gerçekleştirilmiştir. Lokomotor aktivite kafesinden çıkarıldıktan sonra sıçanların tekrar ağırlık ölçümü yapılmıştır.

### 5.7.2.Morfin Bağımlılık Modeli Oluşturulmamış Grup (Kontrol Grubu)

Stereotaksik cerrahiyle bilateral nükleus akümbens kabuk/çekirdek bölgesine kanül yerleştirilen sıçanlar, cerrahi sonrası bir haftalık dinlenmeye bırakılmıştır. Bir haftalık süre sonunda ilk gün sıçanların ilk bazal lokomotor aktivite ölçümü yapılmıştır. İkinci gün ikinci bazal aktivite ölçümü yapılmıştır. 4. gün sıçanların nükleus akümbensine yapay beyin omurilik sıvısı ya da yapay beyin omurilik sıvısı içinde çözünmüş musimol (her bir hemisfere 50 ng/0.25 µl) veya baklofen (her bir hemisfere 62.5, 125, 250 ng/0,5µl) mikro enjeksiyonu bilateral olarak uygulanmıştır.

**Tablo 7:** Deney protokolü

<table>
<tr><td colspan="3">Morfin Bağımlılığı Geliştirilmiş Gruplar</td><td colspan="2">Morfin Bağımlılığı Geliştirilmemiş Gruplar</td></tr>
<tr><td colspan="2">Stereotaksik cerrahi işlemi uygulanmış gruplar</td><td>Stereotaksik cerrahi işlemi uygulanmamış gruplar</td><td colspan="2">Stereotaksik Cerrahi işlemi uygulanmış gruplar</td></tr>
<tr><td>1.gün</td><td>Bazal lokomotor aktivite ölçümü</td><td>Bazal lokomotor aktivite ölçümü</td><td>1.gün</td><td>Bazal lokomotor aktivite ölçümü</td></tr>
<tr><td>2.gün</td><td>İkinci bazal lokomotor aktivite ölçümü ve cilt altına tek pelet implantasyonu</td><td>İkinci bazal lokomotor aktivite ölçümü ve cilt altına tek pelet implantasyonu</td><td>2.gün</td><td>İkinci bazal lokomotor aktivite ölçümü</td></tr>
<tr><td>4.gün</td><td>Lokomotor aktivite ölçümü ve cilt altına iki pelet implantasyonu</td><td>Lokomotor aktivite ölçümü ve cilt altına iki pelet implantasyonu</td><td rowspan="3">4.gün</td><td rowspan="3">Mikroenjeksiyon (Baklofen (62,5, 125 veya 250 ng) ya da musimol (50 ng))<br><br>Lokomotor aktivite ölçümü<br><br>Dekapitasyon ve histolojik doğrulama</td></tr>
<tr><td>6.gün</td><td>Mikroenjeksiyon (Baklofen (62,5, 125 ng) ya da musimol (50 ng))<br><br>Sistemik nalokson uygulaması<br><br>Lokomotor aktivite ölçümü ve davranış değerlendirilmesi<br><br>Dekapitasyon ve histolojik doğrulama</td><td>Sistemik nalokson uygulaması<br><br>Lokomotor aktivite ölçümü ve davranış değerlendirilmesi</td></tr>
</table>

## 5.8. Verilerin Analizi

Deney gruplarından elde edilen veriler ortalama ± standart hata olarak verilmiştir. Veriler Graph Pad Prism 5.03 yazılımı kullanılarak analiz edilmiştir. $P<0,05$ anlamlılık düzeyi olarak kabul edilmiştir.

Naloksonla indüklenen morfin yoksunluğunun lokomotor aktiviteye etkisinin gruplarda istatistiksel analiz olaraktek yönlü varyans analizi (ANOVA) kullanılmış, gruplar arası farklılıklar ise "Post-hoc Tukey's testi" uygulanarak incelenmiştir.

Baklofenin farklı dozlarının (62,5, 125, 250 ng) lokomotor aktiviteye etkisinin incelendiği morfin bağımlısı olmayan grup ve baklofen (62,5, 125 ng) veya musimolün (50 ng) NAc kabuk bölgesine uygulanarak naloksonla indüklenen morfin yoksuluğunda lokomotor aktiviteye/davranışsal bulgulara etkisinin incelendiği gruplar istatistiksel analizi tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ile değerlendirilnmiş, gruplar arası farklılıklar "Post-hoc Dunnett's testi" uygulanarak incelenmiştir.

Baklofenin 62,5 ng dozunun kabuk veya çekirdek bölgesine uygulandığı ve bu dozun naloksonla indüklenmiş morfin yoksunluğunda lokomotor aktiviteye ve yoksunluk davranışlarına etkisinini incelendiği gruplarda istatistiksel analizler student'in t testi ile değerlendirilmiştir.

# 6. BULGULAR

## 6.1. Lokomotor Aktivite Ölçümleri

Çalışmada kullanılan tüm sıçanların tekrarlayan lokomotor aktivite ölçümleri alınmıştır. Yeni çevreyi arama ve tanıma davranışının lokomotor aktivite değerleri üzerindeki etkisini ve yeni çevreye karşı arama davranışının sıçanlar arasında gösterdiği varyasyonu azaltmak için sıçanlara birbirini takip eden iki gün içinde iki kez bazal lokomotor aktivite ölçümü yapılmıştır. Deney boyunca yapılan girişimlerin kontrolü olarak kullanılan bazal değer olarak ikinci lokomotor aktivite ölçümü kabul edilmiştir. İkinci bazal lokomotor aktivite ölçümünün tamamlanmasının ardından, yöntemler bölümünde tarif edildiği gibi, cilt altına eter anestezisi altında morfin peletleri yerleştirilerek morfin bağımlılığı geliştirilmiştir. Bir gün ara verilerek sıçanların tekrar lokomotor aktivite ölçümleri alınmış ve bunu takiben iki morfin peleti cilt altına yerleştirilmiştir. Tekrar bir gün ara verilerek sıçanların son lokomotor aktivite ölçümleri, NAc kabuk veya çekirdek bölgesine yBOS (kontrol), baklofen (62,5 veya 125 ng) veya musimol (50 ng) uygulanmasından hemen sonra naloksonla tetiklenen yoksunluk sendromu sırasında gerçekleştirilmiştir.

Lokomotor aktivite deneylerinde 15 dakika süreyle stereotipik hareket sayısı, ambulatuvar hareket sayısı, vertikal hareket sayısı ve kat edilen mesafe değerlendirilmiştir.

### 6.1.1. Morfin Yoksunluğunun Lokomotor Aktivite Üzerine Etkisi

Bu gruptaki sıçanlara stereotaksik cerrahi işlemi uygulanmamıştır. Morfin peletleri cilt altına yerleştirilerek sıçanlarda morfin bağımlılığı oluşturulmuş ve lokomotor aktivite ölçümlerinde diğer gruplarla aynı prosedür izlenmiştir. Hayvanlara hiçbir madde enjeksiyonu yapılmamıştır. Naloksonla morfin yoksunluğu indüklenmiş ve bulgular değerlendirilmiştir. Grupların istatistiksel analizleri tekrarlayan ölçümlü tek yönlü varyans analizi (ANOVA) kullanılarak incelenmiştir. Gruplar arası farklılıklar ise “Post-hoc Tukey’s testi” uygulanarak incelenmiştir.

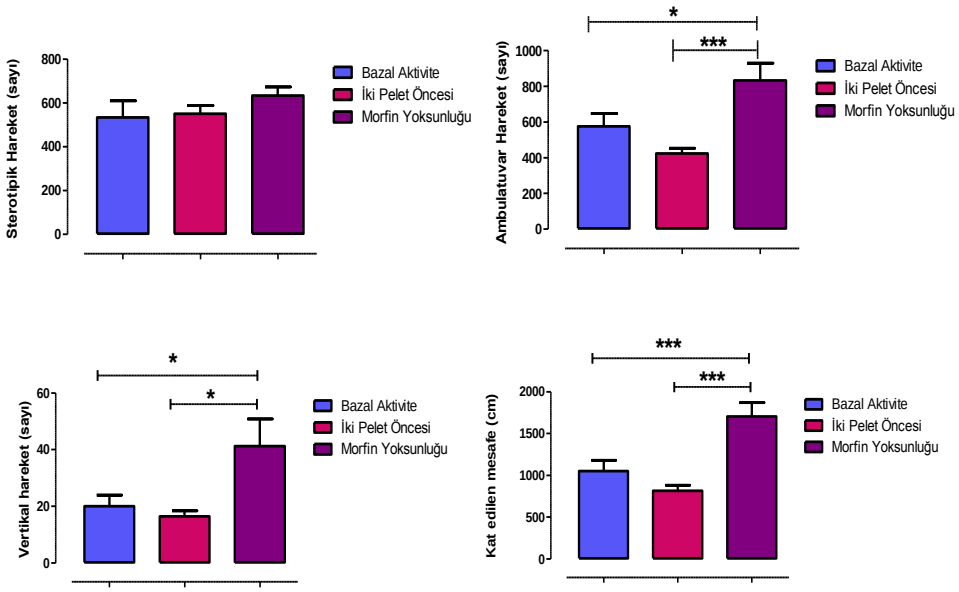
Bazal lokomotor aktivite ölçümü stereotipik hareket sayısı 534,50 ± 75,16, iki morfin peleti uygulanması öncesinde alınan lokomotor aktivite ölçümü stereotipik

hareket sayısı 550,60 ± 37,61, naloksonla indüklenen morfin yoksunluğu esnasındaki lokomotor aktivite stereotipik hareket sayısı 634,30 ± 39,61 olarak saptanmıştır. İstatistiksel olarak bu ölçümlerin hiçbiri arasında bir anlamlılık bulunmamıştır ($p>0.05$).

Bazal lokomotor aktivite ölçümü ambulatuvar hareket sayısı 576,80 ± 72,28 , iki morfin peleti uygulanması öncesinde alınan lokomotor aktivite ölçümü ambulatuvar hareket sayısı 423,80 ± 30,01, naloksonla indüklenen morfin yoksunluğu esnasındaki lokomotor aktivite ambulatuvar hareket sayısı 833,50 ± 97,85 olarak saptanmıştır. Naloksonla indüklenen morfin yoksunluğundaki aktivitede bazal lokomotor aktivite ve iki pelet öncesi lokomotor aktiviteye göre anlamlı bir artış saptanmıştır ($p< 0.05$).

Bazal lokomotor aktivite ölçümü vertikal hareket sayısı 20,08 ± 3,89 , iki morfin peleti uygulanması öncesinde alınan lokomotor aktivite ölçümü vertikal hareket sayısı 16,46 ± 1,95 , naloksonla indüklenen morfin yoksunluğu esnasındaki lokomotor aktivite vertikal hareket sayısı 41,23 ± 9,62 olarak saptanmıştır. Naloksonla indüklenen morfin yoksunluğundaki aktivitede bazal lokomotor aktivite ve iki pelet öncesi lokomotor aktiviteye göre anlamlı bir artış saptanmıştır ($p<0.05$).

Bazal lokomotor aktivite ölçümünde kat edilen mesafe 1052,00 ± 130,70 cm, iki morfin peleti uygulanması öncesinde alınan lokomotor aktivite ölçümünde kat edilen mesafe 815,20 ± 66,08 cm, naloksonla indüklenen morfin yoksunluğu esnasındaki lokomotor aktivitede kat edilen mesafe 1703,00 ± 166,30 cm olarak saptanmıştır. Naloksonla indüklenen morfin yoksunluğundaki aktivitede bazal lokomotor aktivite ve iki pelet öncesi lokomotor aktiviteye göre anlamlı bir artış saptanmıştır ($p<0.05$) (Şekil 9).




**Şekil 9:** Bazal lokomotor aktivite ölçümü (n=13), iki morfin peleti öncesi lokomotor aktivite ölçümü (n=13) ve naloksonla (2mg/kg) indüklenen morfin yoksunluğunda (n=13) lokomotor aktivite ölçümlerinin birbiri ile kıyaslanması. *p<0.05.

### 6.1.2. Morfin Bağımlısı Olmayan Sıçanlarda NAc'nin Kabuk Bölgesine Baklofen (62,5, 125, 250 ng) Uygulamalarının Lokomotor Aktivite Üzerine Etkisi

Morfin bağımlısı olmayan sıçanların NAc kabuk bölgesine yBOS, baklofen (62,5, 125, 250 ng) uygulamaları yapılmış ve bunu takiben lokomotor aktivite ölçümü yapılmıştır. Bu deneyin amacı etkin baklofen dozunun belirlenmesi ve baklofenin sıçanların lokomotor aktivitesi üzerine etkisinin incelenmesidir. Grupların istatistiksel analizleri tek yönlü varyans analizi (ANOVA) kullanılarak incelenmiştir. Gruplar arası farklılıklar "Post-hoc Dunnett's testi" uygulanarak incelenmiştir. Baklofen lokal enjeksiyonu uygulanan gruplar ile yBOS uygulanan grup karşılaştırılmıştır.

NAc kabuk bölgesine bilateral yBOS ön uygulaması alan sıçanlarda 15 dakika boyunca stereotipik hareket sayısı 688,70 ± 130,50 iken, baklofen 62,5 ng ön uygulaması alan grupta 974,20 ± 113,40, baklofen 125 ng ön uygulaması alan grupta 660,70 ± 119,10, baklofen 250 ng ön uygulaması alan grupta ise 205,30 ± 65,37

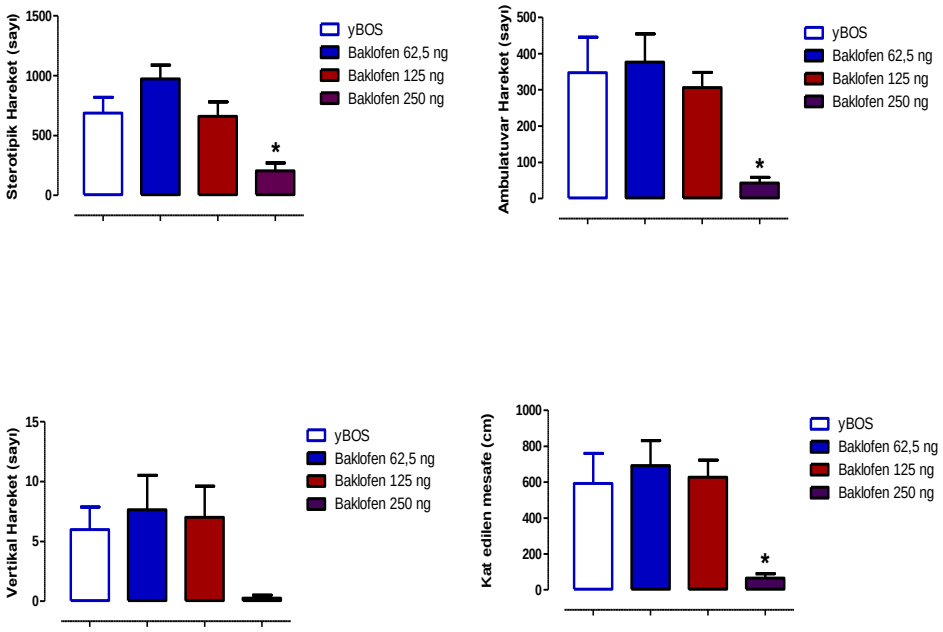
olarak saptanmıştır. Baklofen 250 ng uygulanan grup ile yBOS uygulanan grup arasında istatistiksel olarak anlamlılık saptanmıştır ($p<0.05$).

NAc kabuk bölgesine bilateral yBOS ön uygulaması alan sıçanlarda 15 dakika boyunca ambulatuvar hareket sayısı 347,30 ± 98,45 iken, baklofen 62,5 ng ön uygulaması alan grupta 376,80 ± 77,56, baklofen 125 ng ön uygulaması alan grupta 306,20 ± 42,18, baklofen 250 ng ön uygulaması alan grupta ise 43,00 ± 15,72 olarak saptanmıştır. Baklofen 250 ng uygulanan grup ile yBOS uygulanan grup arasında istatistiksel olarak anlamlılık bulunmuştur ($p<0.05$).

NAc kabuk bölgesine bilateral yBOS ön uygulaması alan sıçanlarda 15 dakika boyunca vertikal hareket sayısı 6,00 ± 1,88 iken, baklofen 62,5 ng ön uygulaması alan grupta 7,66 ± 2,87, baklofen 125 ng ön uygulaması alan grupta 7,00 ± 2,62, baklofen 250 ng ön uygulaması alan grupta ise 0,25 ± 0,25 olarak saptanmıştır. yBOS grubu ile baklofen lokal enjeksiyonu yapılan hiçbir grup arasında istatistiksel olarak anlamlılık saptanmamıştır ($p>0.05$).

NAc kabuk bölgesine bilateral yBOS ön uygulaması alan sıçanlarda 15 dakika boyunca kat edilen mesafe 593,30± 166,90 cm iken, baklofen 62,5 ng ön uygulaması alan grupta 692,10 ± 139,80 cm, baklofen 125 ng ön uygulaması alan grupta 627,90 ± 95,70 cm, baklofen 250 ng ön uygulaması alan grupta ise 64,96 ± 25,64 cm olarak saptanmıştır. Baklofen 250 ng uygulanan grup ile yBOS uygulanan grup arasında istatistiksel anlamlılık olduğu saptanmıştır ($p<0.05$) (Şekil 10).

Bu sonuçlara göre baklofen 250 ng dozunun lokomotor aktivite üzerinde baskılayıcı etkisi olduğuna karar verilmiş ve bu dozun davranışsal deneylerde kullanılmamasına karar verilmiştir.




**Şekil 10:** NAc kabuk bölgesine bilateral olarak yBOS (n=6), baklofen 62,5 ng (n=6), baklofen 125 ng (n=6) ve baklofen 250 ng (n=4) uygulanmasının lokomotor aktivite ölçümleri üzerine etkisi. *p<0.05.

### 6.1.3.Nükleus Akümbens Kabuk Bölgesine Uygulanan Baklofen (62,5, 125 ng) ve Musimolün Naloksonla İndüklenen Morfin Yoksunluğu Esnasında Lokomotor Aktivite Davranışları Üzerine Etkisi

Bu deney grubunda morfin bağımlılığı geliştirilmiş sıçanların NAc kabuk bölgesine yBOS, baklofen (62,5, 125ng) ve musimol (50 ng) uygulamalarının naloksonla tetiklenen yoksunluk sendromu sırasındaki lokomotor aktivite davranışı üzerindeki etkisi değerlendirilmiştir. Grupların istatistiksel analizleri tek yönlü varyans analizi (ANOVA) kullanılarak incelenmiştir. Gruplar arası farklılıklar "Post-hoc Dunnett's testi" uygulanarak incelenmiştir. Baklofen ve musimol lokal enjeksiyonu uygulanan gruplar ile yBOS uygulanan grup karşılaştırılmıştır.

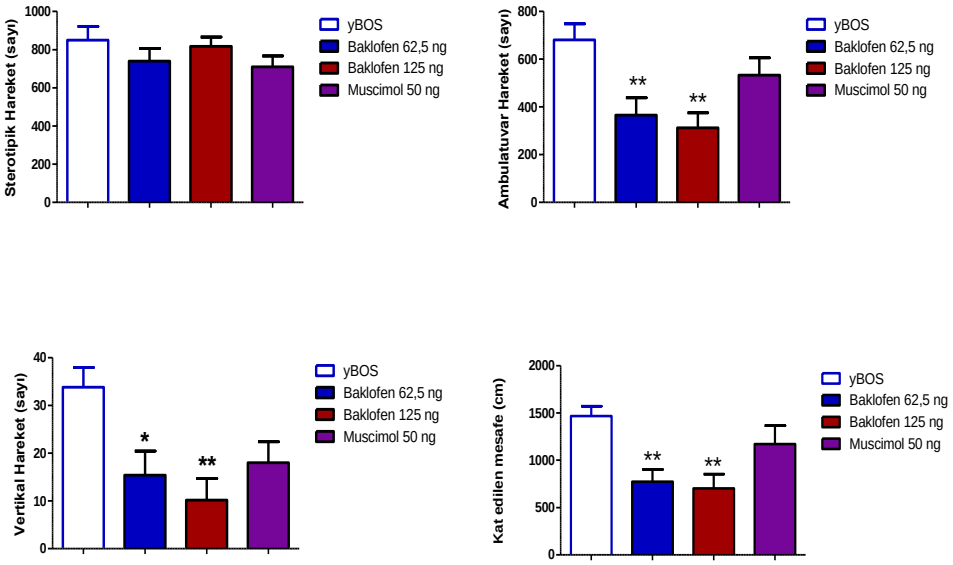
NAc kabuk bölgesine bilateral yBOS ön uygulaması alan sıçanlarda 15 dakika boyunca stereotipik hareket sayısı 850,70 ± 71,17 iken, baklofen 62,5 ng ön uygulaması alan grupta 740,0± 66,47, baklofen 125 ng ön uygulaması alan grupta

772,00 ± 25,19, musimol 50 ng ön uygulaması alan grupta ise 710,50 ± 56,77 olarak ölçülmüştür. yBOS grubu ile lokal baklofen ya da musimol enjeksiyonu yapılan hiçbir grup arasında istatistiksel olarak anlamlılık saptanmamıştır ($p>0.05$).

NAc kabuk bölgesine bilateral yBOS ön uygulaması alan sıçanlarda 15 dakika boyunca ambulatuvar hareket sayısı 681,50 ± 67,71 iken, baklofen 62,5 ng ön uygulaması alan grupta 366,40 ± 71,69, baklofen 125 ng ön uygulaması alan grupta 312,20 ± 63,55, musimol 50 ng ön uygulaması alan grupta 532,80 ± 73,24 olarak saptanmıştır. yBOS grubu ile baklofen 62,5 ng ve baklofen 125 ng enjeksiyonu yapılan gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0.05$).

NAc kabuk bölgesine bilateral yBOS ön uygulaması alan sıçanlarda 15 dakika boyunca vertikal hareket sayısı 33,83 ± 4,11 iken, baklofen 62,5 ng ön uygulaması alan grupta 15,38 ± 5,10, baklofen 125 ng ön uygulaması alan grupta 10,20 ± 4,51, musimol 50 ng ön uygulaması alan grupta 18,00 ± 4,42 olarak saptanmıştır. yBOS grubu ile baklofen 62,5 ng ve baklofen 125 ng enjeksiyonu yapılan gruplar arasında istatistiksel anlamlılık saptanmıştır ($p<0.05$).

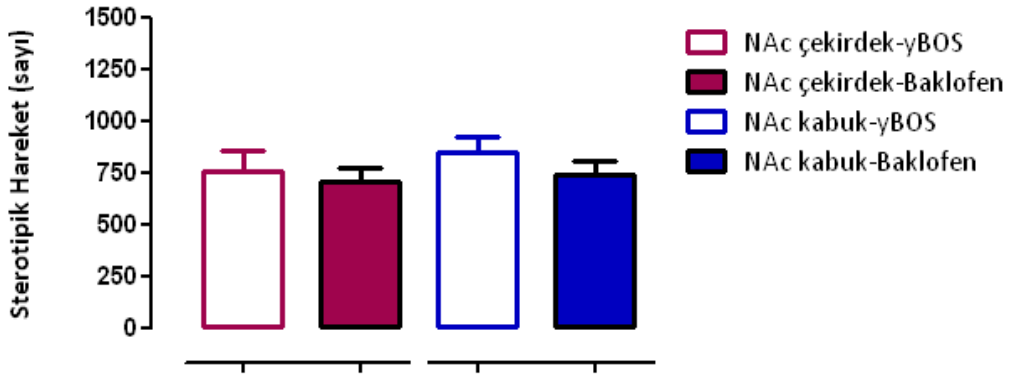
NAc kabuk bölgesine bilateral yBOS ön uygulaması alan sıçanlarda 15 dakika boyunca kat edilen mesafe 1469,00 ± 104,2 cm iken, baklofen 62,5 ng ön uygulaması alan grupta 775,80 ± 129,20 cm, baklofen 125 ng ön uygulaması alan grupta 702,60 ± 152,20 cm, musimol 50 ng ön uygulaması alan grupta 1172,00 ± 196,60 cm olarak ölçülmüştür. yBOS grubu ile baklofen 62,5 ng ve baklofen 125 ng enjeksiyonu yapılan gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0.05$). (Şekil 11).




**Şekil 11**: NAc kabuk bölgesine bilateral olarak yBOS (n=6), baklofen 62,5 ng (n=8), baklofen 125 ng (n=6) ve musimol 50 ng (n=6) uygulamalarının naloksonla (2mg/kg) indüklenen morfin yoksunluğu esnasında lokomotor aktivite ölçümleri üzerine etkisi.*p<0.05, **p<0.001.

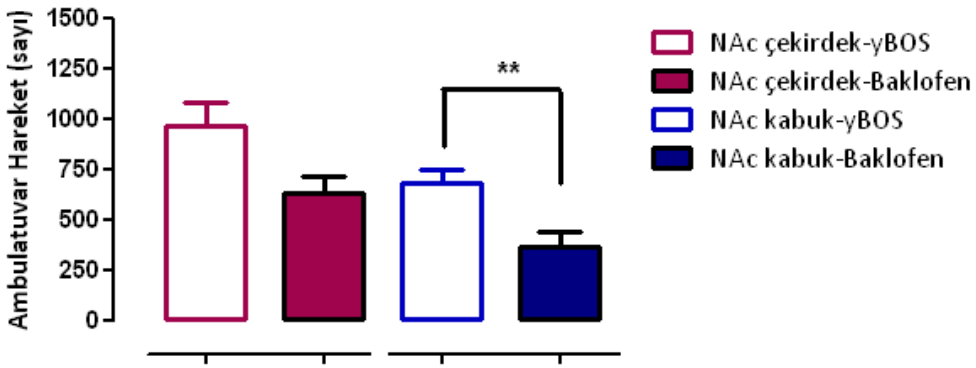
### 6.1.4. Nükleus Akümbens Kabuk ve Çekirdek Bölgesine Uygulanan Baklofenin (62,5 ng) Naloksonla İndüklenen Morfin Yoksunluğu Sendromu Esnasında LokomotorAktivite Davranışı Üzerine Etkisi

Grupların istatistiksel analizleri student'in t testi ile değerlendirilmiştir. NAc çekirdek bölgesine bilateral yBOS ön uygulaması alan sıçanlarda 15 dakika boyunca stereotipik hareket sayısı 758,00 ± 98,84 iken; baklofen ön uygulaması alan grupta 705,50 ± 65,39 olarak saptanmıştır. NAc kabuk bölgesine bilateral yBOS ön uygulaması alan sıçanlarda stereotipik hareket sayısı 850,70 ± 71,17 iken; baklofen ön uygulaması alan sıçanlarda 740,00 ± 66,47 olarak saptanmıştır. NAc'nin çekirdek veya kabuk bölgesine baklofen uygulanan grupların stereotipik hareket sayısı, yBOS uygulanan gruplar ile kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (p>0.05) (Şekil 12).



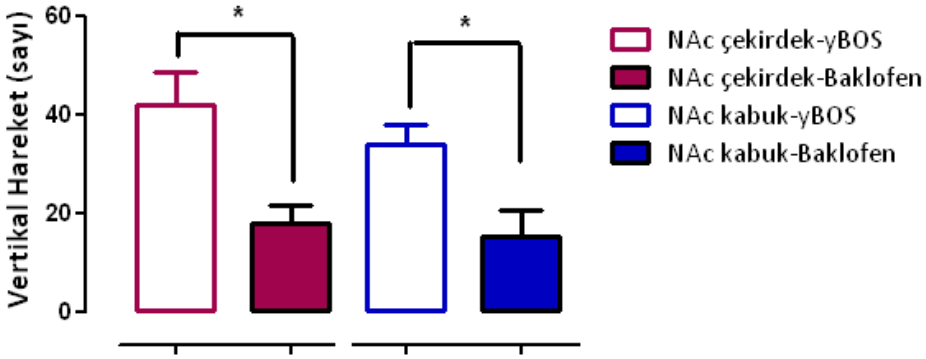

**Şekil 12**: NAc çekirdek bölgesine yBOS (n=8), baklofen 62,5 ng (n=8) veya NAc kabuk bölgesine yBOS (n=6), baklofen 62,5 ng (n=8) uygulamalarının naloksonla (2mg/kg) tetiklenen morfin yoksunluk sendromu sırasındaki stereotipik hareket sayısı üzerindeki etkisi.

NAc çekirdek bölgesine bilateral yBOS ön uygulaması alan sıçanlarda 15 dakika boyunca ambulatuvar hareket sayısı 964,10 ± 118,30 iken; baklofen ön uygulaması alan grupta 631,80 ± 86,07 olarak saptanmıştır. NAc kabuk bölgesine bilateral yBOS ön uygulaması alan sıçanlarda ambulatuvar hareket sayısı 681,50 ± 67,71 iken; baklofen ön uygulaması alan sıçanlarda 366,40± 71,69 olarak ölçülmüştür. NAc'nin kabuk bölgesine baklofen uygulanan grubun ambulatuvar hareket sayısı, yBOS uygulanan grup ile kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük bulunmuştur ($p<0.01$) ancak NAc'nin çekirdek bölgesine baklofen uygulanan grup ile yBOS uygulanan grup arasında istatistiksel olarak herhangi bir anlamlılık bulunmamıştır ($p>0.05$) (Şekil 13).



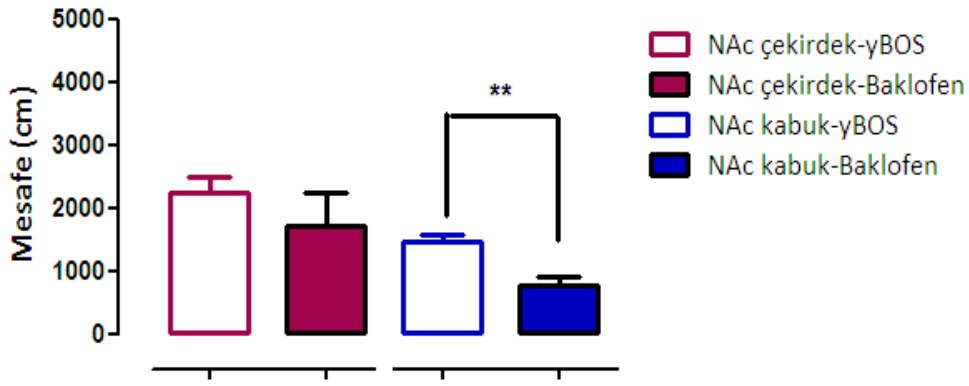

**Şekil 13**:NAc çekirdek bölgesine yBOS (n=8), baklofen 62,5 ng (n=8) ve NAc kabuk bölgesine yBOS (n=6), baklofen 62,5 ng (n=8) uygulamalarının naloksonla (2mg/kg) tetiklenen morfin yoksunluk sendromu sırasındaki ambulatuvar hareket sayısı üzerindeki etkisi. *p<0.05.

NAc çekirdek bölgesine bilateral yBOS ön uygulaması alan sıçanlarda 15 dakika boyunca vertikal hareket sayısı 42,00 ± 6,43 iken; baklofen ön uygulaması alan grupta 17,83 ± 3,80 olarak saptanmıştır. NAc kabuk bölgesine bilateral yBOS ön uygulaması alan sıçanlarda vertikal hareket sayısı 33,83 ± 4,11 iken; baklofen ön uygulaması alan sıçanlarda 15,38 ± 5,10 olarak ölçülmüştür. NAc'nin kabuk veya çekirdek bölgesine baklofen uygulanan grubun vertikal hareket sayısı, NAc'nin kabuk veya çekirdek bölgesine yBOS uygulanan grup ile kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük bulunmuştur (p<0.05) (Şekil 14).




**Şekil 14**:NAc çekirdek bölgesine yBOS (n=8), baklofen 62,5 ng (n=8) ve NAc kabuk bölgesine yBOS (n=6), baklofen 62,5 ng (n=8) uygulamalarının naloksonla (2mg/kg) tetiklenen morfin yoksunluk sendromu sırasındaki vertikal hareket sayısı üzerindeki etkisi.*p<0.05.

NAc çekirdek bölgesine bilateral yBOS ön uygulaması alan sıçanlarda 15 dakika boyunca kat edilen mesafe 2227,00 ± 257,20 cm iken; baklofen ön uygulaması alan grupta 1713,00 ± 525,80 cm olarak saptanmıştır. NAc kabuk bölgesine bilateral yBOS ön uygulaması alan sıçanlarda kat edilen mesafe 1469 ± 104,2 cm iken; baklofen ön uygulaması alan sıçanlarda 775,80 ± 129,20 cm olarak ölçülmüştür. NAc'nin kabuk bölgesine baklofen uygulanan grubun kat ettiği mesafe, yBOS uygulanan grup ile kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük bulunmuştur ($p<0.01$) ancak NAc'nin çekirdek bölgesine baklofen uygulanan grup ile yBOS uygulanan grup arasında istatistiksel olarak bir anlamlılık saptanmamıştır ($p>0.05$) (Şekil 15).



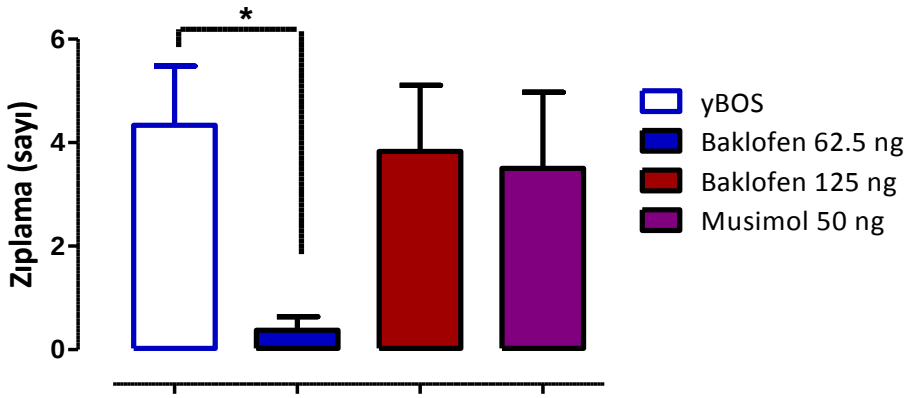

**Şekil 15**: NAc çekirdek bölgesine yBOS (n=8), baklofen 62,5 ng (n=8) ve NAc kabuk bölgesine yBOS (n=6), baklofen 62,5 ng (n=8) uygulamalarının naloksonla (2mg/kg) tetiklenen morfin yoksunluk sendromu sırasında kat edilen mesafe üzerindeki etkisi**.** **$p<0.01$.

## 6.2. Davranışsal Bulgular

### 6.2.1. Nükleus Akümbens Kabuk Bölgesine Uygulanan Baklofen (62,5, 125 ng) ve Musimolün (50 ng) Yoksunluk Bulguları Üzerine Etkisi

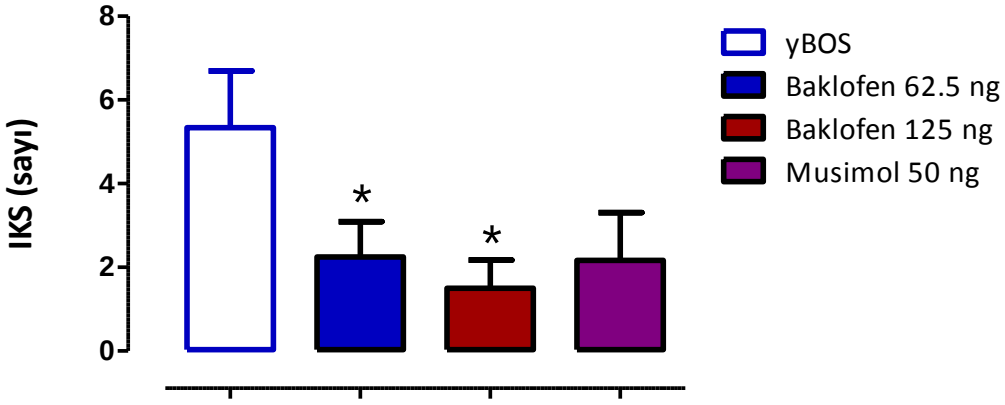
NAc kabuk bölgesine bilateral baklofen veya musimol uygulamasının yoksunluk bulguları üzerine etkisini incelemek için; morfin bağımlılığı oluşturulmuş sıçanlara gruplarına göre (yBOS, 62,5, 125 baklofen veya 50 ng musimol) madde mikroenjeksiyonu ve ardından nalokson uygulaması yapılmış; takiben lokomotor aktivite kafesindeki davranışları 15 dakika boyunca gözlemlenmiştir. Bu süre içerisinde sıçanlarda görülen fiziksel yoksunluk bulguları arasından zıplama, ıslak köpek silkinmesi, diş gıcırdatma şiddeti ve ağırlık kaybı değerlendirilmiştir. Grupların istatistiksel analizleri tek yönlü varyans analizi kullanılarak incelenmiştir. Gruplar arası farklılıklar "Post-hoc Dunnett's testi" uygulanarak incelenmiştir.

NAc kabuk bölgesine bilateral yBOS ön uygulaması alan sıçanlarda 15 dakika boyunca zıplama sayısı 4,33 ± 1,14 iken,baklofen 62,5 ng ön uygulaması alan grupta 0,37 ± 0,26, baklofen 125 ng ön uygulaması alan grupta 3,83 ± 1,27, musimol 50 ng ön uygulaması alan grupta ise 3,50 ± 1,47 olarak hesaplanmıştır. yBOS uygulanan uygulanan grup ile 62,5 ng baklofen uygulanan grup arasında istatistiksel anlamlılık saptanmış ($p<0.05$), ancak yBOS grubu ile 125 ng baklofen ve yBOS grubu ile musimol (50 ng) grubu arasında istatistiksel bir anlamlılık bulunmamıştır ($p>0.05$) (Şekil 16).




**Şekil 16**:NAc kabuk bölgesine yBOS (n=6), baklofen 62,5 ng (n=8), baklofen 125 ng (n=6), musimol 50 ng (n=6) uygulamalarının morfin peleti yerleştirilmiş sıçanlarda, nalokson (2mg/kg) ile indüklenen yoksunluk belirtilerinden zıplama üzerine etkisi. *p<0.05.

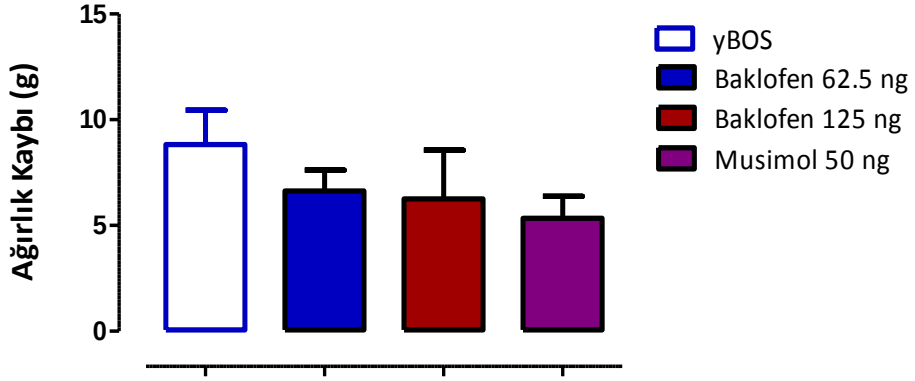
NAc kabuk bölgesine bilateral yBOS ön uygulaması alan sıçanlarda 15 dakika boyunca ıslak köpek silkinmesi sayısı 5,33 ± 1,35 iken, baklofen 62,5 ng ön uygulaması alan grupta 2,25 ± 03,75, baklofen 125 ng ön uygulaması alan grupta 1,50 ± 0,67, musimol 50 ng ön uygulaması alan grupta ise 2,16 ± 1,13 olarak hesaplanmıştır. yBOS uygulanan uygulanan grup ile 62,5 ve 125 ng baklofen uygulanan gruplar arasında istatistiksel bir anlamlılık saptanmıştır (p<0.05).(Şekil 17).



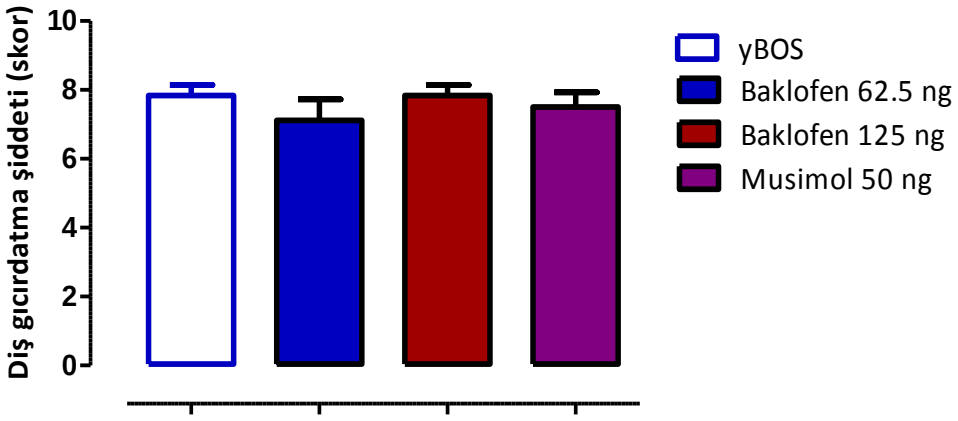

**Şekil 17**:NAc kabuk bölgesine yBOS (n=6), baklofen 62,5 ng (n=8), baklofen 125 ng (n=6), musimol 50 ng (n=6) uygulamalarının morfin peleti yerleştirilmiş sıçanlarda, nalokson (2mg/kg) ile indüklenen yoksunluk belirtilerinden ıslak köpek silkinmesi üzerine etkisi. *p<0.05.

NAc kabuk bölgesine bilateral yBOS ön uygulaması alan sıçanlarda ağırlık kaybı 7,60 ± 1,28 gram iken, baklofen 62,5 ng ön uygulaması alan grupta 8,83 ± 1,62gram, baklofen 125 ng ön uygulaması alan grupta 6,25 ± 2,30 gram, musimol 50 ng ön uygulaması alan grupta ise 5,33 ± 1,05 gram olarak saptanmıştır. yBOS uygulanan uygulanan grup ile hiçbir grup arasında istatistiksel bir anlamlılık yoktur ($p>0.05$) (Şekil 18).

NAc kabuk bölgesine bilateral yBOS ön uygulaması alan sıçanlarda 15 dakika boyunca diş gıcırdatma şiddeti 7,833 ± 0,3073 iken, baklofen 62,5 ng ön uygulaması alan grupta 7,11 ± 0,61 , baklofen 125 ng ön uygulaması alan grupta 7,83 ± 0,30, musimol 50 ng ön uygulaması alan grupta ise 7,50 ± 0,42 olarak saptanmıştır. yBOS uygulanan uygulanan grup ile hiçbir grup arasında istatistiksel olarak anlamlılık bulunmamıştır ($p>0.05$) (Şekil 19).




**Şekil 18**:NAc kabuk bölgesine yBOS(n=6), baklofen 62,5 ng (n=8), baklofen 125 ng (n=6), musimol 50 ng (n=6) uygulamalarının morfin peleti yerleştirilmiş sıçanlarda, nalokson (2mg/kg) ile indüklenen yoksunluk belirtilerinin sonuçlarından ağırlık kaybı üzerine etkisi.

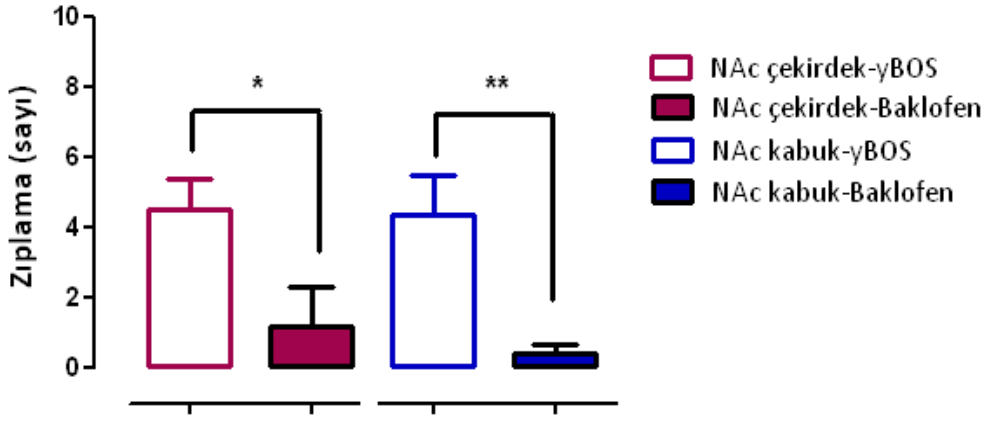



**Şekil 19**:NAc kabuk bölgesine yBOS (n=6), baklofen 62,5 ng (n=8), baklofen 125 ng (n=6), musimol 50 ng (n=6) uygulamalarının morfin peleti yerleştirilmiş sıçanlarda, nalokson (2mg/kg) ile indüklenen yoksunluk belirtilerinden diş gıcırdatma şiddeti üzerine etkisi

### 6.2.2. Nükleus Akümbens Kabuk ve Çekirdek Bölgesine Uygulanan Baklofenin (62,5 ng) Yoksunluk Bulguları Üzerine Etkisi

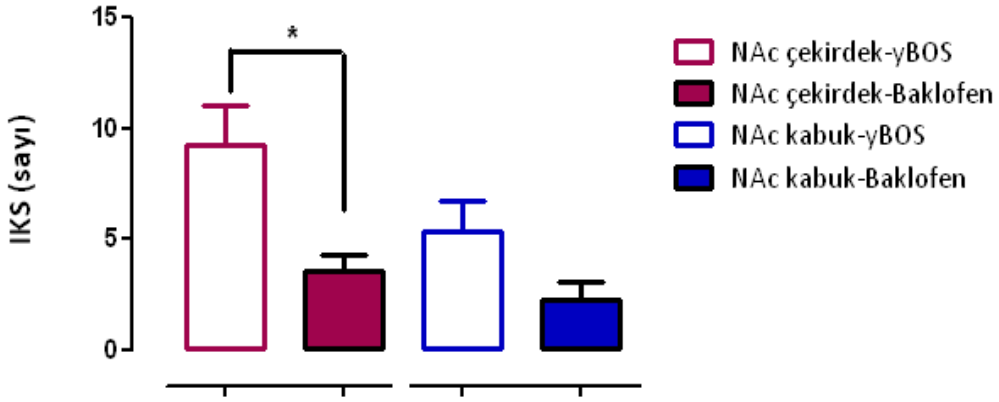
NAc kabuk/çekirdek bölgelerine bilateral baklofen uygulamasının yoksunluk bulguları üzerine etkisini incelemek için; morfin bağımlılığı oluşturulmuş sıçanlara gruplarına göre (yBOS veya 62,5 ng baklofen) madde mikroenjeksiyonu ve ardından nalokson uygulaması yapılmış; takiben lokomotor aktivite kafesindeki davranışları 15 dakika boyunca gözlemlenmiştir. Bu süre içerisinde sıçanlarda görülen fiziksel yoksunluk bulguları arasından zıplama, ıslak köpek silkinmesi, diş gıcırdatma şiddeti ve ağırlık kaybı değerlendirilmiştir. Grupların istatistiksel analizleri student'in t testi ile değerlendirilmiştir.

NAc çekirdek bölgesine bilateral yBOS ön uygulaması alan sıçanlarda 15 dakika boyunca zıplama sayısı 4,50 ± 0,89 iken; baklofen ön uygulaması alan grupta 1,14 ± 1,14 olarak saptanmıştır. NAc kabuk bölgesine bilateral yBOS ön uygulaması alan sıçanlarda zıplama sayısı 4,33 ± 1,14 iken; baklofen ön uygulaması alan sıçanlarda 0,37 ± 0,26 olarak saptanmıştır. NAc'nin çekirdek bölgesinde de ($p<0.05$) kabuk bölgesinde de ($p<0.01$) baklofen uygulanan grupların zıplama sayısı yBOSuygulanan gruplara göre istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük bulunmuştur (Şekil 20).



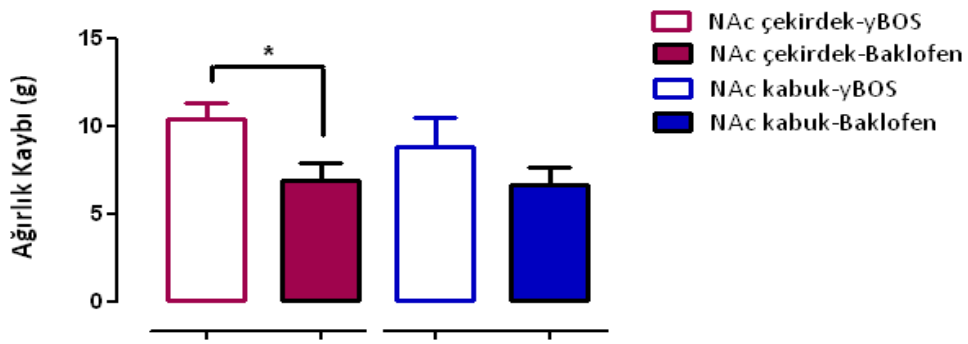

**Şekil 20**:NAc çekirdek bölgesine yBOS (n=8),baklofen 62,5 ng (n=8) ve NAc kabuk bölgesine yBOS (n=6), baklofen 62,5 ng (n=8) uygulamalarının morfin peleti yerleştirilmiş sıçanlarda, nalokson (2mg/kg) ile indüklenen yoksunluk belirtilerinden zıplama üzerindeki etkileri. *p<0.05, **p<0.01.

Naloksonla tetiklenen yoksunluk sendromu öncesinde NAc çekirdek bölgesine bilateral yBOS ön uygulaması alan sıçanlarda 15 dakika boyunca ıslak köpek silkinmesi sayısı 9,22 ± 1,84 iken; baklofen ön uygulaması alan sıçanlarda 3,57 ± 0,71 olarak saptanmıştır. NAc kabuk bölgesine bilateral yBOS ön uygulaması alan sıçanlarda ıslak köpek silkinmesi sayısı 5,33 ± 1,35 iken; baklofen grubunda 2,25 ± 0,83 olarak ölçülmüştür. NAc'nin çekirdek bölgesine baklofen uygulanan grubun ıslak köpek silkinmesi sayısı, yBOS uygulanan grup ile kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük bulunmuştur (p<0,05) ancak NAc'nin kabuk bölgesine baklofen uygulanan grup ile yBOS uygulanan grup arasında istatistiksel olarak bir anlamlılık saptanmamıştır (Şekil 21).



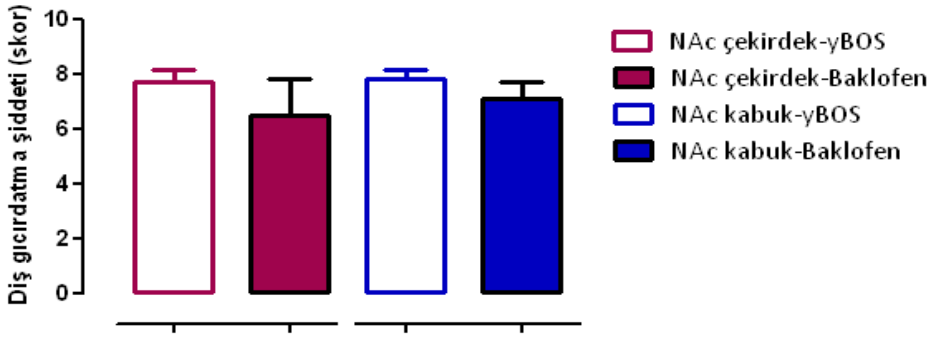

**Şekil 21**:NAc çekirdek bölgesine yBOS (n=8), baklofen 62,5 ng (n=8) ve NAc kabuk bölgesine yBOS (n=6), baklofen 62,5 ng (n=8) uygulamalarının morfin peleti yerleştirilmiş sıçanlarda, nalokson (2mg/kg) ile indüklenen yoksunluk belirtilerinden ıslak köpek silkinmesi. *p<0.05.

NAc çekirdek bölgesine bilateral yBOS ön uygulaması alan sıçanlarda ağırlık kaybı 10,43 ± 0,84 gram iken; baklofen ön uygulaması alan sıçanlarda 6,85 ± 1,05 gram olarak saptanmıştır (p<0,05). NAc kabuk bölgesine bilateral yBOS ön uygulaması alan sıçanlarda ağırlık kaybı 8,833 ± 1,621 gram iken; baklofen ön uygulaması alan sıçanlarda 6,62 ± 0,99 gram olarak hesaplanmıştır. NAc'nin çekirdek bölgesine baklofen uygulanan grubun ağırlık kaybı, yBOS uygulanan grup ile kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı ölçüde düşük bulunmuştur (p<0.05) ancak NAc'nin kabuk bölgesine baklofen uygulanan grup ile yBOS uygulanan grup arasında istatistiksel anlamlılık bulunmamıştır (p>0.05) (Şekil 22).




**Şekil 22**:NAc çekirdek bölgesine yBOS (n=8), baklofen 62,5 ng (n=8) ve NAc kabuk bölgesine yBOS (n=6), baklofen 62,5 ng (n=8) uygulamalarının morfin peleti yerleştirilmiş sıçanlarda, nalokson (2mg/kg) ile indüklenen yoksunluk belirtilerinin sonuçlarından ağırlık kaybı üzerine etkisi. *p<0.05.

NAc çekirdek bölgesine bilateral yBOS ön uygulaması alan sıçanlarda diş gıcırdatma şiddeti 7,70 ± 0,44 iken; baklofen ön uygulaması alan sıçanlarda 6,50 ± 1,31 olarak saptanmıştır. NAc kabuk bölgesine bilateral yBOS ön uygulaması alan sıçanlarda diş gıcırdatma şiddeti 7,83 ± 0,30 iken; baklofen ön uygulaması alan sıçanlarda 7,11 ± 0,61 olarak ölçülmüştür. NAc'nin çekirdek veya kabuk bölgesine baklofen uygulanan grupların diş gıcırdatma şiddeti NAc'nin çekirdek veya kabuk bölgesine yBOS uygulanan gruplar ile kıyaslandığında istatistiksel anlamlılık bulunmamıştır (p>0.05) (Şekil 23).




**Şekil 23**:NAc çekirdek bölgesine yBOS (n=8), baklofen 62,5 ng (n=6) ve NAc kabuk bölgesine yBOS (n=6), baklofen 62,5 ng (n=9) uygulamalarının morfin peleti yerleştirilmiş sıçanlarda, nalokson (2mg/kg) ile indüklenen yoksunluk belirtilerinden diş gıcırdatma şiddeti üzerine etkisi.

# 7.TARTIŞMA ve SONUÇLAR

Bu çalışmada bağımlılık ve yoksunlukta kritik öneme sahip olan NAc'ye bilateral uygulanan $GABA_A$ agonisti musimol ve $GABA_B$ agonisti baklofenin, morfin bağımlısı sıçanlarda, naloksonla indüklenmiş yoksunlukta davranış bulguları ve lokomotor aktivite davranışı üzerinde etkisi araştırılmıştır ve birincil bulgu olarak $GABA_B$ agonisti baklofenin (62,5 ng) naloksonla indüklenen morfin yoksunluğu esnasında davranış ve lokomotor aktivite bulguları üzerinde baskılayıcı yönde bir etki meydana getirdiği saptanmıştır.

GABA reseptör agonistleri musimol ve baklofenin lokomotor aktivite davranışlarında azalmaya neden olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur. Yapılan bir çalışmada dorsal rafe çekirdeğine lokal olarak uygulanan baklofen ya da musimolün (25-100 ng) lokomotor aktiviteyi azalttığı saptanmıştır (Przewłocka, Stala and Scheel-Krüger 1979). Bizim çalışmamızda baklofenin etkin dozunu belirlemek için morfin bağımlısı olmayan hayvanlarla doz belirleme çalışması yapılmış ve NAc kabuk bölgesine bilateral olarak uygulanan 250 ng dozunun lokomotor aktivitenin stereotipik hareket, vertikal hareket ve kat edilen mesafe gibi değişkenlerinde baskılamaya neden olduğu gözlemlenmiştir. Sıçanların lokomotor aktivitesinde istatistiksel azalmaya yol açan baklofen 250 ng dozu yoksunluk deneylerinde kullanılmamıştır (Şekil 10). Ancak yine morfin bağımlısı olmayan hayvanların NAc kabuk bölgesine bilateral baklofen 62,5 ve 125 ng dozu uygulandığında lokomotor aktivitede anlamlı bir değişikliğe neden olmamıştır.

Opioidlere tekrarlanan sayıda maruz kalma lokomotor aktivitede artışa neden olmakta ve bu duruma davranışsal sensitizasyon denmektedir (Smith et al 2009). Baklofenin (0,01, 0,05, 0,1, and 1,0 nmol) VTA'ya bilateral olarak uygulanmasının doza bağımlı olarak morfinle indüklenmiş lokomotor aktivite davranışında anlamlı oranda azalmaya neden olduğu gözlemlenmiştir (Leite-Morris et al. 2002). Yapılan bir başka çalışmada ise sistemik uygulanan baklofenin (2,5, 5 mg/kg, s.c.) morfin sensitizasyonunu gelişimini inhibe ettiği saptanmıştır (Fu, Yang, Xiao, Zhao and Huang 2012). Bu inhibisyonu lokomotor aktivite deneyleri kullanarak saptamışlardır.

Bizim çalışmamızda öncelikle naloksonla indüklenmiş morfin yoksunluğunda baklofenin lokomotor aktivite üzerine etkisi incelenmiştir. Morfin yoksunluğunda NAc'ye yBOS uygulanan grup ve baklofen (62,5 ng) uygulanan grup karşılaştırılmış ve baklofen uygulanan grupta lokomotor aktivitede anlamlı bir azalma saptanmıştır. Çekirdek bölgesine baklofen (62,5 ng) uygulanan grupta morfin yoksunluğunda vertikal davranışlarda anlamlı bir azalma gözlenirken, kabuk bölgesine baklofen (62,5 ng) uygulanan grupta ise vertikal hareket, ambulatuvar hareket ve kat edilen mesafe değişkenleri üzerinde anlamlı bir azalma saptanmıştır. Baklofen 125 ng uygulanan grupta da vertikal hareket, ambulatuvar hareket ve kat edilen mesafe değişkenleri üzerinde anlamlı bir azalma saptanmıştır. NAc'nin kabuk bölgesine uygulanan musimol (50 ng) ise naloksonla indüklenen morfin yoksunluğunda lokomotor aktivite üzerinde anlamlı bir değişikliğe neden olmamıştır (Şekil 11).

NAc'ye baklofen (62,5 ng) uygulamasının naloksonla indüklenen morfin yoksunluğu esnasındaki davranış bulgularını da etkilediği gösterilmiştir. Baklofen 62,5 ng dozunda kabuk bölgesine uygulandığında naloksonla indüklenen morfin yoksunluğunda zıplama davranışını anlamlı ölçüde azaltmış ancak ıslak köpek silkinmesi, diş gıcırdatma şiddeti ve ağırlık kaybında anlamlı bir farka yol açmamıştır. Baklofen 125 ng dozunda NAc kabuk bölgesine uygulandığında yoksunluk belirtilerinden ıslak köpek silkinmesi üzerinde etkili bulunmştur, bu belirtide anlamlı bir azalmaya neden olmuştur. Baklofen (62,5 ng) NAc çekirdek bölgesine uygulandığında naloksonla indüklenen morfin yoksunluğunda zıplama, ıslak köpek silkinmesi davranışlarını ve ağırlık kaybını anlamlı ölçüde azaltmıştır. NAc kabuk bölgesine uygulanan musimol (50 ng) ise naloksonla indüklenen morfin yoksunluk sendromu esnasında herhangi bir değişken üzerinde istatistiksel olarak anlamlı bir etkiye neden olmamıştır.

Daha önce yapılan pek çok çalışmada $GABA_A$ ve $GABA_B$ agonistlerinin ilaç bağımlılığı ve yoksunluğunda rol oynadığı gösterilmiştir. Baklofenin morfin yoksunluk sendromunda etkili olabileceğini ilk kez Bowery (1982) öne sürmüştür. Zarrindash ve Ahmadi'nin yaptığı çalışmada baklofen ve musimolün intreperitoneal (i.p.) ve intraserebroventriküler (i.c.v.) olarak uygulanmasının farelerde naloksonla indüklenen morfin yoksunluğu esnasındaki zıplama davranışını azalttığı

gösterilmiştir (Zarrindash and Mousa-Ahmadi 1999). Bizim çalışmamızda da litaratüre uygun olarak baklofen (62.5 ng) sıçanların zıplama davranışında azalmaya yol açmıştır. Bu bulgu baklofenin sıçanların zıplama davranışı üzerindeki etkiside NAc'nin rolü olduğuna işaret etmektedir. Ancak NAc'ye lokal olarak musimol uygulanan hayvanlarda sistemik uygulamadan farklı olarak sıçrama davranışında istatistiksel bir azalma olmamıştır. Önceki çalışmalardan farklı olarak musimolün sistemik uygulamadan farklı bir davranış paterni göstermesi ise bu bölgedeki $GABA_A$ reseptörlerinin sıçanların zıplama davranışında rolü olmayabileceğine işaret etmektedir (Şekil 16)

Kruszewska (1988) yaptığı çalışmada baklofenin sistemik uygulamasının, naloksonla indüklenmiş morfin yoksunluğunda ıslak köpek silkinmesi sayısını azalttığını göstermiştir. Bizim yaptığımız çalışmada da bu çalışmaya uygun olarak $GABA_B$ agonisti baklofenin NAc'ye uygulanması ıslak köpek titremesi davranışını anlamlı olarak azaltmış, musimol ise herhangi bir değişikliğe yol açmamıştır. Bu bulgu bize ıslak köpek silkinmesi davranışında ki azalmanın NAc' deki $GABA_B$ reseptörleri aracılığıyla olabileceğini düşündürmektedir (Şekil 21).

Yapılan başka bir çalışmada ise sistemik uygulanan (i.p.) baklofenin morfin yoksunluğunda sıçanlarda stereotipik kafa hareketleri, ağırlık kaybı, pitozis, çiğneme hareketini azalttığı saptanmıştır (Bexis et al 2001). Bizim yaptığımız çalışmada da baklofenin ağırlık kaybını azalttığı saptanmıştır (Şekil 22). NAc'ye lokal olarak uygulanan baklofenin periferik olduğu düşünülen ağırlık kaybına etkisi beklenmeyen bir bulgudur.

Baklofen ve musimol kendine verme çalışmalarında da kullanılmıştır. Baklofen ve musimolün ön tedavi olarak i.p. uygulanmasının sıçanlarda doza bağımlı olarak bir morfin kendine verme çalışmasında morfin alımını azalttığı gözlemlenmiştir ve bu etkinin GABA antagonistleri SCH 50911 ve bikukulin ile geri döndüğü görülmüştür (Yoon et al 2007). Yine baklofen ve musimolun kullanıldığı bir başka çalışmada da, baklofen ve musimolün sıçan NAc'sine bilateral olarak uygulanmasının morfin kendine verme davranışındaki etkisi incelenmiş, musimolün kendine verme cevabını anlamlı olarak azalttığı ancak baklofenin böyle bir etki yapmadığı görülmüştür (Yoon et al 2009). Bizim çalışmamızda ise NAc

kabuk bölgesine uygulanan musimol etkili bulunmamıştır ancak bu çalışmadan farklı olarak bizim çalışmamızda morfin yoksunluğundaki davranışsal parametreleri incelenmiştir.

Kötüye kullanılan ilaçların pekiştirici etkileri ile ilişkilendirilen başlıca sistem mezokortikolimbik dopaminerjik sistemdir. Çok sayıda çalışma ventral tegmental alandan (VTA) nükleus akümbense (NAc) projeksiyon yapan mezolimbik dopaminerjik sistemin opioid pekiştirilmesinin başlamasında kritik bir öneme sahip olduğunu göstermiştir (Hedayat et al 2005). NAc'nin, bağımlılıkla ilişkilendirilen ilaçların ödüllendirici ve motivasyonel etkileriyle ilişkili olduğu düşündürmektedir (Koob, 1998). NAc deki nöronların çoğu GABAerjiktir ve bu GABAerjik nöronların opioid reseptör aracılı inhibisyonunun opioid pekiştirilmesi ve lokomotor davranışlarda direkt olarak aracılık ettiği hipotezi kurulmuştur.

NAc; medioventral kabuk bölgesi ve dorsolateral çekirdek bölgesini içermektedir. Kabuk ve çekirdek bölgelerinin farklı fonksiyonel rolleri olduğu bilinmektedir. Kötüye kullanılan ilaçların alınmasının NAc kabuk bölgesinde dopamin salınımını artırdığı görülmüştür (Di Chiara, Tanda, Frau and Carboni 1993). Çekirdek bölgesinin ise ilaç arama davranışının koşullandırma modellerinde kritik role sahip olduğu görülmüştür (Di Ciano, Cardinal, Cowell, Little and Everitt 2001). NAc kabuk bölgesinin genel olarak motivasyonel mekanizmalarda (kötüye kullanılan ilaçların pekiştirici etkilerinin düzenlenmesinde) (Yoon et al, 2007) ve çekirdek bölgesinin ise motor fonksiyonlarda rol aldığı düşünülmektedir (Kelley 1999). Bizim çalışmamızda opioid bağımlılığında etkisi gösterilmiş $GABA_B$ agonisti baklofen (62,5 ng) naloksonla indüklenmiş morfin yoksunluğunda NAc kabuk ve çekirdek bölgesine uygulanmış ve her iki bölgede de etkili bulunmuştur. Bir $GABA_A$ agonisti olan musimolün (50 ng) kabuk bölgesine uygulanması ise naloksonla indüklenen morfin yoksunluğunda etkili bulunmamıştır. Bu da NAc'de naloksonla indüklenen morfin yoksunluğunda bu etkinin $GABA_B$ reseptörleri üzerinden gerçekleştiğini düşündürmektedir.

$GABA_B$ reseptör agonistlerinin opioid bağımlılığı çalışmalarında dopaminerjik etkileri düzenlediği gösterilmiştir (Tyacke, Lingford-Hughes, Reed and Nutt 2010). Yapılan bir çalışmada baklofenle ön tedavinin morfin, nikotin ve kokain

uygulanmış sıçanlarda intraperitoneal (i.p.) olarak uygulanmasının doza bağımlı olarak, sıçan NAc kabuk bölgesinde dopamin salınımını azalttığı göstermiştir (Fadda et al 2003). Bir başka çalışmada ise baklofenin NAc'ye uygulanmasının sıçanlarda alliglisinle indüklenmiş dopamin akışını azalttığı ancak musimolün NAc'ye uygulanmasının böyle bir etki yapmadığı gösterilmiştir (Saigusa et al 2012). Zhenyu ve ark. nın (2012) yaptığı çalışmada ise baklofen tedavisinin (s.c.) sıçanlarda morfin sensitizasyonu kazanılmasını ve NAc kabuk bölgesinde dopamin salınımını inhibe ettiği saptanmıştır. VTA'daki $GABA_B$ reseptör aktivasyonunun NAc'de sinaptik dopamin salınımını azalttığı daha önce yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (Pinto, Jankowski and Sesack 2003). Bu da etkinin VTA'da dopaminerjik nöronlar üzerinde bulunan $GABA_B$ reseptörlerinden kaynaklı olabileceğini düşündürmektedir. Bu bulgular bizim çalışmamızda da baklofenin naloksonla indüklenmiş morfin yoksunluğunda dopaminerjik nöronlar üzerinde bulunan bu $GABA_B$ reseptörlerini aktive ederek NAc kabuk ve çekirdek bölgesinde dopamin salınımını inhibe ederek davranış ve lokomotor aktivite bulgularını azalttığı düşündürmektedir.

Ancak yakın zamanda opioid bağımlılığında glutamaterjik sistem gibi non-DAerjik nörotransmiter sistemlerinde rol oynadığı keşfedilmiştir (Fu et al 2012). NAc'ye NMDA antagonistlerinin uygulanmasının morfin yoksunluk bulgularını azalttığı gösterilmiştir (Ji et al 2004). Baklofenin NAc'ye uygulanması ağırlıklı olarak $GABA_B$'nin presinaptik inhibisyonu aracılığıyla *medium spiny* nöronlarda inhibisyona neden olmaktadır. NAc'ye gelen primer stimulan nörotransmiterin glutamat olduğu bilinmekte ve NMDA antagonistlerinin yoksunluk bulgularını azalttığı göz önüne alındığında baklofenin yoksunluk bulgularını azaltıcı etkisinin NAc'deki glutamat salınımının presinaptik inhibisyonuna bağlı olabileceği düşünülmektedir. Baklofenin yoksunluk bulgularını baskılayıcı etkisinin yalnızca düşük doz (62,5 ng) uygulanan sıçanlarda gözlenmesi, ve yüksek dozunda (125 ng) bu etkinin görülmemesi, bu dozlarda glutamatla birlikte dopamin salınımında da azalmaya neden olmasıyla açıklanabilir.

Musimolün $GABA_A$ reseptörleri aracılığıyla NAc' de *medium spiny* nörönlar üzerinde hem presinaptik hem de postsinaptik inhibisyona neden olabileceği gösterilmiştir (Yamamoto et al 2010). Buna karşın çalışmada NAc'sine musimol

uygulanan hayvanların önceki çalışmaların aksine sistemik uygulamadan farklı bir davranış paterni göstermesi ve baklofenden farklı olarak yoksunluk belirtileri üzerine baskılayıcı etki oluşturmaması NAc'de $GABA_A$ reseptörlerinden çok glutamaterjik nöronlarda yer alan $GABA_B$ reseptörlerinin sıçanların yoksunluk davranışında rolü olabileceğine işaret etmektedir. Bu bölgedeki baklofen uygulamasının yoksunluk belirtilerinde azalmaya yol açması fakat musimol uygulamasının bu etkiyi göstermemesi glutamaterjik eksitatör iletinin baskılanması sonucu olabileceğini düşündürmektedir. $GABA_B$ reseptör agonistlerinin DA reseptörleri üzerine de inhibe edici etkisi olduğu bilinmektedir (Pinto, Jankowski and Sesack 2003).

Bu bulgular ışığında $GABA_B$ agonisti baklofenin yoksunluk bulgularını azaltıcı etkisinin; GABAerjik inhibisyon, glutamaterjik inhibisyon ya da dopaminerjik modülasyon (inhibe edici yönde) yoluyla meydana geldiği düşünülmektedir. Bütün bu bulgular $GABA_B$'nin etkilerini otoreseptörler veya heteroreseptörler aracılığı ile yaptığını düşündürmektedir. Dopaminerjik ve glutamaterjik ajanların $GABA_B$ agonistleri ile beraber incelenmesi bu mekanizmaların aydınlatılmasında yarar sağlayacaktır.

**Sonuçlar Özet:**

1) $GABA_B$ agonisti baklofenin (62,5 ng) naloksonla indüklenen morfin yoksunluğu esnasında davranış ve lokomotor aktivite bulguları üzerinde baskılayıcı yönde bir etki meydana getirdiği saptanmıştır.

2) $GABA_A$ agonisti musimolün naloksonla indüklenen morfin yoksunluğu esnasında davranış ve lokomotor aktivite bulguları üzerinde bir etkisi olmamıştır.

# 8.KAYNAKLAR


Akhondzadeh S, Ahmadi-Abhari SA, Assadi SM, Shabestari OL, Kashani AR, Farzanehgan ZM. (2000). Double-blind randomized controlled trial of baclofen vs. clonidine in the treatment of opiates withdrawal. *J Clin Pharm Ther*., 25:347–353.

Akil, H., Watson, S. J., Young, E., Lewis, M. E., Khachaturian H., and Walker, J.M. (1984). Endogenous opioids: biology and function. *Annual Review of Neuroscience*, 7, 223–255.

Amerikan Psikiyatri Birliği. (2007). The Diagnostins and Statistical Manual of Mental Disorders (DSM-IV-TR). American Pyschiatric Association, Washington DC.

Bailey CP, Connor M. (2005). Opioids: cellular mechanisms of tolerance and physical dependence. *Curr Opin Pharmacol.*, 5(1):60-8.

Beninger RJ. (1983).The role of dopamine in locomotor activity and learning. *Brain Res.*, 287(2):173-96.

Bexis S, Ong J, White J. (2001). Attenuation of morphine withdrawal signs by the GABA(B) receptor agonist baclofen. *Life Sci.*, 14;70(4):395-401.

Bowery, N.G. (1982). Baclofen: 10 years on. *Trends in Pharmacological Sciences*, 3: 400–403.

Brog JS, Salyapongse A, Deutch AY, Zahm DS. (1993). The patterns of afferent innervation of the core and shell in the "accumbens" part of the rat ventral striatum: immunohistochemical detection of retrogradely transported fluoro-gold. *J Comp Neurol.*, 338(2):255-78.

Brunton LL, Parker KL. (2011). Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics.12th ed., The McGraw-Hill Companies, China.

Carlezon WA Jr, Thomas MJ. (2008). Biological substrates of reward and aversion: a nucleus accumbens activity hypothesis. *Neuropharmacology*, 56 Suppl 1:122-32.

Chandra D, Halonen LM, Linden A, Procaccini C, Hellsten K, Homanics GE, Korpi ER. (2010). Prototypic GABAA Receptor Agonist Muscimol Acts Preferentially Through Forebrain High-Affinity Binding Sites. *Neuropsychopharmacology*, 35(4): 999–1007.

Chebib M, Johnston GA. (1999). The 'ABC' of GABA receptors: a brief review.*Clin Exp Pharmacol Physiol*., 26(11):937-40.

Christie MJ. (2008). Cellular neuroadaptations to chronic opioids: tolerance, withdrawal and addiction. *Br J Pharmacol,* 154(2):384-96.

Christie MJ, Williams JT, and North RA. (1987). Cellular mechanisms of opioid tolerance: studies in single brain neurons. *Molecular Pharmacology*., 32(5):633–8.

Colombo G, Agabio R, Carai MA, Lobina C, Pani M, Reali R, Addolorato G, Gessa GL. (2000). Ability of baclofen in reducing alcohol intake and withdrawal severity. I. Preclinical evidence. *Alcohol Clin Exp Res*., 24:58–66.

Di Chiara G. (2002).Nucleus accumbens shell and core dopamine: differential role in behavior and addiction.*Behav Brain Res.*,137(1-2):75-114.

Di Chiara G, Tanda G, Frau R, Carboni E. (1993).On the preferential release of dopamine in the nucleus accumbens by amphetamine: further evidence obtained by vertically implanted concentric dialysis probes.*Psychopharmacology (Berl).*112(2-3):398-402.

Di Ciano P, Cardinal RN, Cowell RA, Little SJ, Everitt BJ. (2001)Differential involvement of NMDA, AMPA/kainate, and dopamine receptors in the nucleus accumbens core in the acquisition and performance of pavlovian approach behavior.*J Neurosci*, 21(23):9471-7.

Eddy NB, Halbach H, Isbell H, Seevers MH. (1965). Drug dependence: its significance and characteristics. *Bull World Health Organ.*,32(5):721-33.

Engberg G, Elverfors A, Jonason J, Nissbrandt H. (1997).Inhibition of dopamine re-uptake: significance for nigral dopamine neuron activity. *Synapse*., 25(2):215-26.

Fadda P, Scherma M, Fresu A, Collu M, Fratta W. (2003). Baclofen antagonizes nicotine-, cocaine-, and morphine-induced dopamine release in the nucleus accumbens of rat. *Synapse*, 50(1):1-6.

Fattore L, Cossu G, Martellotta MC, Deiana S, Fratta W. (2001). Baclofen antagonises intravenous self-administration of gammahydroxybutyric acid in mice. *Neuroreport.*, 12:2243–2246.

Filip M, Frankowska M. (2008). GABA(B) receptors in drug addiction. *Pharmacol Rep.,* 60(6):755-70.

Fu Z, Yang H, Xiao Y, Zhao G, Huang H. (2012). The γ-aminobutyric acid type B (GABAB) receptor agonist baclofen inhibits morphine sensitization by decreasing the dopamine level in rat nucleus accumbens. *Behav Brain Funct.,* 1744-9081-8-20.

Gutstein, H. B., Akil, H. (2001). Opioid analgesics. In Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, 10th ed.,(Hardman JG,. Limbird LE, and Goodman-Gilman A, Eds.),pp. 569–619, McGraw-Hill, New York.

Guyton AC, Hall JE. (2007). Textbook of Medical Physiology. Tıbbi Fizyoloji. 11. Baskı, Çeviren: Çavuşoğlu H, Yeğen BÇ. Nobel Tıp Kitabevleri Ltd. Şti., İstanbul

Hall W, Doran C, Degenhardt L, Shepard D. (2006). Illicit Opiate Abuse. 2nd edition. Ed.: Jamison DT, Breman JG, Measham AR, Alleyne G, Claeson M, Evans DB, Jha P, Mills A, Musgrove P. Chapter 48. World Bank. Washington (DC) .

Himmelsbach CK. (1943). Can the euphoric, analgetic, and physical dependence effects of drugs be separated? IV With reference to physical dependence. Federation Proceedings, 2, 201–203.

Hughes J, Smith TW, Kosterlitz HW, Fothergill LA, Morgan BA, Morris HR. (1975). Identification of two related pentapeptides from the brain with potent opiate agonist activity. *Nature.*, 258(5536):577-80.

Hyman SE, Malenka RC. (2001). Addiction and the brain: the neurobiology of compulsion and its persistence. *Nat Rev Neurosci.,*2(10):695-703.

International Classification of Disease, Injuries, and Causes of Death (ICD-10, 2010).

Isbell H, White WM. (1953). Clinical characteristics of addictions. *Am J Med.,* 14(5):558-65.

Ji D, Sui ZY, Ma YY, Luo F, Cui CL, Han JS. (2004). NMDA receptor in nucleus accumbens is implicated in morphine withdrawal in rats. *Neurochem Res.* 29(11):2113-20.

Kalivas PW, Duffy P, Eberhardt H. (1990). Modulation of A10 dopamine neurons by gamma-aminobutyric acid agonists. *J Pharmacol Exp Ther*., 253:858–866.

Katzung BG, Masters SB, Trevor AJ. (2009). Basic and clinical pharmacology. 11th ed., McGrawHill Companies (Eds.), Singapore.

Kayaalp O. (ed.) (2012). Akılcıl Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji. 13. Baskı, Pelikan Yayıncılık, Ankara.

Kelley AE. (1999). Neural integrative activities of nucleus accumbens subregions in relation to motivation and learning. *Psychobiology.,* 27:198-213.

Koch T, Widera A, Bartzsch K, Schulz S, Brandenburg LO, Wundrack N, Beyer A, Grecksch G, Höllt V. (2005). Receptor endocytosis counteracts the development of opioid tolerance. *Mol Pharmacol,*. 67(1):280-7.

Koob GF, Bloom FE. (1988). Cellular and molecular mechanisms of drug dependence. *Science,*242(4879):715-23.

Koob GF, Le Moal M. (1997). Drug abuse: hedonic homeostatic dysregulation. *Science.,* 3;278(5335):52-8.

Koob GF, Le Moal M. (2006). Opioids. Chapter 4, Neurobiology of Addiction. Pp:121-171. Academic Press, London.

Koob GF, Maldonado R, Stinus L. (1992). Neural substrates of opiate withdrawal. *Trends Neurosci.,* 15(5):186-91.

Koob GF, Sanna PP, Bloom FE. (1998). Neuroscience of addiction. *Neuron.,* 21(3):467-76.

Kruszewska A. (1988). The role of GABA in morphine abstinence in rats. *Drug Alcohol Depend.,* 21(1):37-41.

Leite-Morris KA, Fukudome EY, Kaplan GB. (2002). Opiate-induced motor stimulation is regulated by gamma-aminobutyric acid type B receptors found in the ventral tegmental area in mice. *Neurosci Lett.,* 317(3):119-22.

Lopes AP, da Cunha IC, Steffens SM, Ferraz A, Vargas JC, de Lima TC, Neto JM, Faria MS, Paschoalini MA. (2007). GABAA and GABAB agonist microinjections into medial accumbens shell increase feeding and induce anxiolysis in an animal model of anxiety. *Behav Brain Res.,*184(2):142-9.

Maldonado R, Stinus L, Gold LH, Koob GF. (1992). Role of different brain structures in the expression of the physical morphine withdrawal syndrome. *J Pharmacol Exp Ther.,* 261(2):669-77.

Mann A, Boulanger T, Brandau B, Durant F, Evrard G, Heaulme M, Desaulles E, Wermuth CG. (1991). Synthesis and biochemical evaluation of baclofen analogues locked in the baclofen solid-state conformation. *J Med Chem.*, 34(4):1307-13.

Mansvelder HD, De Rover M, McGehee DS, Brussaard AB. (2003). Cholinergic modulation of dopaminergic reward areas: upstream and downstream targets of nicotine addiction. *Eur J Pharmacol*, 480(1-3):117-23.

Osbourne R, Joel S, Trew D, Slevin M. (1988).M. Analgesic activity of morphine-6-glucuronide. *Lancet*., 331(8589), 828.

Osbourne R, Joel S, Trew D, Slevin M. (1990). Morphine and metabolite behavior after different routes of morphine administration: demonstration of the importance of the active metabolite morphine-6-glucuronide. *Clinical Pharmacology and therapeutics*, 47(1):12-9.

Paxinos G, Watson C. (2007). The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates. 6th Ed. Elsevier Academic Press, San Diego.

Penson RT, Joel SP, Bakhsh K, Clark SJ, Langford RM, Slevin ML. (2000). Randomized placebo-controlled trial of theactivity of the morphine glucuronides. *Clinical Pharmacology and Therapeutic.,* 68(6):667-76.

Pierce RC, Kumaresan V. (2006) The mesolimbic dopamine system: The final common pathway for the reinforcing effect of drugs of abuse? *Neurosci Biobehav Rev*., 30(2):215-38.

Pinto A, Jankowski M, Sesack SR. (2003). Projections from the paraventricular nucleus of the thalamus to the rat prefrontal cortex and nucleus accumbens shell: ultrastructural characteristics and spatial relationships with dopamine afferents. *J Comp Neurol.,* 459(2):142-55.

Przewłocka B, Stala L, Scheel-Krüger J. (1987). Evidence that GABA in the nucleus dorsalis raphé induces stimulation of locomotor activity and eating behavior. *Life Sci.*, 11;25(11):937-45.

Ranaldi R, Poeggel K. (2002). Baclofen decreases methamphetamine self-administration in rats. *Neuroreport*, 13:1107–1110.

Roberts DC, Andrews MM, Vickers GJ. (1996). Baclofen attenuates the reinforcing effects of cocaine in rats. *Neuropsychopharmacology*, 15:417–423.

Robinson TE, Berridge KC. (1993). The neural basis of drug craving: an incentive-sensitization theory of addiction. *Brain Res Rev,* 18(3):247-91.

Sağlam E, Uzbay T, Beyazyürek M. (2003). Madde bağımlılığının psikofarmakolojik özellikleri. Bağımlılık Dergisi, 4: 81-87

Sahraei H, Amiri YA, Haeri-Rohani A, Sepehri H, Salimi SH, Pourmotabbed A, Ghoshooni H, Zahirodin A, Zardooz H. (2005). Different effects of GABAergic receptors located in the ventral tegmental area on the expression of morphine-induced conditioned place preference in rat. *Eur J Pharmacol.,* 524(1-3):95-101.

Saigusa T, Aono Y, Sekino R, Uchida T, Takada K, Oi Y, Koshikawa N, Cools AR. (2012). In vivo neurochemical evidence that newly synthesised GABA activates GABA(B), but not GABA(A), receptors on dopaminergic nerve endings in the nucleus accumbens of freely moving rats. *Neuropharmacology.* 62(2):907-13.

Sigel E, Steinmann ME. (2012). Structure, function, and modulation of GABA(A) receptors.*J Biol Chem.,* 287(48):40224-31.

Smith MA, Greene-Naples JL, Lyle MA, Iordanou JC, Felder JN. (2009). The effects of repeated opioid administration on locomotor activity: I. Opposing actions of mu and kappa receptors. *J Pharmacol Exp Ther*. 330(2):468-75.

Söderpalm AH, Berridge KC. (2000). Food intake after diazepam, morphine or muscimol: microinjections In the nucleus accumbens shell. *Pharmacol Biochem Behav,*. 66(2):429-34.

Stratford TR, Wirtshafter D. (2004). NPY mediates the feeding elicited by muscimol injections into the nucleus accumbens shell. *Neuroreport,* 15(17):2673-6.

Trescot AM, Datta S, Lee M, Hansen H. (2008). Opioid pharmacology. *Pain Physician*., (2 Suppl):S133-53.

Trujillo KA, Akil H. (1991). Opiate tolerance and dependence: recent findings and synthesis. *New Biol.,* 3(10):915-23.

Tyacke RJ, Lingford-Hughes A, Reed LJ, Nutt DJ. (2010). GABAB receptors in addiction and its treatment. *Adv Pharmacol.,* 3589(10)58014-1.

United Nations Office on Drugs and Crime (UNODC). (2004). World Drug Report. United Nation Publications Vienna (AUT).

Uzbay T. Psikofarmakolojinin Temelleri ve Deneysel Teknikler. Çizgi Tıp Yayınevi, Ankara, 2004

Uzbay T. (2007). Madde Kötüye Kullanımı ve Bağımlılığı. İçinde: Psikofarmakoloji. Ed: Yüksel N, 3.Baskı, MN Medikal, Ankara, s.417-437.

Volkow ND, Wang GJ, Fowler JS, Tomasi D, Telang F. (2011). Addiction: beyond dopamine reward circuitry. *Proc Natl Acad SciU S A.*, 108(37):15037-42.

Waldhoer M, Bartlett SE, Whistler JL.(2004). Opioid receptors. *Annu Rev Biochem.,*73:953-90.

Westerink BH, Kwint HF, deVries JB. (1996). The pharmacology of mesolimbic dopamine neurons: a dual-probe microdialysis study in the ventral tegmental area and nucleus accumbens of the rat brain. *J Neurosci*., 16(8):2605-11.

World Health Organisation. (2005). WHO Report on Neuroscience of Psychoactive Substance Use and Dependence Geneva: WHO

Xi ZX, Stein EA. (1999). Baclofen inhibits heroin self-administration behavior and mesolimbic dopamine release. *J Pharmacol Exp Ther*., 90:1369–1374.

Xi ZX, Stein EA. (2002). GABAerjic mechanisms of opiate reinforcement. *Alcohol and Alcoholism*, 37(5):485-94.

Yamada J, Saitow F, Satake S, Kiyohara T, Konishi S. (1999). GABA(B) receptor-mediated presynaptic inhibition of glutamatergic and GABAergic transmission in the basolateral amygdala. *Neuropharmacology*. 38(11):1743-53.

Yamamoto S, Yoshimura M, Shin MC, Wakita M, Nonaka K, Akaike N. (2010). GABA(A) receptor-mediated presynaptic inhibition on glutamatergic transmission. *Brain Res Bull.*84(1):22-30.

Yoon SS, Lee BH, Kim HS, Choi KH, Yun J, Jang EY, Shim I, Kim JA, Kim MR, Yang CH. (2007). Potential roles of GABA receptors in morphine self-administration in rats. *Neurosci Lett.,* 20;428(1):33-7.

Yoon SS, Kim JA, Lee BH, Choi KH, Shim I, Choi SH, Hwang M, Yang CH. (2009). Role for GABA agonists in the nucleus accumbens in regulating morphine self-administration. *Neurosci Lett.,* 462(3):289-93.

Yoshida M, Yokoo H, Tanaka T, Emoto H, Tanaka M. (1994). Opposite changes in the mesolimbic dopamine metabolism in the nerve terminal and cell body sites induced by locally infused baclofen in the rat. *Brain Res*.,636(1):111-4.

Zarrindast MR, Mousa-Ahmadi E. (1999). Effects of GABAergic system on naloxone-induced jumping in morphine-dependent mice. *Eur J Pharmacol.,* 381(2-3):129-33.

Zheleznova NN, Sedelnikova A, Weiss DS.(2009). Function and modulation of delta-containing GABA(A) receptors. *Psychoneuroendocrinology,* 34 Suppl 1:S67-73

# 9.EKLER

## EK 1



T.C.
Marmara Üniversitesi Rektörlüğü
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu
"Araştırıcılar için Deney Hayvanları Kullanımı"

EĞİTİM SERTİFİKASI

BETİLAY TOPKARA

Hayvan Deneyleri Etik Kurullarının Çalışma Usul ve Esaslarına Dair Yönetmelik uyarınca 80 saatlik teorik dersleri ve 40 saatlik uygulamaları başarıyla tamamlamış ve bu sertifikayı almaya hak kazanmıştır. Temmuz 2019

Prof. Dr. Berrak YEĞEN
Marmara Üniversitesi
HADYEK Başkanı

Prof. Dr. Necla PUR
Marmara Üniversitesi
Rektörü

**EK 2**

**MARMARA ÜNİVERSİTESİ HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU**
**PROJE ONAY FORMU**

| | | |
|---|---|---|
| *BAŞVURU BİLGİLERİ* | PROTOKOL KODU | 08.2012.mcr |
| | PROJE ADI | GABA Agonistlerinin Nükleus akümbens shell bölgesine lokal olarak uygulanmasının Naloksonla indüklenmiş morfin yoksunluğu üzerindeki etkisi |
| | SORUMLU ARAŞTIRICI ÜNVANI/ADI | Doç.Dr. Hasan Raci YANANLI |
| | ARAŞTIRMA MERKEZİ | Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı, Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi |
| | DESTEKLEYİCİ | |

| | |
|---|---|
| *KARAR BİLGİLERİ* | Karar No : Tarih: 29.02.2012 |
| | Yukarıda başvuru bilgileri verilen araştırma başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş ve gerçekleştirilmesinde sakınca bulunmadığı için Kurulumuzca onaylanmasına oy birliği ile karar verilmiştir. Onay sonrasında yapılacak her türlü proje değişiklikleri (katılımcılar, başlık vb.) veya protokol değişikliklerinin Etik Kurula bildirilerek proje onayının yenilenmesi gerekmektedir. |
| *ETİK KURUL BİLGİLERİ* | |
| *ÇALIŞMA ESASI* | Deney hayvanları ile yapılacak olan bilimsel araştırma, test, sağlık hizmetleri uygulamaları ve eğitim-öğretim gibi temel etkinliklerde kullanılan yöntem ve materyaller ile ilgili etik standartları gözetmek, etik ilkeler doğrultusunda görüş bildirmek, araştırma önerilerini incelemek ve sertifikası olmayanların deney hayvanı kullanmalarını engellemektir. |

*ÜYELER*

| Unvanı / Adı / Soyadı | Uzmanlık Dalı | Kurumu / EK Üyeliği | Onaylanan Proje ile İlişkisi | Toplantıya katılımı | İmza |
|---|---|---|---|---|---|
| Prof. Dr. Gülsel ŞENER | Farmakoloji | M.Ü Tıp Fakültesi ve Deney Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezi Müdürü | ☐ Var ☐ Yok | ☐ Evet ☐ Hayır | |
| Prof.Dr. İnci ALİCAN | Fizyoloji | Yürütücü Sekreteri | ☐ Var ☐ Yok | ☐ Evet ☐ Hayır | |
| Prof. Dr. Ayşen YARAT | Biyokimya | M.Ü Diş Hekimliği Fakültesi | ☐ Var ☐ Yok | ☐ Evet ☐ Hayır | |
| Doç.Dr. Hasan Raci YANANLI | Farmakoloji | M.Ü Tıp Fakültesi | ☐ Var ☐ Yok | ☐ Evet ☐ Hayır | Yürütücü |
| Doç. Dr. Serap ŞİRVANCI | Histoloji-Embriyoloji | M.Ü Tıp Fakültesi | ☐ Var ☐ Yok | ☐ Evet ☐ Hayır | |
| Öğr. Gör.Dr. Görkan SERT | Tıp Tarihi ve Etik | M.Ü Tıp Fakültesi | ☐ Var ☐ Yok | ☐ Evet ☐ Hayır | |
| Vet. Hek. Dilek ÖZBEYLİ | Veteriner Hekim | M.Ü Tıp Fakültesi ve Deney Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezi Sorumlu Veteriner | ☐ Var ☐ Yok | ☐ Evet ☐ Hayır | |
| Biz. Arif GÜMÜŞ | Biyoloji | İstanbul Hıfzıssıhha Enstitüsü Müdürlüğü, Kurumla ilişkisi olmayan TC vatandaşı üye | ☐ Var ☐ Yok | ☐ Evet ☐ Hayır | |
| Billur AYGÖR | Emekli Memur | Kurumla ilişkisi olmayan TC vatandaşı üye | ☐ Var ☐ Yok | ☐ Evet ☐ Hayır | |

# ÖZGEÇMİŞ

**Kişisel Bilgiler**

| | | | |
|---|---|---|---|
| **Adı** | Betilay | **Soyadı** | Topkara |
| **Doğum Yeri** | Kadıköy | **Doğum Tarihi** | 05.04.1986 |
| **Uyruğu** | T.C. | **TC Kimlik No** | 22628144188 |
| **E-mail** | betilaytopkara@gmail.com | **Tel** | 0535 362 62 44 |

**Eğitim Düzeyi**

| | **Mezun Olduğu Kurumun Adı** | **Mezuniyet Yılı** |
|---|---|---|
| **Yüksek Lisans** | Marmara Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Farmakoloji Ab.D. | 2013 |
| **Lisans** | Yıldız Teknink Üniversitesi, Fen Edebiyat Fak, Kimya Bölümü | 2010 |
| **Lise** | Haydarpaşa Anadolu Lisesi | 2004 |

**İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)**

| | **Görevi** | Kurum | **Süre (Yıl - Yıl)** |
|---|---|---|---|
| . | | | - |

| **Yabancı Dilleri** | **Okuduğunu Anlama*** | **Konuşma*** | **Yazma*** |
|---|---|---|---|
| İngilizce | İyi | İyi | İyi |
| Almanca | Orta | Orta | Orta |

***** Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

| **Yabancı Dil Sınav Notu [#]** | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| KPDS | ÜDS | IELTS | TOEFL IBT | TOEFL PBT | TOEFL CBT | FCE | CAE | CPE |
| | | | | | | | | |

[#]Başarılmış birden fazla sınav varsa, tüm sonuçlar yazılmalıdır

[#]KPDS: Kamu Personeli Yabancı Dil Sınavı; ÜDS: Üniversitelerarası Kurul Yabancı Dil Sınavı; IELTS: International English Language Testing System; TOEFL IBT: Test of English as a Foreign Language-Internet-Based Test TOEFL PBT: Test of English as a Foreign Language-Paper-Based Test; TOEFL CBT: Test of English as a Foreign Language-Computer-Based Test; FCE: First Certificate in English; CAE: Certificate in Advanced English; CPE: Certificate of Proficiency in English

| | **Sayısal** | **Eşit Ağırlık** | **Sözel** |
|---|---|---|---|
| **ALES Puanı** | | | |
| **(Diğer) Puanı** | | | |

**Bilgisayar Bilgisi**

| **Program** | **Kullanma becerisi** |
|---|---|
| Microsoft Office | İyi |

*****Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

Uluslararası ve Ulusal Yayınları/Bildirileri/Sertifikaları/Ödülleri/Diğer

Deney Hayvanları Etik Kurul Sertifikası- Marmara Üniversitesi