



**Tıp Fakültesi**

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

**SIÇANLARDA MORFİN YOKSUNLUĞU MODELİNDE  
BEYİN RENİN ANJİYOTENSİN SİSTEMİNİN ROLÜ**

**Dr. BERNA ÖZEN  
TIPTA UZMANLIK TEZİ**

**İSTANBUL 2024**





**Tıp Fakültesi**

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

**SIÇANLARDA MORFİN YOKSUNLUĞU MODELİNDE  
BEYİN RENİN ANJİYOTENSİN SİSTEMİNİN ROLÜ**

**Dr. BERNA ÖZEN  
TIPTA UZMANLIK TEZİ**

**Danışman: Prof. Dr. HASAN RACİ YANANLI**

**İSTANBUL 2024**

## ÖNSÖZ

Uzmanlık eğitimim süresince, engin tecrübeleri ve bilgilerinden yararlandığım, üzerimde çok büyük emekleri olan, ihtiyacım olan her zaman ve her konuda yardım eden, hoşgörülü ve pozitif yönünü her zaman koruyan başta danışman hocam çok değerli Prof. Dr. Hasan Raci YANANLI olmak üzere, anabilim dalımızda yer alan sayın hocalarım Prof. Dr. Ahmet AKICI, Prof. Dr. Mehmet Zafer GÖREN, Prof. Dr. Rezzan GÜLHAN, Prof. Dr. Berna TERZİOĞLU BEBİTOĞLU ve Prof. Dr. Medine GÜLÇEBİ İDRİZ OĞLU'na,

Yine üzerimde büyük emekleri olan, beni her daim destekleyen, ablalık yapan ve esasen araştırma merakını bana aşılayan hocam Dr. Öğr. Üyesi Özlem KİRAZLI'ya,

Bana her daim yol gösteren ve ilgilenen Dr. Öğr. Üyesi Tuğba KARAMAHMUTOĞLU, Dr. Öğr. Üyesi Yekta ÇULPAN, Uzm. Dr. Nurdan TEKİN, Uzm. Dr. Zehranur TURGAN AŞIK, Uzm. Dr. Nusret UYSAL, Uzm. Dr. Caner VIZDIKLAR ve Uzm. Dr. Aylin TOPLU'ya ve bölümümüzde beraber çalıştığımız değerli çalışma arkadaşlarıma,

Her sıkıştığım da yardımına koşan, birlikte çok güzel hatıralar biriktirdiğimiz gelecekteki meslektaşlarım olan Ceylin YILMAZ, Tarık Emre GÖKIRMAK, İdil DOKUZ'a ve ismini sayamadığım fakültede birlikte çalıştığımız birçok lisans veya yüksek lisans öğrencisi ve araştırma görevlisi arkadaşşıma,

En büyük şansım, her zaman desteğini ve sevgisini hissettiğim biricik annem Sevil ÖZEN, her koşulda yanımda olan canım babam Recep ÖZEN ve hayatımı her anlamda kolaylaştıran fedakar canım ablam Bihter ÖZEN ÖZSOY'a

çok teşekkür ediyorum.

## BİLGİLENDİRME

Bu tez çalışması Marmara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından TTU-2024-11279 numaralı proje ile desteklenmiştir.

Dr. Berna ÖZEN

Kasım, 2024

## ÖZET

### SIÇANLARDA MORFİN YOKSUNLUĞU MODELİNDE BEYİN RENİN ANJİYOTENSİN SİSTEMİNİN ROLÜ

Bağımlılık yapıcı durumların ortak noktası beyinde prefrontal korteks, ventral tegmental alan ve *nucleus accumbens*'in oluşturduğu ödül mekanizmasının aşırı uyarılarak dopamin salınımının artması, dolayısıyla beynin yapı ve işlevinde değişikliklerin oluşmasıdır. Beyin renin anjiyotensin sisteminin (BRAS) bazı nörolojik hastalıklarda nöroprotektif etki gösterdiği bilinmektedir ancak morfin yoksunluğunda BRAS'ın araştırıldığı çalışmalar sınırlıdır ve olası etkileşim mekanizmalarını ortaya çıkarmak açısından yetersizdir. Bu çalışmanın amacı, morfin bağımlısı sıçanlarda, intraperitoneal (i.p.) naloksonla indüklenmiş yoksunluk sendromu öncesi intraserebroventriküler (ICV) Anjiyotensin II (ANJ II), anjiyotensin dönüştürücü enzim inhibitörü kaptopril (KAP) ve anjiyotensin reseptör tip 1 antagonisti telmisartan (TLM) enjeksiyonu yapılarak BRAS'ın yoksunluk sendromu bulgularına etkilerini incelemektir. Stereotaksik cerrahi ile ICV rehber kanül yerleştirilen Wistar erkek sıçanların cilt altına morfin peletleri (sham kontrol grubuna morfinsiz dolgu peleti) yerleştirilmiştir. Hayvanlar gruplara ayrılarak son morfin peleti yerleştirildikten 48 saat sonra nalokson ile yoksunluk sendromu indüklenmeden 5 dk önce ANJ II 1 nM, 15 dk önce TLM 33 nM, 100 nM veya 300 nM, 30 dk önce KAP 300 µg çözeltisi ICV yolla enjekte edilmiştir. Kronik tedavi grubuna (TLM Kr) ise 33 nM TLM 5 gün boyunca verilmiştir. Nalokson uygulamasını takiben sıçrama sayısı tüm tedavi gruplarında yoksun kontrol (YK) grubuna göre anlamlı şekilde azalmıştır. Bu azalma TLM Kr 33 nM ve TLM 33 nM grubunda daha da belirgindir (p=0,0006). Islak köpek silkinmesi sayısı ise ANJ II ve KAP gruplarında YK grubuna göre anlamlı şekilde azalmıştır (p=0,03). Yoksunluk sırasındaki lokomotor aktivite davranışlarının bazale göre değişimine bakıldığında kat edilen mesafede değişim en fazla TLM 33 nM grubunda izlenmiştir. Bu bulgular, ANJ II ve AT1 reseptörlerinin yoksunlukta etkin rol oynadığını, fakat tek sorumlu mekanizmanın bu olmadığı ve BRAS'ın diğer reseptör ve peptid mekanizmalarının dahil edildiği başka çalışmalara ihtiyaç duyulduğunu göstermektedir.

**ANAHTAR SÖZCÜKLER:** morfin, opiyat bağımlılığı, renin-anjiyotensin sistem, telmisartan, kaptopril

## **ABSTRACT**

### **EVALUATION OF THE ROLE OF BRAIN RENIN ANGIOTENSIN SYSTEM IN THE MORPHINE WITHDRAWAL MODEL IN RATS**

The common feature of all addictive conditions is the overstimulation of the reward mechanism in the brain, generated by the prefrontal cortex, ventral tegmental area and *nucleus accumbens*, leading to an increase in dopamine release and consequently causing changes in the structure and function of the brain. The renin-angiotensin system (RAS) in the brain is known to exert neuroprotective effects in some neurological disorders. Studies investigating the role of brain RAS in morphine withdrawal are limited and insufficient to reveal potential interaction mechanisms. This study aims to examine the effects of RAS on withdrawal symptoms in a morphine dependence model in rats by administering Angiotensin II (ANG II), captopril (CAP), and telmisartan (TLM) injections before to systemic naloxone-induced withdrawal syndrome. During stereotactic surgery intracerebroventricular (ICV) guide cannulas were implanted in the male Wistar rats. One and two morphine pellets (filler pellets for the sham group) were subcutaneously inserted at 48 hours intervals. At the end of the experiment, 5 minutes before naloxone-induced withdrawal syndrome, ANG II (1 nM), 15 minutes prior TLM at 33 nM, 100 nM, or 300 nM doses, and 30 minutes earlier CAP (300 µg) solution were administered via ICV injection. One group (TLM Kr) received 33 nM TLM for 5 days. Rats were observed for withdrawal symptoms for 15 minutes in a locomotor activity cage. The number of jumps decreased in all treatment groups compared to the withdrawal control (WK) group, and this decrease was more pronounced in the TLM Kr 33 nM and TLM 33 nM groups ( $p = 0.0006$ ). The number of wet dog shakes was significantly lower in the ANG II and CAP groups compared to the WK group ( $p = 0.03$ ). When examining the percentage change during withdrawal compared to the baseline, the greatest change in the distance traveled was observed in the TLM 33 nM group. These findings suggest that ANG II and AT1 receptors played a significant role during withdrawal, but this is not the only mechanism, and studies involving other RAS receptor and peptide mechanisms are needed.

**KEYWORDS:** morphine, opiate addiction, renin-angiotensin system, telmisartan, captopril

## İÇİNDEKİLER

### Sayfa

ÖNSÖZ.....	i
ÖZET.....	ii
ABSTRACT.....	iii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	vii
TABLO LİSTESİ.....	ix
ŞEKİL LİSTESİ.....	x
<b>1. GİRİŞ ve AMAÇ.....</b>	<b>1</b>
1.1. Giriş.....	1
1.2. Amaç.....	2
<b>2. GENEL BİLGİLER.....</b>	<b>3</b>
<b>2.1. Opioidler.....</b>	<b>3</b>
<b>2.1.1. Opioidlerin tanımı ve keşfi.....</b>	<b>3</b>
2.1.2. Endojen opioid peptitler.....	3
2.1.3. Opioid reseptörler.....	4
2.1.4. Opioid reseptörlerin etki mekanizması.....	7
2.1.5. Opioid reseptörlerin fizyolojik etkileri.....	9
2.1.6. Morfin.....	9
2.1.7. Opioidlere tolerans geliştirilmesi.....	11
2.1.8. Opioid kullanım bozukluğu ve bağımlılık.....	13
2.1.9. Opioid bağımlılığında yoksunluk gelişmesi.....	14
2.1.9.1. Sıçanda morfin yoksunluğu modeli oluşturulması.....	16
<b>2.2. Renin Anjiyotensin Sistemi.....</b>	<b>16</b>
2.2.1. Renin anjiyotensin sisteminde yer alan peptitler ve reseptörler.....	16
2.2.2. Renin anjiyotensin sisteminin fizyolojik etkileri.....	20
2.2.3. Beyinde bulunan renin anjiyotensin sistemi.....	21
2.2.4. Beyinde bulunan renin anjiyotensin sistemi ve dopamin ilişkisi.....	23
2.2.5. Beyinde bulunan renin anjiyotensin sisteminin kognitif etkileri.....	24
2.2.6. Beyinde bulunan renin anjiyotensin sisteminin opioidler ile ilişkisi.....	25

2.2.7. Beyinde bulunan renin anjiyotensin sisteminin bağımlılık ile ilişkisi.....	26
2.2.8. Morfin yoksunluğu sendromunda renin anjiyotensin sistemi.....	28
2.2.9. Anjiyotensin dönüştürücü enzim inhibitörlerinden kaptopril.....	28
2.2.10. Anjiyotensin reseptör blokörlerinden telmisartan.....	28
<b>3. GEREÇ ve YÖNTEM.....</b>	<b>30</b>
<b>3.1. Deney Hayvanları.....</b>	<b>30</b>
<b>3.2. Deneyde Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Cihazlar.....</b>	<b>30</b>
<b>3.3. Deney Gruplarının Oluşturulması ve Deney Protokolü.....</b>	<b>32</b>
<b>3.4. Stereotaksik Cerrahi.....</b>	<b>36</b>
<b>3.5. Lokomotor Aktivite Kafesi Testi.....</b>	<b>38</b>
<b>3.6. Morfin Bağımlılığı Oluşturma.....</b>	<b>39</b>
<b>3.7. Çözelti Hazırlama ve Mikroenjeksiyon.....</b>	<b>40</b>
<b>3.8. Yoksunluk Sendromu Oluşturma .....</b>	<b>41</b>
<b>3.9. Sakrifikasyon ve Beyin Bölgelerinin Diseksiyonu.....</b>	<b>42</b>
<b>3.10. Veri Analizi.....</b>	<b>43</b>
<b>4. BULGULAR.....</b>	<b>44</b>
<b>4.1. Telmisartan, Kaptopril ve Anjiyotensin II'nin Yoksunluk Bulgularına Etkisi.....</b>	<b>44</b>
4.1.1. Telmisartan, kaptopril ve anjiyotensin II'nin yoksunluk sendromunda görülen sıçrama sayısı üzerine etkisi.....	44
4.1.2. Telmisartan, kaptopril ve anjiyotensin II'nin yoksunluk sendromunda görülen ıslak köpek silkinmesi üzerine etkisi.....	45
4.1.3. Telmisartan, kaptopril ve anjiyotensin II'nin naloksonla indüklenen morfin yoksunluk sendromunda görülen ağırlık kaybı üzerine etkisi.....	46
<b>4.2. Telmisartan, Kaptopril ve Anjiyotensin II'nin Naloksonla İndüklenen Morfin Yoksunluk Sendromunda Lokomotor Aktivite Üzerine Etkisi.....</b>	<b>47</b>
4.2.1. Telmisartan, kaptopril ve anjiyotensin II'nin naloksonla indüklenen morfin yoksunluk sendromunda stereotipik davranışların yüzde değişimi üzerine etkisi.....	48

4.2.2. Telmisartan, kaptopril ve anjiyotensin II'nin naloksonla indüklenen morfin yoksunluk sendromunda ambulatuvar hareketlerin yüzde değişimi üzerine etkisi.....	49
4.2.3. Telmisartan, kaptopril ve anjiyotensin II'nin naloksonla indüklenen morfin yoksunluk sendromunda kat edilen mesafenin yüzde değişimi üzerine etkisi.....	50
4.2.4. Telmisartan, kaptopril ve anjiyotensin II'nin naloksonla indüklenen morfin yoksunluk sendromunda vertikal hareketlerin yüzde değişimi üzerine etkisi.....	52
4.2.5. Telmisartan, kaptopril ve anjiyotensin II'nin naloksonla indüklenen morfin yoksunluk sendromunda hareketsiz kalma süresinin yüzde değişimi üzerine etkisi.....	53
<b>4.3. Bazal ve Yoksunluk Sendromu Oluşturulmuş Sıçanlarda Telmisartan, Kaptopril ve Anjiyotensin II'nin Stereotipik Hareketlere etkisi.....</b>	<b>55</b>
4.3.1. Bazal stereotipik hareketler.....	55
4.3.2. Yoksunluk sendromu oluşturulmuş sıçanlarda telmisartan, kaptopril ve anjiyotensin II'nin stereotipik hareketlere etkisi .....	56
<b>5. TARTIŞMA ve SONUÇ.....</b>	<b>58</b>
<b>6. KAYNAKLAR.....</b>	<b>67</b>
<b>7. EKLER.....</b>	<b>83</b>
7.1. Etik Kurul Onayı.....	83

## SİMGELER VE KISALTMALAR

<b>%:</b>	Yüzde
<b>δ:</b>	Delta reseptörü
<b>±:</b>	Artı-Eksi
<b>κ:</b>	Kappa reseptörü
<b>μ:</b>	Mu reseptörü
<b>μl:</b>	Mikrolitre
<b>μM:</b>	Mikromolar
<b>ANJ II:</b>	Anjiyotensin II
<b>Ap-A:</b>	Aminopeptidaz A
<b>Ap-N:</b>	Aminopeptidaz N
<b>ARB:</b>	Anjiyotensin reseptör blokörü
<b>AT1R:</b>	Anjiyotensin tip 1 reseptörü
<b>AT2R:</b>	Anjiyotensin tip 2 reseptörü
<b>BK:</b>	Bağımlı kontrol grup
<b>cAMP:</b>	Siklik adenozin monofosfat
<b>DA:</b>	Dopamin
<b>DAG:</b>	Diçil gliserol
<b>DC:</b>	Dekarboksilaz
<b>DOPAC:</b>	3,4-dihidroksifenil asetik asit
<b>DSM</b>	Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders
<b>g:</b>	gram
<b>GABA:</b>	Gama aminobütirik asit
<b>GFR:</b>	Glomerül filtrasyon hızı
<b>GİS:</b>	Gastrointestinal sistem
<b>HP:</b>	Hipokampüs
<b>HVA:</b>	Homovanilik asit
<b>i.p.:</b>	İntraperitoneal
<b>ICV:</b>	İntraserebroventriküler
<b>IP3:</b>	İnositol trifosfat
<b>KAP:</b>	Kaptopril

<b>KBB:</b>	Kan beyin bariyeri
<b>LC:</b>	Locus coeruleus
<b>MAP kinaz:</b>	Mitojen-aktive kinazlar
<b>MasR:</b>	Mas reseptörü
<b>mg:</b>	Miligram
<b>ml:</b>	Mililitre
<b>MrgD:</b>	Mas ile ilişkili G protein bağlı reseptör
<b>NA:</b>	Noradrenalin
<b>Nac:</b>	Nucleus accumbens
<b>NEP:</b>	Nötral endopeptidaz
<b>NMDA</b>	N-metil-D-aspartat
<b>NTS</b>	Nucleus tractus solitarius
<b>°C:</b>	Santigrat derece
<b>p:</b>	İstatistiksel anlamlılık değeri
<b>PFC:</b>	Prefrontal korteks
<b>PP2a:</b>	Serin-treonin fosfataz
<b>PPAR<math>\gamma</math>:</b>	Peroksizom proliferatör aktive reseptör $\gamma$
<b>PVN:</b>	Paraventriküler nükleus
<b>RAS:</b>	Renin anjiyotensin sistem
<b>ROS:</b>	Reaktif oksijen türleri
<b>sc:</b>	subkutan
<b>SF:</b>	Serum fizyolojik
<b>SK:</b>	Sham kontrol grup
<b>SSS:</b>	Santral sinir sistemi
<b>TLM Kr:</b>	Telmisartan kronik grup
<b>TLM:</b>	Telmisartan
<b>TM:</b>	Transmembran
<b>VMA:</b>	Vanilmandelik asit
<b>VTA:</b>	Ventral tegmental alan
<b>YK:</b>	Yoksun kontrol grup

## TABLO LİSTESİ

<b>Tablo 2.1.</b> Opioid reseptörlerin özellikleri ve fonksiyonları.....	5
<b>Tablo 2.2.</b> Renin anjiyotensin sisteminde yer alan peptitler.....	18
<b>Tablo 3.1.</b> Kullanılan cihazlar ve marka-model bilgileri.....	31
<b>Tablo 3.2.</b> Kullanılan malzemeler ve marka-model-kod bilgileri.....	32
<b>Tablo 3.3.</b> Deney grupları ve gruplarda yer alan hayvan sayıları.....	33
<b>Tablo 3.4.</b> Deney grupları ve deney protokolü (1.-5. Grup).....	35
<b>Tablo 3.5.</b> Deney grupları ve deney protokolü (6.-9. Grup).....	36
<b>Tablo 3.6.</b> Yoksunluk bulguları.....	42

## ŞEKİL LİSTESİ

- Şekil 2.1.** Opioid reseptörlerinin yapısı.....8
- Şekil 2.2.** Mezolimbik dopaminerjik sisteme morfin uygulamasının etkisi.....14
- Şekil 2.3.** Renin anjiyotensin sistemde yer alan peptitler ve reseptörler.....17
- Şekil 2.4.** Beyinde bulunan renin anjiyotensin sistemi peptitleri.....22
- Şekil 3.1.** Stereotaksi cihazı (solda), stereotaksi cihazı içerisine sabitleme (sağda).....38
- Şekil 3.2.** Soldan sağa sabitleme vidaları, rehber kanül, *dummy* kanül, internal kanül....38
- Şekil 3.3.** Lokomotor aktivite kafesi.....39
- Şekil 4.1.** YK (n=6), TLM 33 nM (n=6), TLM 100 nM (n=8), TLM 300 nM (n=8), ANJ II (n=7), KAP (n=7) ve TLM Kr 33 nM (n=7) gruplarındaki sıçanlara *unilateral* ICV enjeksiyon ile uygulanan tedavilerin morfin yoksunluk sendromunda görülen sıçrama sayısı üzerine etkisi.....45
- Şekil 4.2.** YK (n=6), TLM 33 nM (n=6), TLM 100 nM (n=8), TLM 300 nM (n=8), ANJ II (n=7), KAP (n=7) ve TLM Kr 33 nM (n=7) gruplarındaki sıçanlara *unilateral* ICV enjeksiyon ile uygulanan tedavilerin morfin yoksunluk sendromunda görülen ıslak köpek silkinmesi sayısı üzerine etkisi.....46
- Şekil 4.3.** YK (n=6), TLM 33 nM (n=6), TLM 100 nM (n=8), TLM 300 nM (n=8), ANJ II (n=7), KAP (n=7) ve TLM Kr 33 nM (n=7) gruplarındaki sıçanlara *unilateral* ICV

enjeksiyon ile uygulanan tedavilerin morfin yoksunluk sendromunda görülen ağırlık kaybı yüzde değişimi üzerine etkisi.....47

**Şekil 4.4.** SK (n=6), BK (n=6), YK (n=6), TLM 33 nM (n=6), TLM 100 nM (n=8), TLM 300 nM (n=8), ANJ II (n=7), KAP (n=7) ve TLM Kr 33 nM (n=7) gruplarındaki sıçanlara *unilateral* ICV enjeksiyon ile uygulanan tedavilerin morfin yoksunluk sendromunda görülen stereotipik davranış sayısı üzerine yüzde değişim olarak etkisi.....49

**Şekil 4.5.** SK (n=6), BK (n=6), YK (n=6), TLM 33 nM (n=6), TLM 100 nM (n=8), TLM 300 nM (n=8), ANJ II (n=7), KAP (n=7) ve TLM Kr 33 nM (n=7) gruplarındaki sıçanlara *unilateral* ICV enjeksiyon ile uygulanan tedavilerin morfin yoksunluk sendromunda görülen ambulatuvar hareket sayısı üzerine yüzde değişim olarak etkisi.....50

**Şekil 4.6.** SK (n=6), BK (n=6), YK (n=6), TLM 33 nM (n=6), TLM 100 nM (n=8), TLM 300 nM (n=8), ANJ II (n=7), KAP (n=7) ve TLM Kr 33 nM (n=7) gruplarındaki sıçanlara *unilateral* ICV enjeksiyon ile uygulanan tedavilerin morfin yoksunluk sendromundaki kat edilen mesafe (cm) üzerine yüzde değişim olarak etkisi.....51

**Şekil 4.7.** SK (n=6), BK (n=6), YK (n=6), TLM 33 nM (n=6), TLM 100 nM (n=8), TLM 300 nM (n=8), ANJ II (n=7), KAP (n=7) ve TLM Kr 33 nM (n=7) gruplarındaki sıçanlara *unilateral* ICV enjeksiyon ile uygulanan tedavilerin morfin yoksunluk sendromundaki vertikal hareket sayısı üzerine yüzde değişim olarak etkisi.....53

**Şekil 4.8.** SK (n=6), BK (n=6), YK (n=6), TLM 33 nM (n=6), TLM 100 nM (n=8), TLM 300 nM (n=8), ANJ II (n=7), KAP (n=7) ve TLM Kr 33 nM (n=7) gruplarındaki sıçanlara *unilateral* ICV enjeksiyon ile uygulanan tedavilerin morfin yoksunluk sendromundaki hareketsiz kalma süresi üzerine yüzde değişim olarak etkisi.....54

**Şekil 4.9.** SK (n=6), BK (n=6), YK (n=6), TLM 33 nM (n=6), TLM 100 nM (n=8), TLM 300 nM (n=8), ANJ II (n=7), KAP (n=7) ve TLM Kr 33 nM (n=7) gruplarındaki sıçanların 15 dk boyunca bazal lokomotor aktivite testi sırasındaki stereotipik hareketleri.....55

**Şekil 4.10.** SK (n=6), BK (n=6), YK (n=6), TLM 33 nM (n=6), TLM 100 nM (n=8), TLM 300 nM (n=8), ANJ II (n=7), KAP (n=7) ve TLM Kr 33 nM (n=7) gruplarındaki sıçanlara *unilateral* ICV enjeksiyon ile uygulanan tedavilerin morfin yoksunluk sendromundaki stereotipik hareket sayısı üzerine etkisi.....57



## 1. GİRİŞ ve AMAÇ

### 1.1. Giriş

Bağımlılık; bireyin sağlığına olumsuz etkilerinin yanında, toplum kaynaklarının önlenebilir nedenlerden dolayı harcanması, suç oranının artması ve ekonomik bozulma yaratması gibi sonuçlardan dolayı toplumsal olumsuz etkilere de sahip bir hastalıktır (1). Bağımlılık yapıcı tüm durumların ortak noktası beyinde prefrontal korteks (PFC), ventral tegmental alan (VTA) ve *nucleus accumbens*'in (NAc) oluşturduğu ödül mekanizmasının normal sınırların üzerinde uyarılması ve buna bağlı olarak talamustan kortekse kadar beyin çok sayıda bölgesinde yapısal ve işlevsel değişikliklere neden olmasıdır (2). Bağımlılık ve yoksunluk sendromları mekanizmalarının tam olarak açıklanamamasının bir sonucu olarak uygulanan mevcut tedavilerin çoğu yetersiz kalmakta ve bağımlılık yapıcı etkenin hasta tarafından tekrar kullanılmasına neden olmaktadır (3). Morfin bağımlılığı ve yoksunluğunda ortaya çıkan değişikliklerden sorumlu olan mekanizmada dopamin (DA) en önemli nörotransmitter olarak gösterilmektedir (4). DA dışında başta noradrenalin (NA) ve glutamat olmak üzere, serotonin, GABA, adenozin, nitrik oksit, oreksin gibi nörotransmitterler veya nöromodulatorlerin de görev aldığı bilinmektedir (5-7). Bağımlılık ve yoksunluk patofizyolojisinin multifaktöriyel olması ve tam olarak aydınlatılamaması nedeniyle, gerek oluşmasına yol açan faktörler gerekse tedavisi noktasında yeni çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Renin anjiyotensin sistemi (RAS), nörovasküler ve kardiyopulmoner fizyolojide önemli bir rol oynayan çeşitli enzimler ile inaktif ve aktif peptitlerden oluşan bir peptit hormon sistemidir (8). RAS'da yer alan peptit ve enzimleri hedefleyen antihipertansif ilaçlar klinikte sıklıkla kullanılmaktadır. Bu ilaçlardan santral sinir sistemine geçen ajanlar arasında kaptopril anjiyotensin dönüştürücü enzim inhibitörleri (ADE) grubunun prototipi, telmisartan ise anjiyotensin reseptör blokörleri (ARB) grubunun santral sinir sistemine en çok geçen üyesidir (9). Beyinde bulunan RAS, sistemik RAS'tan bağımsız olarak çalışmakta ve RAS'ı etkileyen ilaçların bazı hastalık modellerinde (Alzheimer hastalığı, Parkinson hastalığı, multipl skleroz gibi nörodejeneratif hastalıklar veya inme gibi serebrovasküler durumlar) yapılan *in-vitro*, *in-vivo* çalışmalarda ve hastalar ile

yapılan prospektif klinik çalışma serilerinde nöroprotektif etki gösterdiği bilinmektedir (10-19). RAS ile kolinerjik, dopaminerjik ve adrenerjik sistemler gibi diğer sistemler arasında bir çapraz etkileşim olduğu gösterilmiştir (14, 20). Morfin yoksunluğu sendromunda beyin RAS'ın araştırıldığı çalışmalar sınırlı sayıda ve olası etkileşim mekanizmalarını ortaya çıkarmak açısından yetersizdir. VTA'ya yapılan ANJ II ve ADE inhibitörü kaptopril enjeksiyonunun sıçanlarda morfinin kendi kendine uygulanması modelinde etkilerinin incelendiği bir çalışmada, ANJ II grubunda, aktif kola basma sayısı morfin grubuna göre anlamlı olarak düşük bulunmuştur (21). NAc'e kaptopril uygulanan başka bir çalışmada ise aktif kola basma sayısı morfin grubundan anlamlı olarak düşük bulunmuştur (22). İntraserebroventriküler (ICV) verilen kaptopril ve ANJ II'nin morfinle indüklenmiş koşullu yer tercihi ve morfin yoksunluğu modelinde etkilerinin incelendiği bir diğer çalışmada ise ICV kaptopril uygulamasının naloksonla indüklenmiş yoksunluk semptomlarını azalttığı ve ANJ II'nin yoksunluk semptomlarını artırdığı bildirilmiştir (23). İki şişe serbest tercihli alkol bağımlılık modelinde *Sardinian alcohol preferring* sıçanlarla yapılan bir çalışmada santral telmisartan uygulamasının sıçanların alkol tüketimini azalttığı gösterilmiştir (24). ARB grubundan bir ajanın morfin yoksunluğu modelinde denendiği sadece bir çalışma mevcuttur. Bu çalışmada, valsartanın sıçanlara sistemik yoldan kronik uygulanmasının morfin toleransını ve diyare, defekasyon gibi yoksunluk bulgularını azalttığı bildirilmiştir (25).

## **1.2. Amaç**

Bu tez çalışmasında, morfin bağımlılığı ve sonrasında naloksonla indüklenmiş yoksunluk sendromu oluşturulan sıçanlarda beyin RAS sisteminin ICV mikroenjeksiyonlar ile modüle edilmesi; bu sayede beyin RAS sisteminin bağımlılık ve yoksunluk sendromu sürecindeki rolünün davranış ve lokomotor aktivite testleri aracılığıyla ortaya konması amaçlanmıştır.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Opioidler

#### 2.1.1. Opioidlerin tanımı ve keşfi

Opioidler, akut ağrı tedavisinde temel basamakları oluştururken, son yıllarda opioidlerin kronik ağrı tedavisindeki etkinliği, güvenliği, bağımlılığa yol açması, suistimal edilmesi ve belki de en önemlisi yüksek dozda kullanıldığında ölüme neden olması gibi nedenlerden ötürü sorgulanmaya başlamıştır (26).

*Opium* (afyon) kelimesinin Yunan kökenli olan *opos* (meyve suyu) kelimesinden türetildiği düşünülmektedir (27). Morfinin kaynağı olan opium, *Papaver somniferum* ve *P album* (haşhaş) bitkisinden elde edilmiştir. Haşhaş tohumu kabuğu kesildikten sonra beyaz bir madde salgılar ve daha sonra kahverengi bir sakıza dönüşerek ham afyon meydana gelir. 1800’lü yılların başında Frederik Sertürner tarafından çok sayıda alkaloid içeren bu madde ayrıştırılıp morfin, kodein, tebain ve papaverin gibi doğal olarak oluşan alkaloidler keşfedilmiştir (28). Afyon alkaloidleri, başlıcası yaklaşık %10'luk bir konsantrasyonda bulunan morfin olmak üzere kodein, tebain ve papaverin içerir (29).

Opium alkaloidleri, bitkinin kurutulmuş kapsüllerinden doğal olarak elde edildiği gibi laboratuvar koşullarında da üretilmektedir (30). Oksikodon, hidromorfin, hidrokodon ve buprenorfin doğal afyon alkaloidlerinden üretilen yarı sentetik bileşikler olup; fentanil, metadon ve tramadol tamamen laboratuvar koşullarında sentetik şekilde üretilmektedir (31). Opioid tanımı, opioid reseptörleri ile çalışan bütün bileşikleri ifade etmek için kullanılır. Opiyat kelimesi ise morfin, kodein, tebain ve papaverin gibi doğal olarak oluşan alkaloidleri tanımlar (28).

#### 2.1.2. Endojen opioid peptitler

1970’li yıllarda morfinin beyin bölgelerine bağlandığı yerlerin 'morfin reseptörleri' olarak adlandırılmasını takiben ‘endojen morfinler’ veya ‘endorfinler’in varlığı ortaya konmuştur (32). Beyinde bulunan ve opioid reseptörler aracılığıyla etki gösteren endojen

opioid peptitler, temel olarak enkefalin, endorfin ve dinorfin ailesinden oluşmaktadır (26, 33). Ağrılı uyaranlar, ağrıyla veya ağrı beklentisiyle ilişkili stres altında endojen opioid peptitlerinin salınımını uyandırabilir ve ağrı algısını azaltırlar. Endojen opioid peptitler üç öncü proteinden türetilmektedir: prepro-opiomelanokortin (POMC), preproenkefalin (proenkefalin A) ve preprodinorfin (proenkefalin B). POMC; met-enkefalin dizisi,  $\beta$ -endorfin ve adrenokortikotropik hormon (ACTH),  $\beta$  lipotropin ve melanosit uyarıcı hormon (MSH) dahil olmak üzere birkaç nonopioid peptid içerir (33). Preproenkefalin, altı kopya met-enkefalin ve bir kopya lö-enkefalin içerir. Preprodinorfin, lö-enkefalin dizisini içeren aktif opioid peptidleri üretir. Bunlar dinorfin A, dinorfin B ve  $\alpha$  ve  $\beta$  neoendorfinlerdir (28).

### **2.1.3. Opioid reseptörler**

Opioid reseptör alt tipleri  $\mu$  (mu),  $\delta$  (delta),  $\kappa$  (kappa) ve nosisepsiyon/opioid-reseptör-benzeri alt tip 1 (ORL-1)'den oluşmaktadır (34). Opioid reseptörleri G proteini kenetli reseptör yapısındadır (35, 36), yapısal olarak çok benzerdirler (37). Morfinle indüklenirler, naloksonla antagonize edilir ve benzer analjezik etkiye sahiptirler (38). Opioid ilaçlar reseptörlere bağlanırken tam agonist, kısmi agonist ve antagonist özellikler gösterebilirler. Morfin, majör analjezik opioid reseptör olan  $\mu$  (mu) opioid reseptörünün tam agonistidir (28). Morfinin azotu üzerindeki bir alil grubunun değiştirilmesi ve bir hidroksil grubunun eklenmesiyle, güçlü bir  $\mu$ -reseptör antagonisti olan nalokson elde edilmiştir (39). Nalokson, özellikle yüksek dozlarda verildiğinde, opioid bağımlısı bireylerde yoksunluk sendromuna ve ağrı hastalarında analjezinin tamamen kaybolmasına neden olan bir opioid reseptör antagonistidir (40, 41). Lö- ve met-enkefalin ise,  $\mu$ -opioid reseptörüne göre  $\delta$  (delta) için daha yüksek afiniteye sahiptir (28) (Tablo 2.1).

**Tablo 2.1.** Opioid reseptörlerin özellikleri ve fonksiyonları (Katzung, 2018'den ve Demirkapu Jafarova ve Yananlı, 2021'den uyarlanarak düzenlenmiştir) (28, 30).

<b>Opioid Reseptörleri</b>	<b>μ reseptör</b>	<b>δ reseptör</b>	<b>κ reseptör</b>	<b>N/OFQ reseptör</b>
<b>Beyinde yer aldığı bölümler</b>	Talamus, kaudat putamen, neokorteks, nucleus accumbens (NAc), amigdala, interpedinküler kompleks, inferior ve superior colliculi	Olfaktör bulbus, neokorteks, kaudat putamen, NAc, amigdala	Serebral korteks, NAc, claustrum, hipotalamus	Serebral korteks, anterior olfaktör nükleus, lateral septum, ventral forebrain, hipokampus, hipotalamus, amigdala, substantia nigra, ventral tegmental alan (VTA), locus coeruleus, beyin sapı nükleusları
<b>Spinal kordda buldukları bölgeler</b>	Spinal kordun dorsal boynuzunun yüzeysel katmanları			Dorsal boynuz
<b>SSS dışında buldukları bölgeler</b>	Deri, immün hücreler, gebe uterusu, Gastrointestinal sistem (GİS), kohlea	Deri, immün hücreler, gebe uterusu, GİS, kohlea	Deri, immün hücreler, gebe uterusu, GİS, kohlea	
<b>G-protein türleri</b>	Primer: Gi/Go Sekonder: Gq/G11	Gi/Go	Primer: Gi/Go Sekonder: G12/G13	Primer: Gi/Go

**Tablo 2.1.** Opioid reseptörlerin özellikleri ve fonksiyonları (Katzung, 2018'den ve Demirkapu Jafarova ve Yananlı, 2021'den uyarlanmıştır) (28, 30) (Devamı).

<b>Opioid Reseptörleri</b>	<b><math>\mu</math> reseptör</b>	<b><math>\delta</math> reseptör</b>	<b><math>\kappa</math> reseptör</b>	<b>N/OFG reseptör</b>
<b>Endojen ligandlar</b>	$\beta$ -endorfin, Enkefalinler, Endomorfin-1 ve -2	Enkefalinler, $\beta$ -endorfin	Dinorfin A, Dinorfin B, $\alpha$ -neoneodörfin	Nociceptin, Orphanin FQ
<b>Agonistler (opium alkaloidleri arasından)</b>	Morfin, kodein	Morfin	Morfin	
<b>Antagonistler</b>	Nalokson, naltrekson			UFP-101
<b>Etkiler</b>	Supraspinal ve spinal analjezi, solunum ve kardiyovasküler fonksiyonlar, GİS hareketinde yavaşlama, nöroendokrin fonksiyonlar, immün sistem fonksiyonları, beslenme, sedasyon, termoregülasyon	Supraspinal ve spinal analjezi, kardiyovasküler fonksiyonlar, nöroendokrin etkiler, GİS hareketinde yavaşlama, ruh hali, davranış	Supraspinal ve spinal analjezi, nöroendokrin fonksiyonlar, GİS hareketinde yavaşlama, immün sistem fonksiyonları, diürez, beslenme, psikomimetik etkiler	Nosisepsiyon, motor hareketler ve agresif davranışlar, güçlendirme ve ödül, stres yanıtı, otonom sistem fonksiyonları, immün sistem fonksiyonları

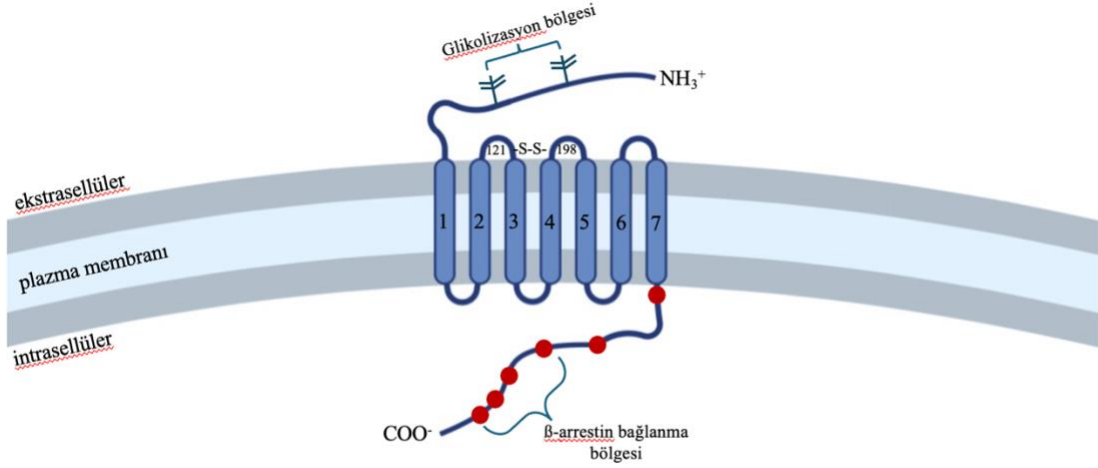
Lö- ve met-enkefalinin analjezik rolünün aksine, spinal kordun dorsal boynuzunda yer alan dinorfin A'nın doku yaralanması ve inflamasyondan sonra yükselmesinin ağrıyı artırdığı ve uzun süreli duyarlılık ve hiperaljezi durumu oluşturduğu öne sürülmektedir. Dinorfinin omurilikteki pronosiseptif etkisi için başlıca reseptör, G proteinine bağlı *orphanin* (yetim) opioid reseptör benzeri alt tip 1'dir (ORL1) (42). Endojen ligandı bir grup araştırmacı tarafından nosiseptin, bir diğer grup tarafından ise orphanin FQ olarak adlandırılmıştır bu nedenle bu ligand-reseptör sistemi şu anda N/OFQ sistemi olarak bilinmektedir (43). Nosiseptin, N-terminal tirozinin olmaması dışında dinorfine yapısal olarak benzerdir; yalnızca artık NOP olarak bilinen ORL1 reseptöründe etki eder. Bu reseptörler de G proteini kenetli reseptör yapısındadır (44). N/OFQ sistemi, santral sinir sistemi (SSS) ve periferde yaygın olarak eksprese edilir. Seçici NOP reseptör ligandları kullanılarak yapılan deneyler sonucunda, N/OFQ sistemi hem pro- hem de anti-nosiseptif aktivitede ve ayrıca ödül mekanizması, öğrenme, ruh hali, anksiyete ve öksürük süreçlerinin ve parkinsonizmin modülasyonunda rol oynamıştır (28). Başlangıçta opioid reseptörlerinden biri olduğu düşünülen sigma ( $\sigma$ ) reseptörü ise G proteini bağlı değildir ve agonist  $\sigma$  reseptörüne bağlanırken nalokson tarafından antagonize edilmez. Bu nedenle bir opiat reseptörü olarak sınıflandırılmaz (45).  $\sigma$  reseptörleri, mitokondri ile ilişkili zarlardaki endoplazmik retikulum üzerinde TM bir reseptör olarak bulunurlar. Stres ve nöropatik yaralanma durumunda,  $\sigma$ -1 reseptörleri, opioid reseptör aktivitelerini inhibe eden ve analjezik etkiyi baskılayan fonksiyonlar sergileyebilirler (46).

Yapılan çalışmalarda  $\mu$  reseptörü bağımlılıkla (47), dopaminerjik sistemin modülasyonu (48), öğrenme ve hafızayla (49) da ilişkilendirilmiştir.  $\delta$  reseptörleri  $\mu$  reseptörleriyle birlikte duygusal duyarlılığa katkıda bulunur (49).

#### **2.1.4. Opioid reseptörlerin etki mekanizması**

Opioid reseptörleri hem uyarıcı hem de inhibitör nöronlar üzerinde yerleşimlerinden kaynaklı nöronal ağlarda inhibisyon veya eksitasyona neden olabilir (50). Opioid reseptörleri G proteini kenetli reseptör yapısındadır ve reseptörlerin her biri, bir ekstrasellüler N-terminus, yedi transmembran (TM) heliks, üç ekstrasellüler ve intrasellüler halka ve G proteini bağlı reseptörlerin karakteristiği olan bir intrasellüler C-

terminustan oluşur (26) (Şekil 2.1). Tüm opioid reseptörlerinde TM3-TM7 tarafından oluşturulan bağlanma bölgesi bulunur. İlgili reseptördeki bölge kısmen ekstrasellüler halkalarla kaplıdır ve TM segmentlerin ekstrasellüler sonlanmalarıyla birlikte bir seçicilik sağlayarak ligandların, özellikle peptitlerin farklı reseptör tiplerine farklı şekilde erişebilmesini sağlar. Bu nedenle, alkaloidler (örneğin morfin) reseptörün TM kısmının çekirdeğine bağlanırken, büyük peptitli ligandlar ekstrasellüler halkalara bağlanır. Ligandların seçiciliği ekstrasellüler halkalar ile ilişkilendirilmiş: birincisi ve üçüncüsü  $\mu$  (mu), ikincisi  $\kappa$  (kappa) ve üçüncüsü  $\delta$  (delta) reseptörü için. Alkaloid antagonistlerinin bağlanma bölgesine daha derin bağlandığı, konformasyonel değişiklikleri engellediği ve işlevsel bir antagonizmaya yol açtığı düşünülmektedir. Opiyat reseptörlerinin homo- ve heterodimerizasyonlar oluşturması ve aktivasyon sonrası trafiği de çeşitli ligandların seçiciliğini ve bunlara verilen fizyolojik tepkileri değiştirebilir (26, 34). Opioidlere karşı toleransın mekanizmasında, post-reseptör olayların etkili olduğu gösterilmiştir (32).



**Şekil 2.1.** Opioid reseptörlerinin yapısı. Kırmızı noktalar fosforilasyon bölgelerini göstermektedir. Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics 13. Baskıdan uyarlanarak hazırlanmıştır (26).

$G_{i/o}$  opioid reseptörlerinin uyarılmasından sonra, hücre içerisinde adenilat siklaz enzimi aktivitesi baskılanır ve siklik adenozin monofosfat (cAMP) seviyesi düşer. Bunun

sonucunda potasyum kanallarının aktivasyonu ile potasyum hücre içine girerek membran hiperpolarizasyonu gerçekleşir veya voltaj kapılı kalsiyum kanallarının açılması azalır ve gerekli kalsiyum artışı sağlanamadığından presinaptik terminallerden nörotransmitter salınımı azalır. Sonuç olarak, opioid reseptörleri uyarıldığında nöronların inhibisyonu ve hiperpolarizasyonu meydana gelir (38, 51).

Fosfolipaz C, mitojen-aktive kinazlar (MAP kinazlar) veya  $\beta$ -arrestin gibi sinyal yollarının da morfin aktivitesinde ve opioidlerin etkilerinin sonlandırılmasında etkili olduğu gösterilmiştir (52).

### **2.1.5. Opioid reseptörlerin fizyolojik etkileri**

$\mu$ ,  $\delta$  ve  $\kappa$  opioid reseptörleri SSS'de (53) ve periferik dokuda bulunmaktadır (30). SSS'de bu reseptörlerin uyarılması analjezi, uyuşukluk, öfori, kopukluk hissi, solunum depresyonu, mide bulantısı ve kusma, öksürük refleksinin baskılanması ve hipotermiye neden olur. Bu reseptörler periferik dokularda uyarıldığında ise miyozis, ortostatik hipotansiyon, kabızlık, idrar retansiyonu gibi etkiler ortaya çıkar (54, 55). Opioidlerin kullanımı için endike olan analjezik veya antinosiseptif etkiler beyin ve spinal kord düzeyinde gelişir. Beyin düzeyinde, ağrı uyarısının yayılımı zayıflar ve ağrı algısı engellenir. Spinal kord düzeyinde ise ağrı dürtülerinin iletimi baskılanır (26, 28).

Alkaloidlerden oluşan doğal (morfin, kodein) bileşiklerin yanında sentetik (meperidin, fentanil, sufentanil, vb.) bileşikler de nosiseptif yollarda, hipotalamik-hipofiz-adrenal eksen boyunca ve limbik sistemde eksprese edilen opioid reseptörlerini uyararak analjezi, sedasyon, öfori, kusma, konstipasyon, antitüssif etkilere, solunum depresyonuna neden olabilir. Ayrıca bu bileşikler duygusal davranışların düzenlenmesinde, ağrı ve strese verilen yanıtlarda, öğrenme ve hafızada ve bağımlılık mekanizmalarının gelişmesinde rol almaktadır (30, 32, 56-60).

### **2.1.6. Morfin**

Morfin, *Papaver somniferum* bitkisinden elde edilen afyon alkaloidlerinin ayrıştırılıp izole edilmesi ile keşfedilmiştir (28). Morfin ismi, Yunan rüya tanrısı Morpheus'tan

esinlenerek verilmiştir (61). Afyon alkaloidleri, yaklaşık %10 oranında bulunan morfinin yanı sıra kodein, tebain ve papaverin gibi diğer alkaloidleri de içerir (29). Morfin, merkezi sinir sistemi (SSS) ve periferik dokularda yaygın olarak bulunan  $\mu$ ,  $\delta$  ve  $\kappa$  reseptörlerine bağlanarak analjezi, anksiyoliz, öfori, sedasyon, solunum depresyonu ve gastrointestinal yolun düz kaslarında kasılma gibi etkiler oluşturur (62). Morfin, şiddetli ağrının kontrolü, akut pulmoner ödem tedavisi ve anestezi prosedürlerinde kullanılır (62). İlacın uygulama yolları arasında oral, rektal, intramusküler, intravenöz, subkutan, epidural ve intratekal yöntemler bulunur (63).

Genel olarak opioidler oral alındığında gastrointestinal sistemden iyi emilirler, rektal mukozadan da emilimleri yeterlidir, bu nedenle morfin ve hidromorfin içeren rektal supozituar formlar da üretilmiştir (26). Morfin, spinal etki yoluyla analjezi üretmek için de kullanılabilir (64). Morfin de dahil olmak üzere çoğu opioidde, karaciğerdeki ilk geçiş metabolizması nedeniyle, ilacın emilimi oral uygulamadan sonra parenteral uygulamaya göre daha azdır. Örneğin, morfinin oral preparatlarının biyoyararlanımı %17 ila 33 aralığındadır (65). Etki-zaman grafiğinin şekli de uygulama yoluna göre değişmektedir, bu nedenle etki süresi genellikle oral yolla biraz daha uzundur. İlk geçiş metabolizmasının ve klirensinin değişkenliği için ayarlama yapılırsa, morfinin oral uygulamasıyla yeterli ağrı kesici elde edilebilir. Kanseri hastalarında etkili analjezi, plazmada sabit bir kararlı durum morfin konsantrasyon aralığıyla ilişkilidir (16–360 ng/mL) (66). Morfin ve çoğu opioid intravenöz olarak verildiğinde hemen etki etmektedir. Ancak, fentanil gibi daha lipofilik bileşikler, emilim ve SSS'ye giriş oranlarındaki farklar nedeniyle subkutan uygulamadan sonra morfinden daha hızlı etki eder. Kodein, eroin ve metadon gibi daha lipofilik opioidlerle karşılaştırıldığında, morfin kan-beyin bariyerini daha az bir oranda geçmektedir (26, 67).

Morfinin yaklaşık üçte biri plazma proteinlerine bağlanır, beyne, iskelet kasına, karaciğere, böbreklere, akciğerlere, bağırsak yoluna ve dalağa dağılır, son dozdan 24 saat sonra doku konsantrasyonları düşer (68). Morfinin metabolizması için ana yol glukuronik asitle konjugasyondur (69). Oluşan iki majör metabolit morfin-6-glukuronid ve morfin-3-glukuroniddir. Az miktarda morfin-3,6-diglukuronid de oluşabilir. 3- ve 6-glukuronidler polar olmasına rağmen, ikisi de kan-beyin bariyerini geçebilir (70). Morfin-6-glukuronid,

morfinine çok benzer farmakolojik etkilere sahiptir. Sistemik olarak verilen morfin-6-glukuronid, hayvan modellerinde ve insanlarda morfinden yaklaşık iki kat daha güçlüdür (71).  $\mu$  reseptörlerine morfinden daha güçlü bağlandığı göz önüne alındığında, morfin-6-glukuronid kronik morfin tedavisi alan hastalarda morfinin analjezik aktivitesinin çoğundan sorumlu olabilir. Morfin-6-glukuronid böbrekler tarafından atıldığından böbrek yetmezliğinde, morfin-6-glukuronid seviyeleri birikebilir etki süresi uzar. Yaşlı hastalarda dağılım hacminin ve renal fonksiyonların azalması nedeniyle daha düşük dozların kullanılması önerilmektedir (72, 73). Bir diğer önemli metabolit olan morfin-3-glukuronid, opioid reseptörlerine karşı düşük afiniteye sahiptir ancak morfinin uyarıcı etkilerine katkıda bulunabilir (74). Morfin, glomerüler filtrasyonla, esas olarak morfin-3-glukuronid olarak atılır; toplam atılımın %90'ı ilk gün gerçekleşir. Çok az morfin değişmeden atılır. Morfin ve glukuronidleri, enterohepatik dolaşıma girdiğinden son doz alımından sonra birkaç gün süresince dışkı ve idrarda eser miktarda morfin bulunmasına yol açar (69).

Morfin ve ilgili opioidler, analjezik etkilerinin yanı sıra, opiyat reseptörlerinin organ sistemleri arasındaki geniş dağılımı nedeniyle geniş bir yan etki yelpazesi gösterebilir. Bu etkiler arasında solunum depresyonu, mide bulantısı, kusma, baş dönmesi, zihinsel bulanıklık, disfori, pruritus, kabızlık, safra yollarında artan basınç, idrar retansiyonu, hipotansiyon ve nadiren deliryum bulunur. Son dozun etkisi geçtikten sonra ağrıya karşı artan hassasiyet meydana gelebilir ve opiyat reseptörlerinin uyarılmaması yoksunluk durumuna yol açabilir (62).

### **2.1.7. Opioidlere tolerans geliştirilmesi**

Opioid toleransı, klinik olarak opioid uygulamasının başlangıcında gözlenen analjeziyi elde etmek için artan bir opioid doz gereksinimi olarak tanımlanmıştır. Toleransa neden olan başlıca mekanizmalar arasında, reseptörlerin ortadan kaldırılması (internalizasyon benzeri), reseptör sayısının azaltılması, opioid reseptör bulunduran nöronlarda intrasellüler ileti yollarında adaptasyon gelişmesi ve sistem düzeyinde karşı-adaptasyon teorileri yer almaktadır (26, 75).

Morfine kronik maruziyet G protein kenetli reseptör kinazları tarafından opioid reseptörünün fosforilasyonuna neden olur. Fosforilasyon sonrası reseptöre bağlanan arrestin, G proteininin sinyalizasyon aktivitesini durdurur böylece opioid reseptörlere desensitizasyon meydana gelir (35).

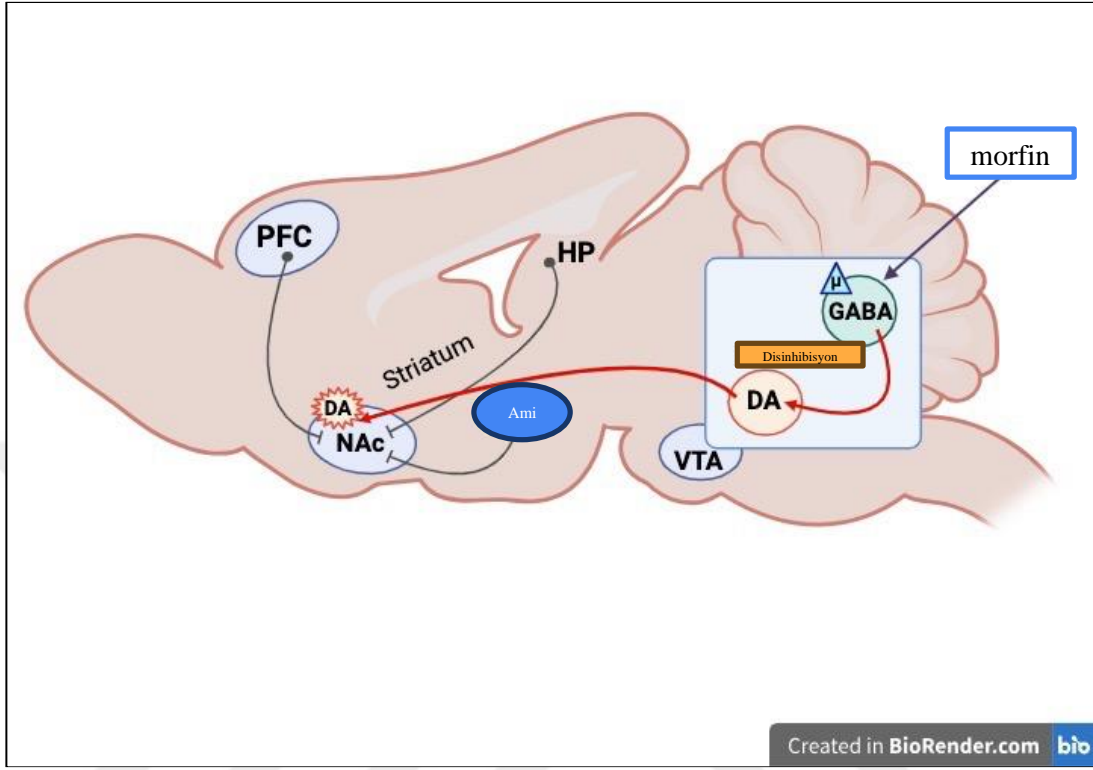
Tolerans gelişimi bir opioidin ilk dozuyla başlasa da, belirgin hale gelmesi genellikle terapötik dozlara sık maruziyetten 2-3 hafta sonrasında ortaya çıkar. Bununla birlikte, remifentanil gibi ultra güçlü opioid analjeziklerin kullanımının saatler içinde opioid toleransını indüklediği gösterilmiştir. Tolerans en kolay şekilde, büyük dozlar kısa aralıklarla verildiğinde gelişir ve dozlar arasında daha uzun aralıklarla az miktarda ilaç verilerek en aza indirilir. Klinik olarak öfori, disfori, zihinsel karışıklık, sedasyon, solunum depresyonu, antidiürez, bulantı kusma ve öksürük baskılayıcı etkilerine tolerans gelişimi yüksek olurken, opioid toleransı miyoziz, konstipasyon ve konvülsiyonlar için nadirdir. Bu olgu, hücre içi yolaklar düzeyinde (örneğin adenilat siklaz inhibisyonunun azalması) ve organ sistemi düzeyinde (örneğin sedatif ve analjezik etkilerin kaybı) ortaya çıkabilir (76).

Çapraz tolerans, morfine toleranslı hastaların genellikle diğer agonist opioidlere karşı da analjezik yanıt, öfori verici, yatıştırıcı ve solunum depresyonu gibi etkilerde azalma göstermesi demektir. Bu durum özellikle birincil olarak  $\mu$ -reseptör agonist aktivitesi olan ajanlar için geçerlidir. Bununla beraber,  $\mu$ -reseptör agonistleri arasında var olan çapraz tolerans genellikle kısmi veya eksiktir. Klinikte bu durumdan faydalanılarak opioid rotasyonu kavramı ortaya çıkmıştır. Bir opioid analjezik rejime tolerans geliştiren bir hasta, farklı bir opioid analjeziğe (örneğin, morfinden hidromorfona; hidromorfondan metadona) döndürüldüğünde azaltılmış eşdeğer dozajda önemli ölçüde iyileştirilmiş analjeziden fayda görür. Başka bir yaklaşım da opioid reseptör fonksiyonunu, yardımcı nonopioid ajanların kullanımı yoluyla yeniden birleştirmektir. Örneğin N-metil-D-aspartat (NMDA) reseptör antagonistleri (örneğin ketamin) kontrollü çalışmalarda, opioid toleranslı hastalarda postoperatif ağrıyı ve opioid gereksinimlerini azaltmada klinik etkinlik göstermiştir (26, 28).

### **2.1.8. Opioid kullanım bozukluğu ve bağımlılık**

Opioid kötüye kullanımını, tolerans nedeniyle aynı etkiyi üretmek için daha yüksek dozlarda kullanılan, yüksek morbidite ve mortaliteye sahip tekrarlayan bir hastalıktır (77). *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders* (DSM)-V kriterlerine göre opioid kullanım bozukluğu, bir tıbbi endikasyon olmadan kullanılan ya da tıbbi durumlarda kullanılması gerekenden uzun süre ve/veya yüksek dozda kendiliğinden opioid kullanımını, özlem ya da kuvvetli bir kullanma isteği olarak tanımlanabilir (78). Opioid bağımlılığı hem psişik hem de fiziksel bağımlılıkta gelişir. Fiziksel opioid bağımlılığı hem tedavi amaçlı kullanıldığında hem de kötüye kullanım sonucu ortaya çıkar (30). Opiyatların olumlu, ödüllendirici etkileri, opiyatların eğlence amaçlı kullanımına başlamanın itici bileşeni olarak kabul edilir (2). Bağımlılık, söz konusu uyuşturucu sınıfına ve reseptöre özgüdür. Opioidlere maruz kalma süresi ne kadar uzun olursa, bağımlılık ve tolerans derecesi de o kadar yüksek olur (52). Fiziksel bağımlılık geliştikten sonra, yoksunluk semptomlarını önlemek için opioid tüketimi sürdürülür (76). Bu nedenle tedavi uzun ve zordur. Metadon, buprenorfin, bir opioid antagonisti olan naltrekson gibi opioid agonistleri veya yoksunluk temelli tedavi tercih edilebilir.  $\alpha$ -2 agonisti klonidin, opioid analjezik detoksifikasyonu için FDA onaylı tedavilerdendir (28).

Morfin gibi bağımlılık yapıcı maddelerin kullanımı genel olarak beyindeki ödül sistemi olan medial prefrontal korteks (PFC), ventral tegmental alan (VTA) ve nucleus accumbens (NAc) gibi mezolimbik dopaminerjik sistemin yapılarını uyararak nucleus accumbens dopamin salınımına neden olur (79) (Şekil 2.2). Morfin ve diğer opioidlerin ödüllendirici etkisi, VTA'nın GABAerjik terminallerinde lokalize olan  $\mu$  opioid reseptörlerinin uyarılması ile ilişkilidir. Bu stimülasyon GABA salınımını inhibe eder, bu da dopaminerjik nöronları disinhibe eder ve NAc'de öfori duygularına neden olan ve bağımlılığın gelişimini destekleyen dopamin salınımına yol açar (28, 52, 80). Bunun yanında ventral striatum, hipokampus, PFC veya amigdala gibi beyin yapılarından VTA'ya gelen uyarılar da nucleus accumbense dopamin salınımını artırır. Bunun yanında bu yapıların NAc'a doğrudan innervasyonları vardır (81).



**Şekil 2.2.** Mezolimbik dopaminerjik sisteme morfin uygulamasının etkisi (Ami-amigdala, DA-dopamin, HP-hipokampus, NAc-nucleus accumbens, PFC-prefrontal korteks, VTA-ventral tegmental alan) (www.biorender.com adresinden uyarlanarak hazırlanmıştır).

### **2.1.9. Opioid bağımlılığında yoksunluk gelişmesi**

Opiyat yoksunluğu önemli somatomotor ve otonomik bulgular ile (ajitasyon, hiperaljezi, hipertermi, hipertansiyon, diyare, göz bebeği genişlemesi ve hemen hemen tüm hipofiz ve adrenomedüller hormonların salınımıyla yansıtılır) ve duygusal semptomlarla (disfori, anksiyete ve depresyon) kendini gösterir. Yoksunluk durumu oldukça rahatsız edicidir ve madde alıcısını yoksunluktan kaçınmak için güçlü çabalar göstermeye, yani daha fazla madde tüketmeye motive eder (82). Çapraz tolerans olgusuyla tutarlı olarak, aynı opiyat reseptörüyle etkileşime giren ilaçlar, aynı reseptör üzerinde etki eden başka bir ilaca (örneğin morfin ve metadon) toleranslı organizmalarda gözlemlenen yoksunluğun bastırılmasına neden olur (83).

Yoksunluk gelişimi DSM-V'e göre opioid kullanımının azaltılması veya kesilmesi ya da opioid antagonistinin verilmesi durumunda birkaç dakika-gün içerisinde disforik ruh hali, bulantı veya kusma, miyalji, lakrimasyon veya rinore, ishal, esneme, uykusuzluk, pupillerde dilatasyon veya terleme gibi bulgu ve semptomların gelişmesi olarak tanımlanmıştır (78). Yoksunluk sendromunun başlangıç zamanı, yoğunluğu ve süresi daha önce kullanılan ilaca bağlıdır ve biyolojik yarı ömrüyle ilişkili olabilir. Morfin veya eroinle, yoksunluk belirtileri genellikle son dozdan 6-10 saat sonra başlar. Zirve etkiler 36-48 saatte görülür, bundan sonra belirti ve semptomların çoğu kademeli olarak azalır. 5 güne kadar etkilerin çoğu ortadan kalkar, ancak bazı vakalarda aylarca sürebilir (28).

Geçici, hızlandırılmış yoksunluk sendromu -antagonistle hızlandırılmış yoksunluk-nalokson veya başka bir antagonist uygulanarak opioidlere fiziksel olarak bağımlı bir denekte indüklenebilir. Antagonistin enjeksiyonundan sonraki 3 dakika içinde, ilacı ani bırakmadan sonra görülenlere benzer işaretler ve semptomlar ortaya çıkar, 10-20 dakikada zirveye ulaşır ve 1 saat sonra büyük ölçüde azalır. Nispeten hafif bir yoksunluk sendromuna neden olan metadon kullanımında dahi, antagonistle hızlandırılmış yoksunluk sendromu çok şiddetli olabilir (28, 41).

Opioid bağımlılığında, mezokortikolimbik dopaminerjik sistem NAc bölgesinde dopamin salınımını aktive eder ve indükler. Opioid bağımlılığında SSS'deki dopaminerjik aktivitedeki adaptif artış, yoksunluk sırasında baskılanır ve çekilme semptomları ortaya çıkar (84). Kronik ilaç maruziyeti sonrası NAc'de dopaminerjik ve serotonerjik iletide zayıflama,  $\mu$  opioid reseptörlerin yanıtında artış, GABAerjik iletide azalma ve NMDA glutamaterjik iletide artış oluşması gibi değişiklikler yoksunluk sendromunun oluşmasına neden olmaktadır (85). Locus coeruleus (LC) ve nucleus tractus solitarius'tan (NTS) VTA'ya projekte olan noradrenerjik nöronal ağın ve noradrenalinin (NA) opioid kullanımı sonrasında ortaya çıkan yoksunluk sendromuna katkıda bulunduğu düşünülmektedir (86). Morfin bağımlılığında dopamin (DA) dışında NA, glutamat, serotonin, GABA, adenosin, nitrik oksit, oreksin gibi nörotransmitterler veya nöromodulatorların görev aldığı gösterilmiştir (5-7). Ödül mekanizmalarında yer alan bu nörotransmitterlerin etkilerinin farmakolojik ajanlar ile modüle edilmesi, ilaç bağımlılığı ve yoksunluk tedavisinde yeni yaklaşımlar kazandırabilir (52).

Günümüzde opiyat bağımlılığı tedavisinde metadon, buprenorfin, naltrekson, lofeksidin gibi farmakolojik tedavi seçeneklerine ek olarak motivasyonel görüşme, bilişsel davranışçı terapi gibi psikoterapiler de kullanılmaktadır. Ancak opioid bağımlılığı tedavisi sonrası hastalık yüksek oranda tekrarlamaktadır (87).

### **2.1.9.1. Sıçanda morfin yoksunluğu modeli oluşturulması**

Morfin bağımlılığı sıçanlarda genellikle art arda 5-9 gün boyunca morfinin artan dozlarda (10'dan 50-100 mg/kg'a kadar) kronik uygulanmasıyla elde edilir. Morfin yoksunluğu belirtilerinin oluşturulması ise deney hayvanında ya kronik morfin uygulamasının kesilmesi ya da en sık kullanılan yöntem olan opioid reseptör antagonisti naloksonun (1-6 mg/kg aralığında değişen dozlarda) verilmesi ile meydana gelir (52). Morfin yoksunluk belirtileri kemirgenlerde sıçrama, ıslak köpek silkinmesi, karın germe, pitozis ve kilo kaybı gibi bulgularla belirti verir (5, 52). Bazı çalışmalarda morfin yoksunluğunda mezokortikolimbik sistemdeki dopamin azalışının kritik bir öneme sahip olduğu bildirilse de NA, serotonin, glutamat, oreksin ve kortizol gibi nörotransmitterler de bu sürece katkıda bulunabilir (52, 76, 85).

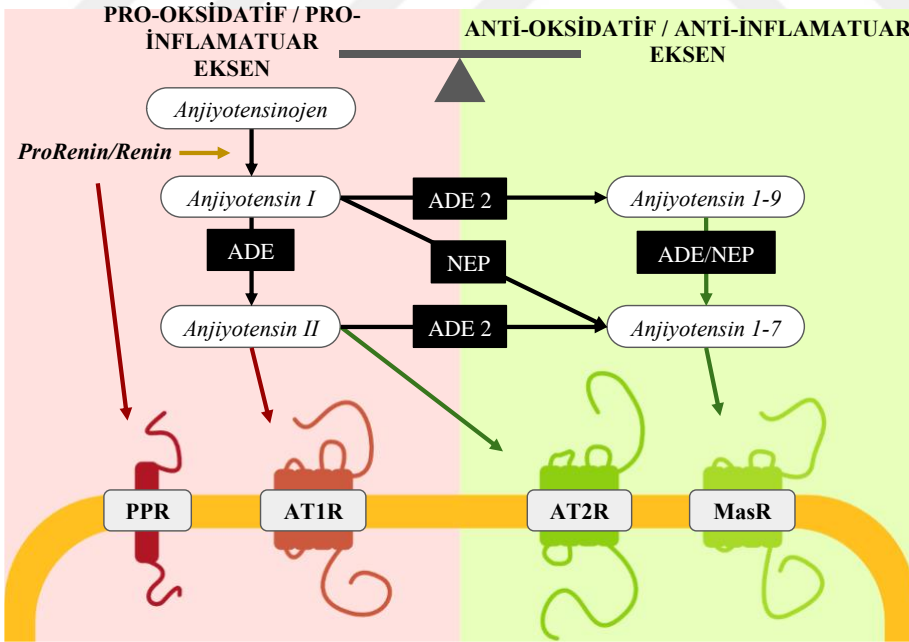
## **2.2. Renin Anjiyotensin Sistemi**

Renin anjiyotensin sistemi (RAS), ilk kez Tigerstedt ve Bergman (1898) tarafından tavşan böbreğinde tanımlanmıştır (16). Filogenetik olarak RAS, lamprey gibi ilkel omurgalılarda bulunan çok eski bir hormon sistemidir ve suda yaşayan canlılardan karasal canlılara adaptasyonda ve az tuzlu ekosistemlerde yaşamın devamında önemli bir rol oynar (88). RAS nöral, vasküler ve kardiyopulmoner fizyolojide önemli bir rol oynayan, çeşitli enzimler ile peptitlerden oluşan bir peptit hormon sistemidir (8).

### **2.2.1 Renin anjiyotensin sisteminde yer alan peptitler ve reseptörler**

Anjiyotensin II (ANJ II), öncül protein anjiyotensinojenden renin ve anjiyotensin dönüştürücü enzim (ADE veya ADE1) enzimleri tarafından sıralı bölünmeler yoluyla üretilen ana RAS efektör peptididir (Şekil 2.3) (Tablo 2.2). ANJ II, ANJ II tip 1 (AT1) ve

2 (AT2) reseptörleri olarak adlandırılan iki ana G-protein bağlı reseptöre bağlanır. Klasik RAS'ın periferik etkilerinin (damarların kasılması ve böbreklerde su ve tuz tutulması gibi) çoğunluğuyla AT1 reseptörleri ilişkilidir. AT1 reseptörünün geni insanlarda kromozom 3q üzerinde yer almaktadır ve 40-42 kDa protein (359 amino asit) kodlar. AT1 reseptörü aktive olduktan sonra, membran fosfatidilinositol-4,5-bisfosfat hidrolize olarak inositol trifosfat (IP3) ve diaçilgliserol (DAG) üretilir. Endoplazmik retikulum gibi hücre içi  $Ca^{+2}$  depo bölgelerinde IP3 reseptörleri bulunur. Bunlar ligand kapılı  $Ca^{+2}$  salım kanallarıdır ve IP3 reseptörlerine bağlanarak intrasellüler  $Ca^{+2}$  depolarının hareket etmesini sağlar (89). NADPH, mitokondriden sonra ikinci büyük süperoksit kaynağıdır. DAG protein kinaz C'yi aktive ederek, NADPH oksidaz kompleksinin uyarılmasını destekler (90, 91). Süperoksit ve süperoksit bileşenlerinden NADPH-oksidad ile üretilen reaktif oksijen türleri (ROS), AT1 reseptörlerinin oksidasyonu ve inflamasyonu artırıcı etkilerinden sorumlu olan başlıca etmenlerdir (92).



Şekil 2.3. Renin anjiyotensin sistemde yer alan peptitler ve reseptörler (16) (Nötral endopeptidaz -NEP-)

**Tablo 2.2.** Renin anjiyotensin sisteminde yer alan peptitler (17)

<b>Adı</b>	<b>Primer Dizi</b>	<b>Reseptör</b>
<b>ANJ I (ANJ 1-10)</b>	H-Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe-His-Leu-OH	-
<b>ANJ 1-9</b>	H-Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe-His-OH	Mas reseptörü
<b>ANJ II (ANJ 1-8)</b>	H-Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe-OH	ATR1/ATR2
<b>ANJ 1-7</b>	H-Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-OH	Mas reseptörü
<b>ANJ 1-5</b>	H-Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-OH	Mas reseptörü
<b>ANJ 1-4</b>	H-Asp-Arg-Val-Tyr-OH	ATR4
<b>ANJ III (ANJ 2-8)</b>	H-Asp-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe-OH	ATR1/ATR2
<b>ANJ IV (ANJ 3-8)</b>	H-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe-OH	IRAP
<b>Alamandin</b>	H-Ala-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-OH	MrgD

AT2 reseptörü 363 amino asitlik bir proteindir. AT2 geni X kromozomunda, çoğunlukla Xq23 bölgesinde bulunur (93). AT2 reseptörleri aktive edildiğinde genelde AT1 reseptörleri tarafından harekete geçirilen etkilere zıt değişimler gösterir. AT2 reseptörlerinin aktivasyonu NADPH oksidaz enziminin aktivitesini azaltarak süperoksit üretimini sınırlar ve nitrik oksit AT2R sinyali için önemli bir ara üründür (94-96). AT2 ekspresyonunda cinsiyet farklılıkları gözlenmiştir ve bu farklılıklar hem hormonal hem de cinsiyet kromozomu tamamlayıcı etkilerle ilişkili olabilir (97).

AT1 ve AT2 reseptörlerine ek olarak diğer anjiyotensin peptitleri ve reseptörleri, genel olarak pro-oksidatif ve pro-inflamatuar bir kol ile ona karşı düzenleyici işlevleri bulunan anti-oksidatif ve anti-inflamatuar bir kol şeklinde organize olarak RAS fonksiyonlarını modüle eder (Şekil 2.3). Fiziksel koşullarda her iki tarafın da doğru şekilde dengelenmesi

gerekir. Oksidasyon ve inflamasyona yol açan yolaklar temelde ANJ II/AT1 reseptörlerinin NADPH oksidaz kompleksi enziminin ve  $Ca^{+2}$ 'un sitoplazmaya salınımını aktive etmesi ile oluşturulur. Bunun yanında, prorenin ve renin de AT1 reseptörlerine bağlanabilir (Şekil 2.3). Proreninin ve reninin AT1 reseptörüne bağlanması, benzer yolaklarda aktivasyona neden olur. Prorenin reseptörü de AT1 reseptör aktivasyonunun yol açtığı mekanizmalar gibi oksidatif etkilere yol açan mekanizmaları tetikler (98). Anti-oksidatif/anti-inflamatuar eksen esas olarak ANJ II/AT2 reseptör bileşeni ve G-protein-bağlı Mas reseptörü (MasR) (99, 100) ve MrgD (101) ve MrgE (102) gibi Mas ile ilişkili G protein reseptör ailesi üyelerinin ANJ (1- 7) ve alamandin tarafından aktivasyonu ile oluşturulur.

Anjiyotensin dönüştürücü enzim 2 (ADE2) oksidasyon oluşturan yolakta bulunan peptitleri (ANJ I ve ANJ II), anti-oksidasyon mekanizmalarında yer alan ANJ 1-9 ve ANJ 1-7, ANJ A, ANJ III gibi diğer peptitlere türevlere parçalayarak sistemin iki ucu arasındaki dengeyi sağlamada önemli bir rol oynamaktadır (20) (Şekil 2.3). Alamandin, ANJ 1-7'nin aspartik asit amino asidinin dekarboksilasyonu ile sentezlenir (101). Mas ile ilişkili G proteini reseptörleri için ana ligand, alamandindir. ANJ A, ANJ III ve ANJ IV gibi diğer RAS bileşenlerinin rolü halen tartışılmaktadır (103).

Farklı RAS reseptörleri ve RAS reseptörleri ile dopamin, adozin, kannabinoid, bradikinin veya noradrenalin ile aktive olan reseptörler arasında reseptör heteromerleri olduğu bildirilmiştir (104). AT1 reseptörü kendisiyle de dimerleşerek ve AT1-AT1 homodimerlerini oluşturabilir. AT1R'nin AT2R ile birleşmesi ise AT1 reseptörünün sinyalizasyonunu bloke edilmesine neden olur veya reseptörlerden birine antagonist bağlanması diğer reseptör aktivitesinin inhibe edilmesini geriye döndürebilir (105). AT1 reseptörü ile Mas reseptörünün nöronlarda hetero -dimerler ve -trimerler meydana geldiği bulunmuştur (106). Beynin striatum bölgesinde ise AT1R ile DA D2 reseptörlerinin heteromer yapısı oluşturup birleştiği ve AT1 reseptörüne agonist ve antagonist etki gösteren ilaçların D2 reseptörler etkileşimlerini değiştirebildiği bildirilmiştir (107).

Dolaşımdaki RAS ve doku veya parakrin RAS'a (Şekil 2.3) ek olarak, fibroblastlar, vasküler düz kas hücreleri, kalp hücreleri, böbrek hücreleri ve nöronlar dahil olmak üzere çeşitli hücre türlerinde hücre içi veya intrakrin RAS (özellikle mitokondri veya nükleus

membranı üzerinde) tanımlanmıştır (20, 108). Intraseküller ortamda yer alan üçüncü bir RAS, ANJ II'nin intraseküller olarak oluşumu sentezi ve farklı RAS peptitlerinin, enzimlerinin ve reseptörlerinin hücre içinde bulunması ile desteklenmektedir.

### **2.2.2 Renin anjiyotensin sisteminin fizyolojik etkileri**

Vazokonstriksiyon: AT1R, ANJ II'nin prekapiller arteriyollerde ve postkapiller venüllerde vazokonstriksiyona bağı kan basıncını artışına neden olan birincil reseptördür (109).

Aldosteron salgısının uyarılması: ANJ II, adrenal korteksi aldosteron hormonunun salgılanması için uyarır. Aldosteron, böbreklerin distal tübüllerinin ve toplama kanallarının potasyum karşılığında su ve sodyumu reabsorbsiyonuna neden olarak ekstrasellüler hacim ve kan basıncında artışa yol açar. Ayrıca aldosteronun etkisiyle potasyum atılımı da artması vücutta elektrolit dengesinin korunmasını olanak sağlar (110).

Antidiüretik Hormon (ADH) salgısının uyarılması: ANJ II, hipotalamusu uyararak antidiüretik hormon (ADH) salınımını artırır. ADH, böbreklerde suyun geri emilimini sağlayarak idrarla su kaybını azaltır ve böylece vücudun su dengesini korur (111).

Böbreklerde glomerüler filtrasyon hızının (GFR) düzenlenmesi: ANJ II, böbreklerdeki glomerüler filtrasyon hızını koruyarak böbrek fonksiyonlarının sağlıklı bir şekilde devam etmesine katkı sağlar. Özellikle böbrekteki efferent arteriyolleri daraltarak glomerüller üzerinde yeterli basınç oluşturur. Bu durum, düşük kan basıncına rağmen filtrasyon hızının korunmasına olanak tanır (111).

Sempatik sinir sisteminin aktivasyonu: ANJ II, sempatik sinir sistemini uyararak pozitif kronotrop etki ile kalp atış hızını ve pozitif inotropik etki ile kalbin kasılma gücünü artırır. Ayrıca sempatik sistemin alfa 1 reseptörlerinin etkisiyle böbreklerden daha fazla renin salgılanır ve RAS daha da aktif hale gelir. Sonuç olarak, kan basıncı ve kan hacmi düşüşlerinde vücudun hızlı yanıt vermesini sağlar (111). Sempatik sistemin bu aktivasyonu özellikle beyindeki nukleus solitarius ve paraventriküler çekirdek gibi bölgelerdeki ANJ II aktivitesi ile ilişkilendirilmiştir.

Kalp ve Damar Sisteminde Remodeling (Yapısal Yeniden Şekillenme): ANJ II, sürekli yüksek seviyelerde bulunduğunda kalp ve damar sisteminde yapısal değişikliklere (remodeling) yol açabilir. Örneğin, anjiotensin II kalp kası hücrelerinin hipertrofisine ve damar duvarlarının kalınlaşmasına, damar sertliği ve ateroskleroz tablosunun ağırlaşmasına neden olabilir (112).

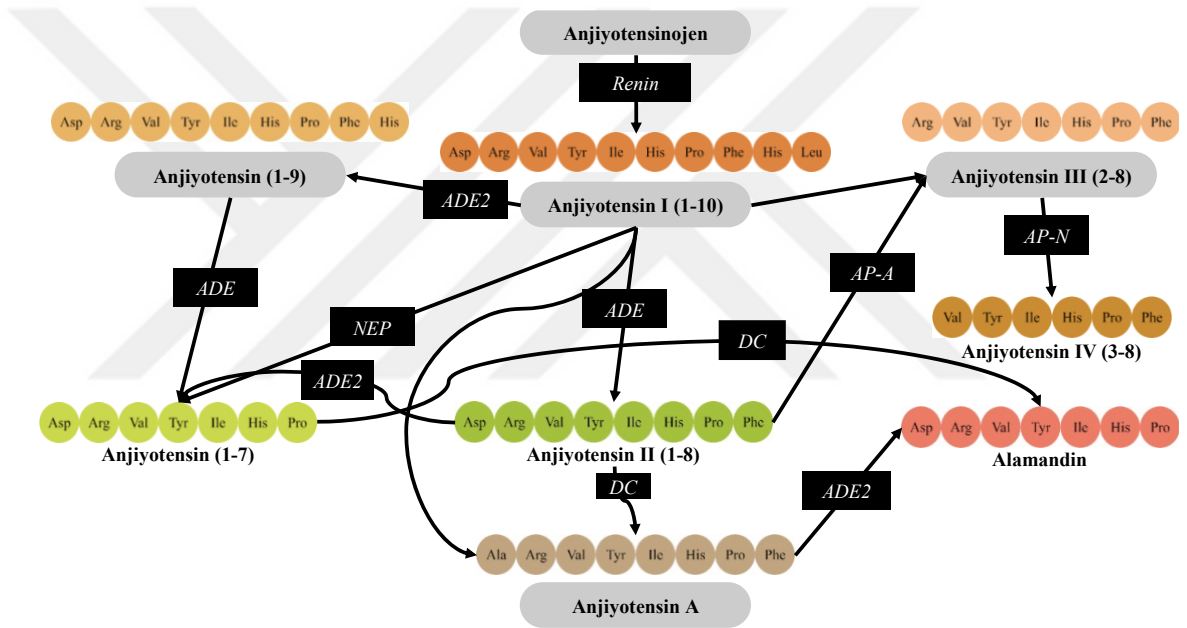
ANJ II tip 2 reseptörü (AT2R) de çeşitli dokularda tanımlanmıştır ve aktivasyonunun AT1R aracılı etkilere karşıt görev aldığı ve bu nedenle özellikle nitrik oksit salınımı ve anti proliferasyon yoluyla kompanse edici yanıtlarda rol oynadığı düşünülmektedir (95). ANJ-(1-7) MasR aracılığıyla etki ederek vazodilatasyonu teşvik eden ve antiproliferatif ve antihipertrofik etkiler gösteren ANJ II'nin özelliklerine zıt özelliklere sahiptir (100). RAS sisteminde yer alan peptit ve enzimleri hedefleyen antihipertansif ilaçlar klinikte sıklıkla kullanılmaktadır. Aliskiren renin enzimini inhibe eder. ADE inhibitörleri (kaptopril, enalapril, lisinopril gibi) ANJ I'den ANJ II'nin üretilmesini bloke ederek etkilerini gösterirler. Anjiyotensin II reseptör blokörleri (ARB) (valsartan, losartan, kandesartan gibi) ise AT1R'in selektif kompetitif antagonistleridir. Spirinolakton ve eplerenon ise aldosteronun kompetitif reseptör blokörleridir (28).

### **2.2.3 Beyinde bulunan renin anjiyotensin sistemi**

ANJ II intakt bir kan beyin bariyerini (KBB) geçemediği için beyinde RAS başlangıçta sirkumventriküler organlar aracılığıyla kan basıncının düzenlenmesiyle ilişkilendirilmiştir (113). Ayrıca, ANJ II'nin beyindeki düzeylerinin serumdan daha yüksek olması, beyinde yer alan parakrin bir RAS sisteminin olabileceğini ortaya koymaktadır. Beyin RAS sistemi için en önemli protein olan anjiyotensinojen, en fazla astrositlerde üretilmektedir (114), nöronlar gibi diğer hücrelerde daha az üretilir. Yapılan ilk araştırmalarda beyinde renin düzeyi tespit edilememiş ve bu nedenle beyinde bulunan ANJ II'nin periferik dolaşımdan geçebileceği düşünülmüş, bağımsız bir beyin RAS'ının olabileceği tartışmalı kalmıştır. Sonraki çalışmalarda beyinde az miktarda renin ve yüksek seviyelerde prorenin ve prorenin reseptörlerinin varlığı kanıtlanmıştır (115). KBB, periferdeki sistemik ANJ II'nin

nöronal dokulara geçmesine bir bariyer görevi gördüğünden, beyin RAS'ın, sistemik RAS'tan bağımsız çalıştığı kabul edilmektedir (116).

Başlıca nöroaktif anjiyotensin peptitleri arasında ANJ II, ANJ IV, ANJ (1-7) ve Alamandin sayılabilir (Tablo 2.2), (Şekil 2.4). ANJ II ayrıca aminopeptidazlar tarafından ANJ III'e, ardından da ANJ IV'e dönüştürülebilir. ANJ III, AT1R'leri ANJ II'den daha az bir afinite ile ve AT2R'leri ANJ II'den daha yüksek bir afinite ile bağlar. ANJ IV, AT4R'leri bağlar ve yüksek konsantrasyonlarda olduğunda AT1R'leri de bağlayabilir (20).



**Şekil 2.4** Beyinde bulunan renin anjiyotensin sistemi peptitleri (20) (Aminopeptidaz A - Ap-A, aminopeptidaz N-Ap-N, nötral endopeptidaz-NEP, dekarboksilaz -DC).

AT1R ve AT2R, korteks, hipokampus, locus coeruleus, amigdala, periaqueductal grey, medyan eminens, subfornik organ, paraventriküler nükleus, dorsomedial hipotalamus ve nükleus traktus solitarius dahil olmak üzere tüm beyine dağılmıştır. Beyine özgü olan lokal RAS'ın AT1 reseptörü; sıvı ve elektrolit dengesinin düzenlenmesi, nöroendokrin kontrol ve kardiyovasküler sistemin otonomik kontrolü ile ilişkili bölgelerde bulunur (117). AT2R aktivasyonu kognisyonu, hücre sağkalımını kolaylaştırır

ve hem antioksidan özelliklere hem de anti-inflamatuar özelliklere sahiptir. Hücre yüzeyinde bulunan AT2R, bu işlevleri gerçekleştirmek için serin-treonin fosfataz (PP2A) ve peroksizom proliferatör aktive reseptör  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ) gibi yolların aktivasyonuna yol açabilir (43). Hem AT2R'ler hem de MasR aynı zamanda korteks, hipokampus ve bazal gangliyonlardaki nöronlar, astrositler ve mikroglia üzerinde bulunan G proteine bağlı reseptörlerdir. Mas ile ilişkili G protein bağlı reseptörler (MrgD), AT2R'ler ve ADE2 vazodilatasyondaki rolleriyle bilinirler, ancak beyinde özellikle kognisyonu ve hücre sağkalımını artırırlar ve hem antioksidan hem de anti-inflamatuar özelliklere sahiptirler. AT2R, MasR ve MrgD yolları birbirine bağlıdır. ADE2, MasR'ler ve MrgD'ler için ligand oluşumunu sağlar. AT2R aktivasyonu ADE2 ekspresyonunu artırır. AT2R'ler devre dışı bırakıldığında, MasR ve ADE2 mRNA, protein ve aktivitesinde bir düşüş olur (118). AT2R'ler ve MasR'lerin her biri AT1R'lerle heterodimerize olarak AT2R/AT1R ve MasR/AT1R heterodimerleri oluşturarak AT1R'leri direkt antagonize ve inaktive edebilir, bu da AT1R sinyal yollarında azalmaya yol açar. ADE2, bu AT2R/AT1R ve MasR/AT1R heterodimerlerinin oluşumunu önemli ölçüde artırır (20). AT4R, G proteine bağlı bir reseptör değil, insülinle düzenlenen bir aminopeptidaz (IRAP) yapısındadır. Korteks, hipokampus ve bazal ganglionlardaki nöronlarda yer alan bir tip II aminopeptidaz membran proteinidir (118). Diğer reseptörlerin aksine, AT4R'ler nöronlarla sınırlı olabilir. AT4R aktivasyonu kognisyonu, hücre sinyal iletimini, sinaptik remodelingi geliştirir ve hem antioksidan hem de anti-inflamatuar özelliklere sahiptir (119).

#### **2.2.4. Beyinde bulunan renin anjiyotensin sistemi ve dopamin ilişkisi**

ANJ II/AT1 reseptör ve pro-renin sinyalizasyonu ile oluşan oksidatif ve inflammatuar mekanizmanın bileşenleri dopamin sentezleyen ve salgılayan nöronlarda ve glial hücrelerde gösterilmiştir (120). Son zamanlarda ANJ II/AT2 yolağı ve ANJ 1-7/MasR yolağını da içeren anti-oksidatif ve anti-inflamatuar mekanizmaların varlığı da ortaya konmuştur (97). Beyinde, dopamin ve ANJ II arasındaki etkileşim ilk olarak mikrodializ deneyi ile gösterilmiş ve ANJ II'nin striatuma akut olarak uygulamasının striatumda AT1 reseptör antagonistleri tarafından bloke edilebilen bir dopamin salınımına neden olduğu ortaya çıkmıştır. Bu sonuçlar, ANJ II'nin AT1 reseptörlerini aktive ederek dopamin

salınımını arttırabildiğini ve dopamin seviyelerinde bir azalma olduğunda, ANJ II/AT1 reseptör aktivitesinde kompensatuar bir artış oluşturularak dopaminerjik fonksiyonun eski haline getirilmesinin sağlanacağını göstermektedir (121). Bununla beraber ANJ II katekolamin biyosentezi için kilit rol üstlenen tirozin hidroksilaz ve dopamin  $\beta$ -hidroksilaz enzimlerinin ifadesini ve metabolizmasını değiştirebilir, bu sayede NA ve DA sentezinin düzenlenmesinde rolü bulunur. Anjiyotensin ve DA reseptörleri arasındaki karşılıklı etkileşimler substantia nigra ve striatumda yapılan araştırmalarda gösterilmiştir (122).

### **2.2.5. Beyinde bulunan renin anjiyotensin sisteminin kognitif etkileri**

RAS modülatörlerinin (ADE inhibitörleri, ARB gibi) hipotansif etkilerinden bağımsız olarak, kognisyonunun geliştirilmesi gibi başka pleiotropik özelliklere de sahip olduğu gösterilmiştir. Beyinde, RAS'ın farklı bileşenleri nöroprotektif ve kognisyon açısından kapsamlı bir şekilde incelenmiştir (20).

Beyinde bulunan RAS'ı etkileyen ilaçların bazı hastalık modellerinde (Alzheimer hastalığı, Parkinson hastalığı, multipl skleroz gibi nörodejeneratif hastalıklar veya inme gibi serebrovasküler durumlar) yapılan in-vitro ve in-vivo çalışmalarda nöroprotektif etki gösterdiği bilinmektedir (10, 11, 13-17). RAS inhibitörleri periferde kardiyovasküler, renal ve metabolik hastalıklarda rol alırken, beyinde migren, nöropatik ağrı, kognitif bozukluklar ve serebral hasarlanma gibi patolojilerde etkilidir (117). RAS ile kolinerjik, dopaminerjik ve adrenerjik sistemler gibi diğer sistemler arasında bir çapraz etkileşim olduğu gösterilmiştir (14, 20).

Örnek vermek gerekirse AT1R blokörü telmisartanın, tekrarlanan serebral iskemi modelinde, kronik serebral hipoperfüzyon modelinde, akut ve kronik stres modelinde, lipopolisakkarit kaynaklı nöroinflamasyonda ve kronik böbrek hastalığı olan üremik farelerde hafıza bozukluğunu iyileştirdiği gösterilmiştir (10). Ayrıca, inme eğilimli spontan hipertansif sıçanların telmisartan ile tedavisi uzamsal öğrenmeyi ve hafızayı geliştirmiştir (123). Ayrıca telmisartan diyabete bağlı kognitif gerilemeyi iyileştirmek için PPAR $\gamma$  aktivasyonu yoluyla KBB geçirgenliğindeki bozulmaları hafifletmiş, telmisartanın

PPAR $\gamma$  aktivasyonunun kognisyon üzerindeki olumlu etkileri kısmen açıklayabileceği öne sürülmüştür (124).

Losartan, Alzheimer hastalığı hayvan modellerinde kullanılan bir başka AT1R blokörüdür. Losartanın, amiloid- $\beta$  öncü protein modelinde yaşlı farelerde uzamsal öğrenme ve hafıza kapasitesini normalleştirdiği gösterilmiştir. Ayrıca astrogliozisi azalttığı ve AT1R ve AT4R'nin ekspresyon seviyelerini normalleştirdiği bildirilmiştir (125). AT1R'nin kronik blokajı ANJ IV üretimini artırır. Aşırı eksprese edilen ANJ IV, AT1R sinyalini aktive edebilir. AT1R bloke edildiğinde ANJ IV, yüksek konsantrasyonda bile, yalnızca AT4R reseptörlerine bağlanır. ANJ IV/AT4R sinyali, AT2R'leri aktive etmek üzere bağlanacak ANJ III konsantrasyonunu, anti-inflamatuar etkiler göstermek üzere nitrik oksiti artırır ve sinaptik iletimi ile uzun dönem hafıza oluşumunu geliştirir (126).

ADE'nin perindopril gibi santral sinir sistemini etkileyen inhibitörlerle inhibisyonu, Alzheimer hastalığı hayvan modellerinde bilişsel bozukluğu azaltmıştır. ADE inhibisyonu ile kognisyondaki iyileşmenin mekanizması; ADE ve dopaminerjik nörotransmisyon arasındaki etkileşim, asetilkolinesteraz aktivitesi ve ekspresyonunun azaltılması, serebral kan akışının artması, oksidatif ve nitratif stresin azalması, amiloid beta birikiminin azalması veya bu faktörlerin bir kombinasyonu gibi birden fazla faktörle açıklanabilir (127). Çeşitli çalışmalar, kandesartan da dahil olmak üzere ARB'lerin etkilerine AT1R'nin bloke edilmesinin aracılık ettiğini ve bunun da AT2R'ye bağlanabilen bağlanmamış ANJ II miktarının artması nedeniyle AT2R'nin aktivasyonuna yol açtığını göstermiştir (128). Başka bir çalışmada, AT2R'nin doğrudan uyarılması uzamsal hafızayı geliştirmiş ve bir Alzheimer hastalığı modeli deneyinde ICV Amiloid Beta (1-40) enjeksiyonundan sonra bilişsel gerilemeyi önlemiştir (129).

#### **2.2.6. Beyinde bulunan renin anjiyotensin sisteminin opioidler ile ilişkisi**

Beyindeki ve periferdeki RAS ile endojen opioidler arasında önemli pozitif ve negatif etkileşimler bulunmaktadır (117). ANJ II'nin analjezik, hormonal ve kardiyovasküler etkilerine indirekt olarak endojen opioidlerin salınımı aracılık ederken (130, 131), opioidlerin de RAS bileşenlerini aktive ettiği gösterilmiştir (132, 133). Preklinik ve klinik çalışmalarda ADE inhibitörü ve opioidler birlikte kullanıldığında opioidlerin etkinliğinin

arttığı gösterilmiştir (134). ADE inhibitörü olan kaptopril ile sıçanlarda yapılan bir çalışmada, kaptoprilin olası inflamasyon yollarını inhibe ederek antinosiseptik özellik gösterdiği, morfinin analjezik etkisini artırdığı ve tekrarlayan morfin uygulamasına karşı tolerans gelişimini engellediği bildirilmiştir (135). Buna zıt olarak, RAS ile opioid sistemi arasında negatif bir ilişki olduğunu öne süren raporlar da mevcuttur. Bazı araştırmalar ANJ II'nin opioidlerin etkilerini azaltmak için anti-opioid peptit görevi gördüğü fikrini desteklemektedir (136, 137). Ayrıca, anjiyotensin salınımında ve işleyişinde endojen opioidlerin bazal inhibitör etkisi olabileceği ve normal koşullarda RAS'ın aşırı aktivasyonunu önleyebileceği, opioid agonistlerin bazı etkilerini anjiyotensin reseptörlerini bloke ederek üretebileceği öne sürülmüştür (138, 139). ADE inhibitörlerinin opioidlerle birlikte uygulanması, muhtemelen opioidlerin metabolizmasının azalmasına bağlı olarak etkilerinin güçlenmesine yol açabilir (134).

#### **2.2.7. Beyinde bulunan renin anjiyotensin sisteminin bağımlılık ile ilişkisi**

RAS'ın, ödül sistemi dahil olmak üzere beyin fonksiyonlarının fizyolojisi için çok önemli olduğu düşünülmektedir (140). Son araştırmalar, mezolimbik dopaminerjik ödül sisteminin modülasyonu nedeniyle RAS'ın madde kötüye kullanımı ve bağımlılığının gelişimindeki kritik rollerini vurgulamıştır. Spesifik olarak, ANJ II ve AT1R'nin ekspresyonu, hayvanlarda ve insanlarda VTA dahil olmak üzere DAerjik beyin ödül bölgeleri ile ilişkilidir (141). ADE1, DA reseptörlerinin aktivasyonunu kontrol ederek opioid bağımlılığının patofizyolojisine kapı açarken, ANJ II, DA sentezini uyarır ve oksidatif stresin indüklenmesi yoluyla rodent beyinlerinde veya nöronal kültürlerde DAerjik hücre ölümünü veya dejenerasyonunu şiddetlendirir (92).

ADE1/ANJ II/AT1R eksenini, alkol tüketiminin düzenlenmesinde ve alkol bağımlılığında da yer almaktadır. Beyin ANJ II-AT1R sinyalinin aktivasyonu, rodentlerde yüksek alkol tüketimine katkıda bulunur, oysa ADE1 inhibitörleri veya AT1R antagonistleri, kompulsif alkol alımında önemli azalmaya neden olur. Bununla birlikte, beyin ANJ II tarafından uygulanan eylemler ANJ 1-7 tarafından zıt şekilde düzenlenir ve bu etkileşim oksidatif durumun modülasyonunda yer alır (142). Ayrıca, ANJ 1-7 oluşumunda hız sınırlayıcı enzim olan ADE2'nin ve ANJ 1-7 reseptörü olan MasR'nin

ekspresyonu, bol miktarda DAerjik nöron içeren ve DAerjik sistem üzerinde nöroprotektif etkiler sergileyen VTA dahil mezolimbik bölgelerde gözlenmektedir (118). Başka bir çalışmada, ADE2 düzensizliğinin beyinde artan oksidatif strese katkıda bulunduğu ve bu nedenle DAerjik nöronların nörodejenerasyonunda önemli bir rol oynadığı gösterilmiştir (102).

Psikoaktif maddelerin alımı beyin RAS'ının homeostazını da değiştirebilir. Örneğin nikotin ile tedavi, nöronlarda ve glial hücrelerde AT1R'nin upregülasyonuna ve ADE2'nin downregülasyonuna yol açmıştır (143). Kokain içeren hayvan deneylerinde, ADE1'in ekspresyonu ve aktivitesinin sıçan striatumu ve frontal kortekste önemli ölçüde arttığı bulunmuştur (144). Toluene kronik maruz kalma, bağımlılığın bir göstergesi olan lokomotor duyarlılığını önemli ölçüde artırırken ADE1 inhibitörü kaptopril veya AT1R antagonisti losartan uygulaması, NAc'de ANJ (1-7)/ANJ II oranını artırarak davranışsal yanıtı azaltmıştır (145). Amfetamine maruz kalan rodentlerde de RAS düzensizlikleri bildirilmiştir (146). İki şişe tercihlilik alkol bağımlılık modelinde *Sardinian alcohol preferring* sıçanlarla yapılan bir çalışmada ICV uygulanan telmisartan enjeksiyonunun sıçanların alkol tüketimini, NAc bölgesindeki dopamin miktarını değiştirmeden azalttığı gösterilmiştir (24). Sprague-Dawley sıçanlarda yapılan iki şişe seçimine aralıklı erişim paradigması kullanılarak oluşturulan volunter yüksek alkol tüketimi modelinde, aşırı alkol alımı, oksidatif stresi indükleyerek RAS homeostazında önemli bozulmalara yol açmıştır. RAS dengesizliği volunter alkol tüketimini indüklemiş ve oksidatif stress ile DA birikimini tetikleyerek orta dereceden aşırı alkol tüketimine geçişe aracılık etmiştir, bu da alkolizm ve alkol bağımlılığının etiyopatogenezinde RAS dengesizliği ve oksidatif stresin kısır döngüsünü ortaya koymuştur. Bu çalışmada ADE1 inhibitörü ve ANJ 1-7 kullanarak RAS homeostazının düzenlenmesi, içme ve bağımlılık davranışlarını önemli ölçüde azaltmıştır (147). Bununla birlikte, iki karşı düzenleyici RAS kolunun, alkol bağımlılığı gibi madde kullanım bozukluklarının gelişimindeki bütünleştirici rolleri açıklığa kavuşturulmayı beklemektedir.

### **2.2.8. Morfin yoksunluğu sendromunda renin anjiyotensin sistemi**

Morfin yoksunluğunda beyin RAS sisteminin araştırıldığı çalışma sayısı oldukça azdır ve olası etkileşim mekanizmalarını ortaya çıkarmak açısından yetersiz kalmaktadır. VTA'ya yapılan ANJ II ve kaptopril enjeksiyonunun sıçanlarda morfinin kendi kendine uygulanması modelinde etkilerinin incelendiği bir çalışmada, ANJ II grubunda, aktif kola basma sayısı morfin grubuna göre anlamlı olarak düşük bulunmuştur. Bu çalışma, VTA'da ANJ II ile opioid sistemi arasındaki olası etkileşimi öne sürmektedir (21). NAc'e kaptopril uygulanan başka bir çalışmada da aktif kola basma morfin grubundan anlamlı olarak düşük bulunmuştur (22). ICV verilen kaptopril ve ANJ II'nin morfinle indüklenmiş koşullu yer tercihi ve morfin yoksunluğu modelinde etkilerinin incelendiği bir diğer çalışmada ise ICV kaptopril uygulamasının naloksonla indüklenmiş yoksunluk semptomlarını azalttığı ve ANJ II'nin bir önceki çalışmanın aksine yoksunluk semptomlarını artırdığı bildirilmiştir (23).

### **2.2.9. Anjiyotensin dönüştürücü enzim inhibitörlerinden kaptopril**

Kaptopril; hipertansiyon, miyokard enfarktüsü sonrası sol ventrikül disfonksiyonu ve diyabetik nefropati tedavisinde kullanılan FDA onaylı bir ilaçtır. Endikasyon dışı kullanım alanları arasında akut hipertansif kriz ve Raynaud fenomeni yer almaktadır. Kaptopril ADE'yi inhibe ederek ANJ II seviyelerini azaltır ve RAS'ı baskılar, ayrıca KBB'yi geçebilir (9). ADE ayrıca vazodilatasyona neden olan bir peptid olan bradikininin de metabolize eder. Bu nedenle ADE inhibitörleri bradikinin parçalanmasını engelleyerek vazodilatasyona ve bradikinin kaynaklı öksürüğe neden olabilir. Bu da klinikte en sık karşılaşılan ilaç değiştirme nedenlerinden biridir, genelde ADE inhibitörü tedavisi kesilerek hastaya ARB başlanır (148).

### **2.2.10. Anjiyotensin reseptör blokörlerinden telmisartan**

Telmisartan hipertansiyon tedavisinde kullanılan, ARB ailesine ait bir ilaç türüdür. 1991 yılında çalışmalarına başlanıp, 1999 yılından itibaren kullanılan ve günümüzde de oldukça sık reçete edilen telmisartanın temel mekanizması AT1R'i bloke ederek vasodilatasyon

sağlayıp aldosteron sentezini inhibe ederek kan basıncını düşürmektir. Bu mekanizması sebebiyle inme, koroner arter hastalığı, böbrek yetmezliği gibi hastalıkların meydana gelme olasılığını azaltır (149).

Telmisartan oldukça lipofilik olması nedeniyle KBB'yi geçebilmektedir (9). ARB'ler içerisinde en güçlü PPAR $\gamma$  aktivatörü olan telmisartanın, in vitro çalışmalarda oligodendrositleri koruduğu, beyin dokusunda inflamasyonu azaltarak Alzheimer, vasküler demans ve stroke sonrası demansta kognitif düzelme sağladığı gösterilmiştir (10). Son zamanlarda yapılan bir çalışmada telmisartanın Sardinian alcohol-preferring sıçanların alkol yoksunluğu bulgularını ve alkol alma tercihlerini yeme içme davranışlarını etkilemeden azalttığı, ayrıca çalışmada telmisartanın bu etkisini dopamin düzeyini değiştirmeden yaptığı gösterilmiştir (24). Alkol bağımlılığı ve RAS ile ilgili sıçanlarda yapılan en son çalışmaya göre ise aşırı alkol alımının VTA'da oksidatif stres yoluyla RAS dengesizliğine neden olduğu; kaptopril, ADE 2 aktivatörleri veya ANJ 1-7 mimetikleri kullanılarak RAS dengesizliğinin iyileştirildiği ve oksidatif stres kısır döngüsünün kırıldığı bildirilmiştir. Yazarlar bağımlılıkla mücadele için KBB'yi geçen antioksidan RAS modülatörlerinin kullanımını umut verici olarak ifade etmişlerdir (147). Yapılan prelinik çalışmalar ADE inhibitörlerinin ve ARB'nin nöroprotektif ve kognitif fonksiyonları iyileştirici etkilerini gösterdiğinden, son yıllarda özellikle hafif veya orta dereceli Alzheimer hastaları ile bu ajanların hastalık progresyonunu azaltıcı etkileri açısından klinik çalışmalar yürütülmektedir (12).

### 3. GEREÇ ve YÖNTEM

Tez çalışması deneylerine başlamadan önce Marmara Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan (MUHDEK) 07.2024mar protokol kodu ile etik kurul onayı alınmıştır (Ek 1).

#### 3.1. Deney Hayvanları

Deneylerde kullanılan 8 ila 10 haftalık ortalama 277,5 g ( $\pm$  23,8 g) ağırlığında 61 adet erkek cinsiyetinde Wistar Albino sıçan Marmara Üniversitesi Deney Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezi ve İstanbul Üniversitesi Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü laboratuvarlarından temin edildi. Deneyler Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı laboratuvarlarında gerçekleştirildi. Hayvanlar 12 saat aydınlık/12 saat karanlık döngüsünün ve % 45 - % 65 arası nem oranının sağlandığı ve sıcaklığın 20 - 24°C'de tutulduğu bu laboratuvarlarda barındırılarak deneysel işlemler bu koşullar altında uygulandı. Çalışma süresince hayvanlar standart sıçan yemi ve çeşme suyu ile *ad libitum* şeklinde beslendi. Deneylere başladıktan sonra her kafeste bir hayvan barındırılması sağlandı.

Çalışmada yalnızca erkek sıçanların kullanılmasının nedeni, morfin yoksunluğunun davranış deneyleriyle belirlenmiş olmasıdır. Dişi sıçanların menstrüel siklusu hayvanların davranışlarını etkilemektedir (150). Ayrıca morfin yoksunluğu semptomlarının erkek sıçanlarda dişi sıçanlara göre daha erken zamanda ve daha şiddetli ortaya çıktığı bildirilmiştir (150, 151).

#### 3.2. Deneyde Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Cihazlar

Çalışmada kullanılan cihazların marka model isimleri, Tablo 3.1'de yer almaktadır. Deneyde yer alan kimyasal malzemelerin marka-model veya ürün kodu isimleri ise Tablo 3.2'de yer almaktadır.

**Tablo 3.1.** Kullanılan cihazlar ve marka-model bilgileri

<b>Kullanılan Cihaz</b>	<b>Marka-Model</b>
Terazi	Ohyo Elektronik Balance MP-300
Soğuk ışık kaynağı	Nikon Optical Fiber light source
Stereotaksi Aleti	Stoelting Model 51600, Stoelting Co., Illinois, USA
Unilateral rehber kanül	Plastics One, C313G/SPC 22 GA
İnternal kanül	Plastics One, C313I/SPC 26 G
<i>Dummy</i> kanül	Plastics One, C313DC/SPC
Sabitleme vidaları	Plastics One, 8LOX3905202F
Çeker Ocak	Laborty Laboratuvar Sistemleri
Elektronik hassas terazi	AND GR-200
Vortex	Janke&Kunkel IKA Labortechnik VF2 SN: 697268
Distile Su Cihazı	Milipore A-10
Polietilen kanül PE 20	Commat LTD, 59-8324
Hamilton mikro enjektörü	Hamilton Company, 25 µL, 22 G
Lokomotor aktivite kafesi	Commat, ACT 508
Etüv	Thermoscientific- Herather Oven
No Frost Buzdolabı (-40°C)	Uğur Derin Dondurucu
Derin Dondurucu (-80°C)	-80 ° Ultra Low Temperature Freezer- New Brunswick U-570

**Tablo 3.2.** Kullanılan malzemeler ve marka-model-kod bilgileri

<b>Kullanılan Malzeme</b>	<b>Marka-Model-Kod</b>
Ketamin	Alfasan, Alfamine %10
Ksilazin	Alfasan, Alfazyne %2
NaCl	Merck, 106404
Dietil eter	Isolab 914.023.2501
DMSO	Supelco, 1.02952
Telmisartan	Sigma-Aldrich, T8949
Kaptopril	Sigma-Aldrich, C4042
Anjiyotensin II	Sigma-Aldrich, A9525
Naloksan hidroklorür dihidrat	Sigma-Aldrich, N7758
Etanol	Sigma-Aldrich, V001229
PBS	Sigma-Aldrich, P4417
Aseton	Isolab 901.026.2500

### **3.3. Deney Gruplarının Oluşturulması ve Deney Protokolü**

Deney grupları sham-kontrol (SK), bağımlı-kontrol (BK), yoksun-kontrol (YK) ve yoksunluk öncesi yapılacak ICV enjeksiyonlara göre anjiyotensin II (ANJ II), kaptopril (KAP), telmisartan (TLM) 33 nM, TLM 100 nM, TLM 300 nM ve TLM kronik (TLM Kr) grup olmak üzere oluşturuldu. Her grupta en az 6 hayvan yer aldı. Deney grupları ve her grupta yer alan hayvan sayısı tabloda belirtilmiştir (Tablo 3.3).

**Tablo 3.3.** Deney grupları ve gruplarda yer alan hayvan sayıları. SK grubu hariç bütün gruplara morfin peleti yerleştirildi. SK grubuna dolgu maddesi içeren pelet yerleştirildi. SK ve BK grubu dışındaki tüm gruplarda i.p. nalokson ile yoksunluk sendromu indüklendi.

Deney grupları	Hayvan Sayıları
SK	6
BK	6
YK	6
ANJ II	7
KAP	7
TLM 33 nM	6
TLM 100 nM	8
TLM 300 nM	8
TLM Kr 33 nM	7
<b>Toplam</b>	<b>61</b>

Tüm sıçanlara deneyin 1. günü stereotaksik cerrahi ile ICV rehber kanül ve 4 sabitleme vidası yerleştirildi. Cerrahi sonrası 1 hafta dinlenmeye bırakılan hayvanlar deneyin 8. gününde 15 dakika süresince bazal lokomotor aktivite kafesine alındılar. Daha sonra sıçanın sırt bölgesi cilt altına eter anestezisi altında 75 mg baz morfin içeren yavaş salımlı 1 pelet (veya kontrol grubunda boş pelet) yerleştirildi. Deneyin 10. gününde ise aynı şekilde 2 pelet subkutan şekilde yerleştirildi (152). Deneyin 12. gününde ise ANJ II grubuna nalokson enjeksiyonundan 5 dk önce ANJ II 1 nM (23), kaptopril grubuna

nalokson uygulamasından 30 dk önce kaptopril 300 µg (23) ve TLM gruplarına nalokson uygulamasından 15 dk önce TLM 33 nM, 100 nM veya 300 nM (24) olacak şekilde ICV yolla enjekte edildi. Doz ve uygulama zamanı ilgili ilaç ile yapılan çalışmalar incelenerek belirlendi. TLM kronik gruba ise deneyin 8.-12. günleri arasında (5 gün boyunca günde 1 kere aynı saatte) ICV yolla 33 nM TLM enjekte edildi. Bu gruba verilen TLM dozu, akut TLM gruplarında yoksunluk sendromu oluşturulduktan sonra sıçrama davranışını en iyi azaltan doz olan 33 nM olarak belirlendi. Kontrol, bağımlılık ve yoksunluk gruplarına ise tedavi maddelerinin çözücüsü kimyasal (%20 DMSO ve distile su karışımı) enjekte edildi.

12. gündeki ICV enjeksiyonlardan sonra yoksunluk modeli oluşturmak amacıyla intraperitoneal (i.p.) 3 mg/kg nalokson (152) veya kontrol/ bağımlı gruplara naloksonun çözücüsü olan SF enjekte edildi ve sıçan 15 dk boyunca yoksunluk davranışlarının gözlemlenmesi amacıyla lokomotor aktivite kafesine bırakıldı. Locomotor aktivite ile eş zamanlı yoksunluk bulguları (sıçrama, ıslak köpek silkinme davranışı, diş gıcırdatma, diyare, defekasyon sayısı, kanlı gözyaşı, titreme, dokununca çığlık atma ve pitozis) gözlemlendi.

Hayvanlar yoksunluk sendromu gözleminden hemen sonra sakrifiye edilerek beyinleri çıkarıldı. Çıkarılan beyinlerden protokole uygun olarak PFC ve NAc bölgeleri ayrıştırıldı (153, 154). Çıkarılan bu bölgeler eppendorflara alınarak -80 derecedeki dolaba kaldırıldı. Deney protokolü ve hayvanlara yapılacak işlemler tabloda verilmiştir (Tablo 3.4 ve 3.5).

**Tablo 3.4.** Deney grupları ve deney protokolü (1.-5. Grup)

<b>Deney Günleri</b>	<b>1. Kontrol</b>	<b>2. Bağımlı</b>	<b>3. Yoksun</b>	<b>4. ANJ II</b>	<b>5. Kaptopril</b>
<b>1</b>	Stereotaksik cerrahi ile ICV kanül yerleştirilmesi				
<b>8</b>	LMA 15 dk 1 boş pelet	LMA 15 dk 1 morfin peleti			
<b>9</b>					
<b>10</b>	2 boş pelet	2 morfin peleti			
<b>11</b>					
<b>12</b>	Çözücü ICV enjeksiyon	Çözücü ICV enjeksiyon	Çözücü ICV enjeksiyon	ANJ II 1 nM ICV enjeksiyon (nalokson uygulamasında n 5 dk önce)	Kaptopril 300 µg ICV enjeksiyon (nalokson uygulamasında n 30 dk önce)
	i.p. Serum fizyolojik (SF)	i.p. SF	3 mg/kg i.p. nalokson ile yoksunluk	3 mg/kg i.p. nalokson ile yoksunluk	3 mg/kg i.p. nalokson ile yoksunluk
	LMA 15 dk				
	Sakrifikasyon ve beyin çıkarılarak dondurulması				

**Tablo 3.5.** Deney grupları ve deney protokolü (6.-9. Grup)

<b>Deney Günleri</b>	<b>6. TLM 33 nM</b>	<b>7. TLM 100 nM</b>	<b>8. TLM 300 nM</b>	<b>9. TLM kronik</b>
<b>1</b>	Stereotaksik cerrahi ile ICV kanül yerleştirilmesi			
<b>8</b>	LMA 15 dk 1 morfin peleti			LMA 15 dk 1 morfin peleti  TLM 33 nM ICV enjeksiyon
<b>9</b>				TLM 33 nM ICV enjeksiyon
<b>10</b>	2 morfin peleti			TLM 33 nM ICV enjeksiyon
<b>11</b>				TLM 33 nM ICV enjeksiyon
<b>12</b>	TLM 33 nM ICV enjeksiyon (nalokson uygulamasından 15 dk önce)	TLM 100 nM ICV enjeksiyon (nalokson uygulamasından 15 dk önce)	TLM 300 nM ICV enjeksiyon (nalokson uygulamasından 15 dk önce)	TLM 33 nM ICV enjeksiyon (nalokson uygulamasından 15 dk önce)
	3 mg/kg i.p. nalokson ile yoksunluk			
	LMA 15 dk			
	Sakrifikasyon ve beyin çıkarılarak dondurulması			

### **3.4. Stereotaksik Cerrahi**

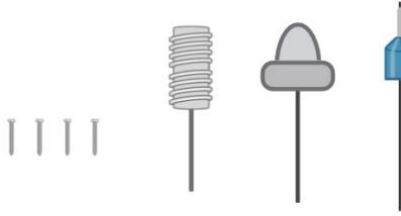
ICV enjeksiyonları gerçekleştirmek amacıyla tüm sıçanlara deneyin 1. günü stereotaksik cerrahi yöntemi ile unilateral rehber kanül yerleştirildi. Ağırlıkları ölçüldükten sonra ketamin 100 mg/kg ve ksilazin 10 mg/kg anestezi kokteyli ile i.p. enjeksiyon verilerek

uyutulan sıçanların genel anestezi durumları ekstremitte kısıtma yöntemi ile kontrol edildi. Hayvanların anestezi altında olduklarına emin olunduktan sonra cerrahi öncesi temiz alan oluşturmak amacıyla gözleri ve kulaklarının arasındaki tüyler tıraş makinesi ile kısaltıldı. Sıçan kafatası stereotaksi aletine dış kulak yolundan bilateral şekilde sabitlendi (Şekil 3.1). Kafa derisi gözlerin hemen altından enseye kadar povidon iyot antiseptik solüsyonu silindikten sonra longitudinal şekilde kesi atıldı. Periost ince bir bistüri yardımıyla sıyrılarak kafatası üzerindeki bregma ve lambda noktaları açığa çıkartıldı.

Takılacak olan rehber kanül sıçanın kafatasına toz ve sıvı dental akrilik ile sabitlenmelidir. Bu nedenle dental akriliğin yüzey alanının artırılması ve kanülün daha sağlam tutunması için sağ frontal, sol frontal, sağ arka parietal ve sol arka parietal kemiklere 4 adet sabitleme vidası yerleştirildi. ICV koordinatları için Paxinos ve Watson sıçan stereotaksi atlasına bakıldı (154), bregmadan 1.0 mm anterior; sagittal suturedan 1.5 mm lateral ve vertikalde dura mater yüzeyinden 3.6 mm derinde olacak şekilde sağ lateral ventrikülün yaklaşık koordinatı tespit edilerek bir rehber kanül yerleştirildi. Kanül ve vidalar dental akrilik ile sabitlendi. Akrilik kuruyup sertleştiğinde hayvan cihazdan alınarak uyanmaya bırakıldı. *Dummy* kanül, rehber kanülün tıkanmasını ve enfekte olmasını engelleyen koruyucu bir kapak görevi görmektedir. Cerrahiden sonra rehber kanül üzerine *dummy* kanül takıldı (Şekil 3.2). Cerrahi sonrası sıvı kayıplarını önlemek için hayvanlara 2 ml serum fizyolojik (SF) subkutan enjekte edildi. Cerrahi sonrası ayrı kafeslere alınan hayvanlar 1 hafta dinlenmeye bırakıldı ve bu bir hafta içerisinde kilo, davranış ve olası enfeksiyon bulguları açısından takip edildi.



**Şekil 3.1.** Stereotaksi cihazı (solda), stereotaksi cihazı içerisine sabitleme (sağda)



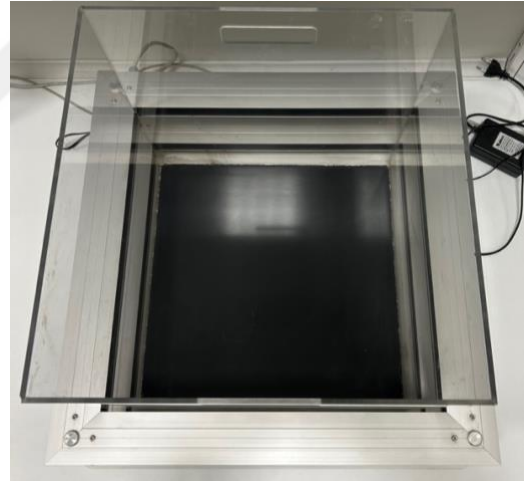
**Şekil 3.2.** Soldan sağa sabitleme vidaları, rehber kanül, *dummy* kanül, internal kanül (www.biorender.com'da hazırlanmıştır).

### **3.5. Lokomotor Aktivite Kafesi Testi**

Lokomotor aktivite testi (LMA), açık alanda sıçan davranışlarını izleme testlerinden biridir. Deneysel hayvan modellerinde lokomotor ve davranışsal aktivite seviyelerini kapsamlı bir şekilde incelemeye olanak tanır (Şekil 3.3). Lokomotor aktivite kafesinin içerisinde bulunan yatay ve dikey hareket algılayıcıları sayesinde sıçanın konumu ve yer değişiklikleri kafesin kendi yazılım programına (AMS 9701, Commat Ltd.) kaydedilmektedir. Lokomotor aktivite kafesinden elde edilen sinyal verileri ayrıca Microsoft Office Excel dosyası olarak çıktıya dönüştürülebilir. Bu çıktıdan elde

edilebilecek veriler; stereotipik, vertikal, ambulatuvar ve horizontal aktivite (sayı), stereotipik, vertikal ve ambulatuvar aktivite süresi (sn), hareketsiz geçirdiği süre (sn), stereotipik, ambulatuvar ve hareketsiz geçirdiği süre yüzdesi (%) ve kat edilen toplam mesafe (cm)'dir. Ambulatuvar aktivite sıçanın hareketli olduğu dönemleri temsil eder.

Deneyin 8. gününde, hayvanlar 30 dakika boyunca davranış testinin yapılacağı odaya alıştırdıldıktan sonra 40x40x40 cm boyutundaki lokomotor aktivite kafesine alınarak 15 dk boyunca kayıt alındı. Locomotor aktivite ölçümlerinin hayvanların aktif olduğu dönem olan sabah saatlerinde (08:00-12:00) yapılmasına dikkat edildi. Deneyin 12. gününde nalokson verilerek yoksunluk sendromu geliştirilen hayvanlar yine lokomotor aktivite kafesi içerisinde 15 dk boyunca gözlemlenerek davranışları kayıt altına alındı.



**Şekil 3.3.** Locomotor aktivite kafesi

### **3.6. Morfin Bağımlılığı Oluşturma**

Morfin bağımlılığı modeli; bağımlı, yoksun ve tedavi gruplarına (ANJ II, kaptopril ve telmisartan verilen gruplar) 75 mg yavaş salımlı baz morfin içeren peletlerin deneylerin 8. ve 10. günlerinde sırasıyla 1 ve 2 adet olacak şekilde yerleştirilmesiyle oluşturuldu. Kontrol grubuna ise 75 mg baz morfin peletine benzer ölçülerde, dolgu maddesinden oluşturulmuş boş pelet yerleştirildi.

Morfin peleti yerleştirme işlemini gerçekleştirmek için sıçan önce çeker ocak altında hafif eter anestezisi ile anestezisi uygulamak için cam fanusa alındı. Yeterli anestezisi

sağlandıktan sonra fanustan çıkarıldı. İşlem sırasında hayvan dikkatli bir şekilde takip edildi, anestezinin devamı için; gerektiğinde burnuna eter damlatılmış gazlı bezin yer aldığı küçük bir beher yaklaştırılarak anestezisi idamesi sağlandı. Hafif eter anestezisi altındaki sıçanın sırt kısmı cerrahi makas ile yaklaşık 1 cm kesildi, kesi içi diseksiyon pensi ile genişletildi. Morfin içeren yavaş salınımlı pelet penset yardımıyla tutularak kesiden cilt altına yerleştirildi daha sonra kesi suture edilerek kapatıldı.

### 3.7. Çözelti Hazırlama ve Mikroenjeksiyon

Deneyin 12. gününde ANJ II, kaptopril ve TLM gruplarına yoksunluk sendromu oluşturulması öncesi enjeksiyon yapıldı. Bir nM içeren ANJ II çözeltisinden 5 µl hacimde verebilmek için 1 mg ANJ II (Sigma-Aldrich, A9525) tartıldı, 200 µl DMSO (Supelco, 1.02952) içerisinde çözüldü, içerisine 800 µl distile su eklendi ve 1 milimolar çözelti elde edildi. Daha sonra distile su ile 1 nM olacak şekilde seyreltildi. -20°C'de saklandı. Kaptopril ise 5 µl çözeltide 300 µg verilecek şekilde planlandı. Önce 60 mg kaptopril (Sigma-Aldrich, C4042) hassas terazide tartıldı, 200 µl DMSO (Supelco, 1.02952) içerisinde çözüldü, içerisine 800 µl distile su eklenerek vortekslendi. Oda sıcaklığında saklandı.

TLM çözeltisi hazırlanırken 0.5 mg TLM (Sigma-Aldrich, T8949100) 100 µl DMSO (Supelco, 1.02952) içerisinde hafif ısıtılarak çözüldü, üzerine 100 ml hacime ulaşacak şekilde distile su eklendi ve 10µM çözelti elde edildi. Bu çözelti distile su ile 1/33 oranında seyreltilerek 300 nM TLM çözeltisi, yüzde bir oranında seyreltilerek 100 nM TLM çözeltisi elde edildi. 33 nM çözelti elde etmek için 100 nM TLM çözeltisi üçte bir oranında distile su ile seyreltildi.

Nalokson ile yoksunluk sendromu oluşturulmadan 5 dk önce ANJ II grubuna 1 nM, kaptopril grubuna nalokson uygulamasından 30 dk önce kaptopril 300 µg ve TLM gruplarına da nalokson uygulamasından 15 dk önce dozuna göre (TLM 33 nM, 100 nM veya 300 nM) ICV enjeksiyon yapıldı. Kontrol, bağımlı ve yoksun gruplarına ise TLM 100 nM çözeltisindeki oranlarda hazırlanmış DMSO (Supelco, 1.02952) ve distile su karışımı uygulandı. Bütün gruplara başına ve sonuna 2 µl hava çekilmiş 5µl hacimde çözelti, Hamilton mikroenjektörü ile ICV rehber kanüle polietilen tübe sabitlenmiş

internal kanüller aracılığıyla 1 dk içerisinde enjekte edildi. Enjeksiyon bitiminde internal kanülün rehber kanül içerisinde 15 sn daha kalması beklendi. Daha sonra rehber kanül *dummy* kanül ile kapatıldı.

Kronik TLM enjeksiyonu yapılan gruba ise deneyin 8. ve 12. günleri arasında (5 gün boyunca) günün aynı saatlerinde olacak şekilde TLM 33 nM çözeltisinden ICV enjeksiyon yapıldı.

### **3.8. Yoksunluk Sendromu Oluşturma**

Yoksunluk sendromu yoksun ve tedavi gruplarında (ANJ II, kaptopril ve TLM grupları) nalokson enjeksiyonu ile oluşturuldu. Bu gruplarda ilk morfin peletinin yerleştirilmesinden 48 saat sonra 2 morfin peleti yerleştirilmişti. İki pelet yerleştirilmesinden 48 saat sonra ise (deneyin 12.gününde) 3 mg/kg nalokson i.p. enjeksiyonu ile yoksunluk sendromu tetiklendi. Yoksunluk sendromu oluşturulmadan önce tüm sıçanların ağırlığı ölçüldü. SF’te çözülerek hazırlanan nalokson sıçanlara ağırlıkları oranında enjekte edildi. Hemen ardından lokomotor aktivite kafesine konarak hem lokomotor aktivite testi hem de yoksunluk sendromu bulgularının gözlemi yapıldı. Yoksunluk sendromu bulguları 15 dk boyunca (sıçrama sayısı, ıslak köpek silkinmesi, defekasyon numarası, tremor sayısı, diyare skoru (0-3, 3 en yüksek), dış gıcırdatma skoru (0-10, 10 en yüksek), pitozis skoru (0-3, 3 en yüksek), kanlı gözyaşı varlığı, dokununca çığlık atma ve ağırlık kaybı olarak değerlendirilerek her hayvan için tablo halinde kaydedildi (Tablo 3.6). Sakrifikasyondan hemen önce hayvanların ağırlığı tekrar ölçüldü ve ağırlık kaybı hesaplandı.

**Tablo 3.6.** Yoksunluk bulguları (152)

<b>Semptomlar</b>	<b>Hayvan no:</b>	<b>Hayvan no:</b>	<b>Hayvan no:</b>
<b>Tarih</b>			
<b>Verilen tedavi</b>			
<b>Ağırlık (g)</b>			
<b>Sıçrama sayısı</b>			
<b>Islak köpek sayısı</b>			
<b>Defekasyon sayısı</b>			
<b>Tremor sayısı</b>			
<b>Diare skoru (0-3)</b>			
<b>Diş gıcırdatma skoru (0-10)</b>			
<b>Pitozis skoru (0-3)</b>			
<b>Kanlı gözyaşı</b>			
<b>Dokununca çılgılık atma</b>			
<b>Ağırlık kaybı</b>			
<b>Not:</b>			

### **3.9. Sakrifikasyon ve Beyin Bölgelerinin Diseksiyonu**

Yoksunluk sendromu oluşturulmasını takiben semptomların 15 dk gözlemlenmesinden sonra hayvanlar karbondioksit ötenazisi ile sakrifiye edildi. Dekapite edildikten sonra cerrahi ronjur yardımıyla hızlıca çıkarılan beyinler +4°C sıcaklıktaki 0.1 M PBS (Sigma-Aldrich, P4417) çözeltisinde, küçük bir beher içerisinde yıkandı. Daha sonra beyinler, üniversitemiz Tıp Fakültesi Temel Bilimler binasında yer alan Genetik ve Metabolik Hastalıklar Araştırma ve Uygulama Merkezi (GEMHAM)'da bulunan Sıvı Kromatografi Hibrid Quadrupole Kütle Spektrometresi (LC-MS/MS, AB Sciex 4000 QTRAP) cihazında beyin bölgelerinden miktar tayini yapılmak üzere diseksiyona alındı. Tüm beyinlerden PFC ve NAc bölgeleri çıkarılarak LC/MS-MS cihazı ile DA, NA ve

metabolitlerinin 3,4-Dihidroksifenil asetik asit (DOPAC), homovanilik asit (HVA) ve vanilmandelik asit (VMA) bakılması planlandı. DOPAC ve HVA dopamin metabolizmasında, VMA ise noradrenalin ve adrenalinin metabolizmasında yer almaktadır. Bu analiz ile beyin RAS modülasyonunun naloksonla indüklenen morfin yoksunluk sendromunda DA ve NA salınımı ve metabolizmasına etkisinin açıklanması planlandı.

PFC diseksiyonu için beyin ön kısmından 2 mm'lik bir kesit bir bistüri yardımıyla kesildi ve eppendorfa yerleştirildi. Daha sonra yine anterior taraftan 2 mm'lik bir koronal kesit alınarak ayrıştırıldı. Devamında alınan 4 mm'lik koronal bölüm soğuk cam bir plaka üzerine yerleştirilerek dört bir yanından 2 mm kesildi. Elde edilen NA ayrı bir eppendorfa konuldu. Beynin kalan kısmı ise ayrıca bir alüminyum folyo içerisine saklandı. Tüm beyin bölgeleri, üzerine sıçan isimleri yazılarak ayrı bir şekilde -80 derecedeki dolaba kaldırıldı (153, 154). LC-MS/MS cihazı ile ilgili gelişen teknik sorunlar ve tez süresinin dolması nedeniyle bu tez çalışmasına sadece davranış deneylerinin bulguları dahil edilmiştir.

### **3.10. Veri Analizi**

Deney gruplarından elde edilen veriler ortalama  $\pm$  standart hata olarak verildi. Verilerin düzenlenmesi ve tüm istatistiksel analizler GraphPad Prism 8 yazılımı ve Microsoft Office Excel programı kullanılarak analiz edildi. Yoksunluk bulguları arasından parametrik test koşullarını sağlayan sıçrama sayısı, ağırlık kaybı yüzdesi ve lokomotor aktivite bulguları içerisinden stereotipik davranışlar, vertikal, ambulatuvar hareketler ile kat edilen mesafe; gruplar arası tek yönlü varyans analizi ANOVA ve post hoc Tukey yöntemi kullanılarak analiz edildi. Parametrik test koşullarını sağlamayan yoksunluk bulgularından ıslak köpek silkinmesi ise Kruskal-Wallis testi ile değerlendirildi. Gruplar arası yapılan karşılaştırmalarda  $p < 0.05$  anlamlılık düzeyi olarak kabul edildi.

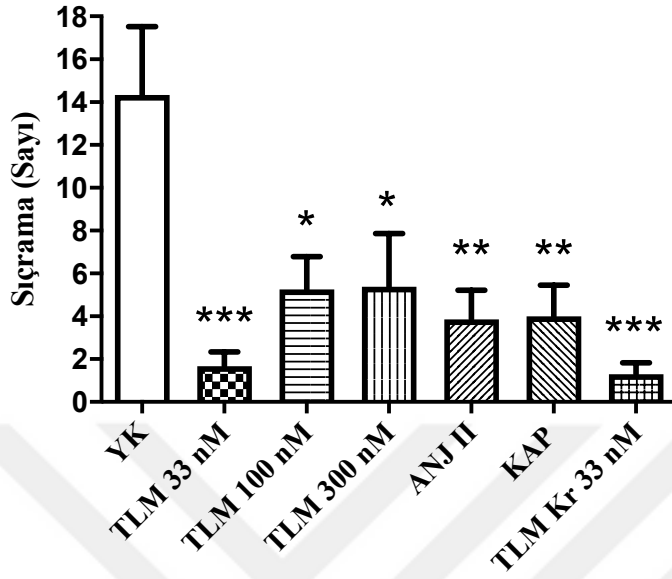
## 4. BULGULAR

### 4.1. Telmisartan, Kaptopril ve Anjiyotensin II'in Yoksunluk Bulgularına Etkisi

Yoksun-kontrol (YK) (n=6), Telmisartan (TLM) 33 nM (n=6), TLM 100 nM (n=8), TLM 300 nM (n=8), Anjiyotensin II (ANJ II) (n=7), Kaptopril (KAP) (n=7) ve TLM Kr 33 nM (n=7) gruplarındaki sıçanlarda morfin bağımlılığı geliştirilerek, deneyin 12. günü i.p. naloksonla (3mg/kg) indüklenen yoksunluk belirtileri izlendi.

#### 4.1.1. Telmisartan, kaptopril ve anjiyotensin II'nin yoksunluk sendromunda görülen sıçrama sayısı üzerine etkisi

Nalokson uygulamasından sonra YK grubunda  $14,3 \pm 3,1$  olarak izlenen sıçrama sayısı TLM 33 nM grubunda  $1,6 \pm 0,6$ ; TLM 100 nM grubunda  $5,2 \pm 1,5$ ; TLM 300 nM grubunda  $5,3 \pm 2,5$ ; ANJ II grubunda  $3,8 \pm 1,3$ ; KAP grubunda  $4 \pm 1,4$  ve TLM Kr 33 nM grubunda  $1,2 \pm 0,5$  olarak bulunmuştur. Sıçrama sayısında izlenen bu azalma istatistiksel olarak anlamlıdır ( $p=0,0006$ ;  $F=5$ ; Şekil 4.1).

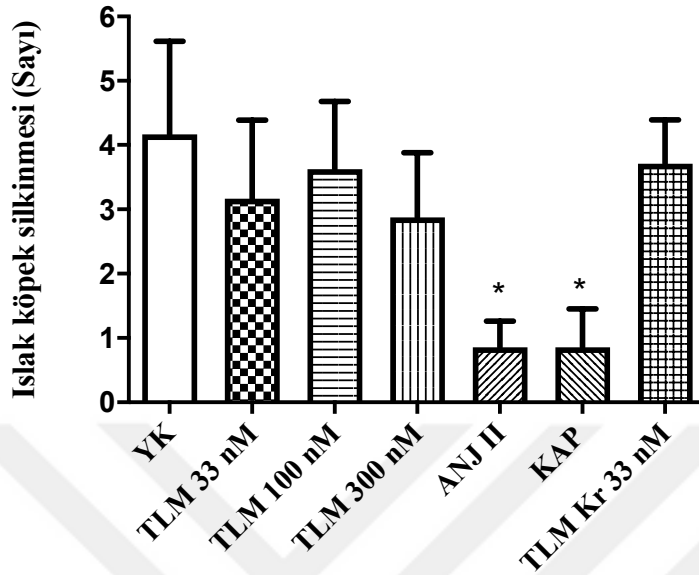


**Şekil 4.1.** YK (n=6), TLM 33 nM (n=6), TLM 100 nM (n=8), TLM 300 nM (n=8), ANJ II (n=7), KAP (n=7) ve TLM Kr 33 nM (n=7) gruplarındaki sıçanlara *unilateral* ICV enjeksiyon ile uygulanan tedavilerin morfin yoksunluk sendromunda görülen sıçrama sayısı üzerine etkisi. Kontrol grubunda (YK; n=6) aynı hacimde çözücü sıvı uygulanmıştır. Veriler ortalama  $\pm$  standart hata şeklinde verilmiştir.

\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  \*\*\* $p < 0,001$  YK grubuna göre

#### **4.1.2. Telmisartan, kaptopril ve anjiyotensin II'nin yoksunluk sendromunda görülen ıslak köpek silkinmesi üzerine etkisi**

Nalokson uygulamasından sonra YK grubunda  $4,1 \pm 1,4$  olarak bulunan ıslak köpek silkinmesi sayısı TLM 33 nM grubunda  $3,1 \pm 1,2$ ; TLM 100 nM grubunda  $3,6 \pm 1$ ; TLM 300 nM grubunda  $2,8 \pm 1$ ; ANJ II grubunda  $0,8 \pm 0,4$ ; KAP grubunda  $0,8 \pm 0,6$  ve TLM Kr 33 nM grubunda  $3,7 \pm 0,6$  olarak azalmıştır. Bu azalma ANJ II ve KAP gruplarında istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ( $p=0,03$ ;  $H=13,4$ ; Şekil 4.2).



**Şekil 4.2.** YK (n=6), TLM 33 nM (n=6), TLM 100 nM (n=8), TLM 300 nM (n=8), ANJ II (n=7), KAP (n=7) ve TLM Kr 33 nM (n=7) gruplarındaki sıçanlara *unilateral* ICV enjeksiyon ile uygulanan tedavilerin morfin yoksunluk sendromunda görülen ıslak köpek silkinmesi sayısı üzerine etkisi. Kontrol grubunda (YK; n=6) aynı hacimde çözücü sıvı uygulanmıştır. Veriler ortalama  $\pm$  standart hata olarak verilmektedir.

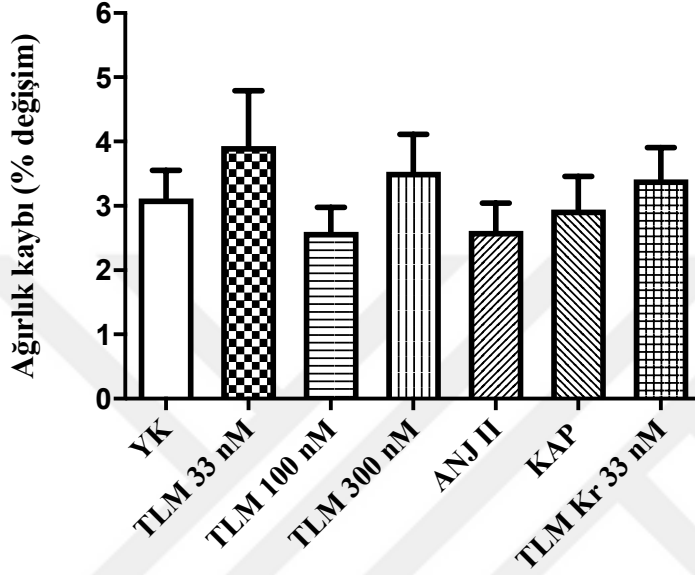
\*p<0,05 YK grubuna göre

#### **4.1.3. Telmisartan, kaptopril ve anjiyotensin II'nin naloksonla indüklenen morfin yoksunluk sendromunda görülen ağırlık kaybı üzerine etkisi**

Ağırlık kaybı yüzde değişimi, yoksunluk sendromu oluşturulduktan sonra ölçülen ağırlık ile yoksunluk sendromu oluşturulmadan önce ölçülen ağırlıklar arasındaki farkın yoksunluk sendromu oluşturulmadan önce ölçülen ağırlığa oranlanmasıyla yüzde şeklinde hesaplandı.

Nalokson uygulamasını takiben YK grubunda  $3,1 \pm 0,4$  olarak bulunan ağırlık kaybı yüzde değişimi TLM 33 nM grubunda  $3,9 \pm 0,8$ ; TLM 100 nM grubunda  $2,6 \pm 0,4$ ; TLM 300 nM grubunda  $3,5 \pm 0,6$ ; ANJ II grubunda  $2,6 \pm 0,4$ ; KAP grubunda  $2,9 \pm 0,5$  ve TLM

Kr 33 nM grubunda  $3,4 \pm 0,5$  olarak bulunmuştur. Bu değişimler istatistiksel olarak anlamlı değildir ( $p=0,5$ ;  $F=0,8$ ; Şekil 4.3).



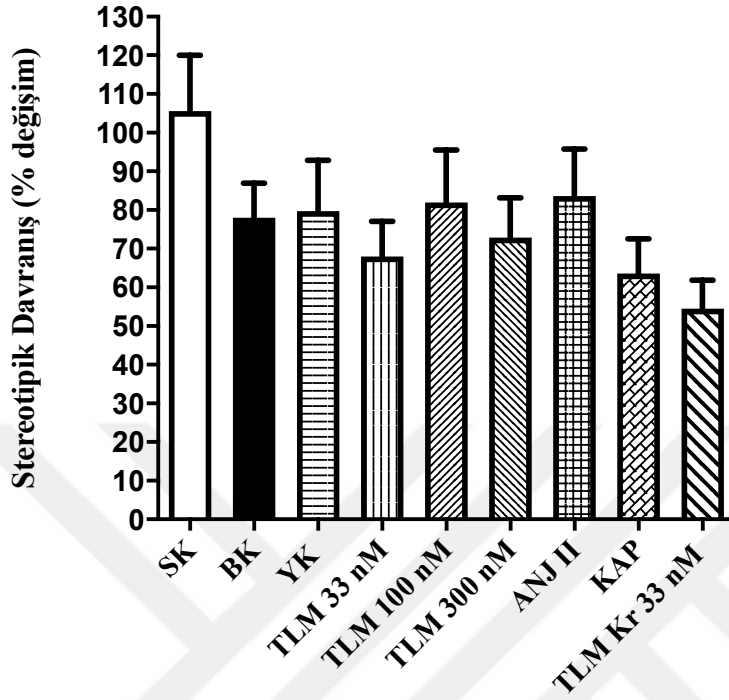
**Şekil 4.3.** YK (n=6), TLM 33 nM (n=6), TLM 100 nM (n=8), TLM 300 nM (n=8), ANJ II (n=7), KAP (n=7) ve TLM Kr 33 nM (n=7) gruplarındaki sıçanlara *unilateral* ICV enjeksiyon ile uygulanan tedavilerin morfin yoksunluk sendromunda görülen ağırlık kaybı yüzde değişimi üzerine etkisi. Kontrol grubunda (YK; n=6) aynı hacimde çözücü sıvı uygulanmıştır. Veriler ortalama  $\pm$  standart hata şeklinde verilmiştir.

#### 4.2. Telmisartan, Kaptopril ve Anjiyotensin II'nin Naloksonla İndüklenen Morfin Yoksunluk Sendromunda Lokomotor Aktivite Üzerine Etkisi

Tüm sıçanlara deneyin 8. ve 12. gününde (yoksunluk sendromunun oluşturulduğu gün) lokomotor aktivite testi yapıldı. Bazal ve yoksunluk sendromunda elde edilen veriler Microsoft Excel programında ( $=\text{yoksunluk sendromundaki veri/bazal durumdaki veri} \times 100$ ) şeklindeki formül kullanılarak yüzde değişim hesaplandı. İstatistik analizde naloksonla indüklenen morfin yoksunluk sendromundaki stereotipik davranışların yoksunluk öncesi bazal duruma göre yüzde değişimi kullanıldı.

#### **4.2.1. Telmisartan, kaptopril ve anjiyotensin II'nin naloksonla indüklenen morfin yoksunluk sendromunda stereotipik davranışların yüzde değişimi üzerine etkisi**

Sham-Kontrol (SK) ve Bağımlı-Kontrol (BK) gruplarında Serum Fizyolojik (SF) uygulamasını takiben sırasıyla  $105 \pm 14$  ve  $78 \pm 9$  bulunan stereotipik davranış sayılarının yüzde değişimi; nalokson uygulamasını takiben Yoksun-Kontrol (YK) grubunda  $79 \pm 13$ ; TLM 33 nM grubunda  $68 \pm 9$ ; TLM 100 nM grubunda  $82 \pm 13$ ; TLM 300 nM grubunda  $73 \pm 10$ ; ANJ II grubunda  $84 \pm 12$ ; KAP grubunda  $64 \pm 9$  ve TLM Kr 33 nM grubunda  $54 \pm 7$  olarak azalmıştır. Bu değişimler arasında istatistiksel olarak anlamlı fark yoktur ( $p=0,15$ ;  $F=1,5$ ; Şekil 4.4).

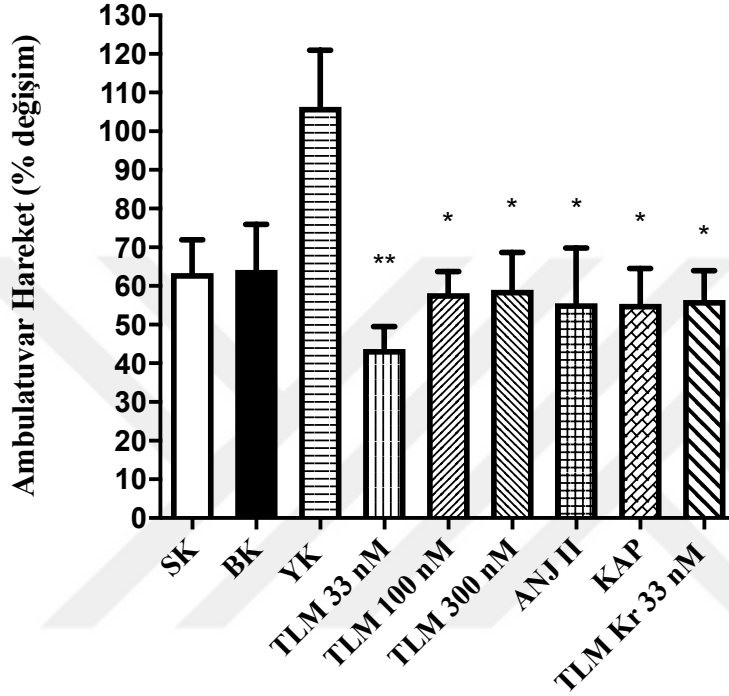


**Şekil 4.4.** SK (n=6), BK (n=6), YK (n=6), TLM 33 nM (n=6), TLM 100 nM (n=8), TLM 300 nM (n=8), ANJ II (n=7), KAP (n=7) ve TLM Kr 33 nM (n=7) gruplarındaki sıçanlara *unilateral* ICV enjeksiyon ile uygulanan tedavilerin morfin yoksunluk sendromunda görülen stereotipik davranış sayısı üzerine yüzde değişim olarak etkisi. Kontrol gruplarına (SK, n=6; BK, n=6 ve YK, n=6) aynı hacimde çözücü sıvı uygulanmıştır. Veriler ortalama  $\pm$  standart hata şeklinde verilmiştir.

#### **4.2.2. Telmisartan, kaptopril ve anjiyotensin II'nin naloksonla indüklenen morfin yoksunluk sendromunda ambulatuvar hareketlerin yüzde değişimi üzerine etkisi**

SK ve BK gruplarında SF uygulamasını takiben sırasıyla  $63 \pm 9$  ve  $64 \pm 12$  bulunan ambulatuvar hareket sayılarının yüzde değişimi; nalokson uygulamasını takiben YK grubunda  $106 \pm 14$  bulunarak artmış; TLM 33 nM grubunda  $44 \pm 6$ ; TLM 100 nM grubunda  $58 \pm 5$ ; TLM 300 nM grubunda  $59 \pm 10$ ; ANJ II grubunda  $55 \pm 14$ ; KAP grubunda  $55 \pm 9$  ve TLM Kr 33 nM grubunda  $56 \pm 7$  olarak azalmıştır. Bu değişimler

TLM, ANJ II ve KAP gruplarında YK grubuna göre istatistiksel olarak anlamlıdır (p=0,01; F=2,7; Şekil 4.5).



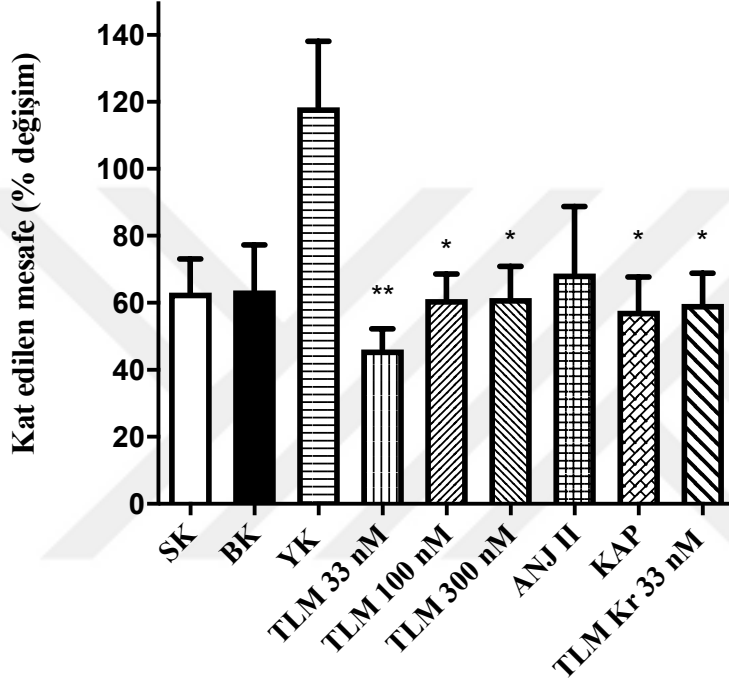
**Şekil 4.5.** SK (n=6), BK (n=6), YK (n=6), TLM 33 nM (n=6), TLM 100 nM (n=8), TLM 300 nM (n=8), ANJ II (n=7), KAP (n=7) ve TLM Kr 33 nM (n=7) gruplarındaki sıçanlara *unilateral* ICV enjeksiyon ile uygulanan tedavilerin morfin yoksunluk sendromunda görülen ambulatuvar hareket sayısı üzerine yüzde değişim olarak etkisi. Kontrol gruplarına (SK, n=6; BK, n=6 ve YK, n=6) aynı hacimde çözücü sıvı uygulanmıştır. Veriler ortalama ± standart hata şeklinde verilmektedir.

\*p<0,05; \*\*p<0,01 YK grubuna göre

#### **4.2.3. Telmisartan, kaptopril ve anjiyotensin II'nin naloksonla indüklenen morfin yoksunluk sendromunda kat edilen mesafenin yüzde değişimi üzerine etkisi**

SK ve BK gruplarında SF uygulamasını takiben sırasıyla 63 ± 10 ve 64 ± 13 bulunan kat edilen mesafe (cm) yüzde değişimi; nalokson uygulamasını takiben YK grubunda 118 ±

20 bulunarak artmış; TLM 33 nM grubunda  $46 \pm 6$ ; TLM 100 nM grubunda  $61 \pm 7$ ; TLM 300 nM grubunda  $61 \pm 9$ ; ANJ II grubunda  $68 \pm 20$ ; KAP grubunda  $57 \pm 10$  ve TLM Kr 33 nM grubunda  $59 \pm 9$  olarak azalmıştır. TLM ve KAP gruplarında YK grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı fark vardır ( $p=0,02$ ;  $F=2,4$ ; Şekil 4.6).

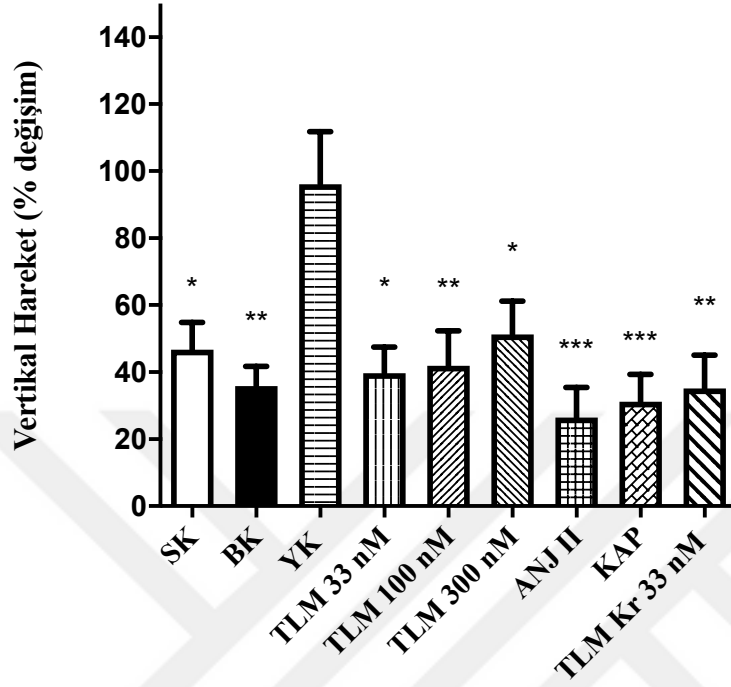


**Şekil 4.6.** SK (n=6), BK (n=6), YK (n=6), TLM 33 nM (n=6), TLM 100 nM (n=8), TLM 300 nM (n=8), ANJ II (n=7), KAP (n=7) ve TLM Kr 33 nM (n=7) gruplarındaki sıçanlara *unilateral* ICV enjeksiyon ile uygulanan tedavilerin morfin yoksunluk sendromundaki kat edilen mesafe (cm) üzerine yüzde değişim olarak etkisi. Kontrol gruplarına (SK, n=6; BK, n=6 ve YK, n=6) aynı hacimde çözücü sıvı uygulanmıştır. Veriler ortalama  $\pm$  standart hata şeklinde belirtilmiştir.

\* $p<0,05$ ; \*\* $p<0,01$  YK grubuna göre

#### **4.2.4. Telmisartan, kaptopril ve anjiyotensin II'nin naloksonla indüklenen morfin yoksunluk sendromunda vertikal hareketlerin yüzde değişimi üzerine etkisi**

SK ve BK gruplarında SF uygulamasını takiben sırasıyla  $47 \pm 8$  ve  $36 \pm 6$  bulunan vertikal hareket sayısı yüzde değişimi; nalokson uygulamasını takiben YK grubunda  $96 \pm 15$  bulunarak artmış; TLM 33 nM grubunda  $40 \pm 7$ ; TLM 100 nM grubunda  $42 \pm 10$ ; TLM 300 nM grubunda  $51 \pm 10$ ; ANJ II grubunda  $26 \pm 9$ ; KAP grubunda  $31 \pm 8$  ve TLM Kr 33 nM grubunda  $35 \pm 10$  olarak bulunmuştur. Bu değişimler YK grubuna göre istatistiksel olarak anlamlıdır ( $p=0,009$ ;  $F=4$ ; Şekil 4.7).



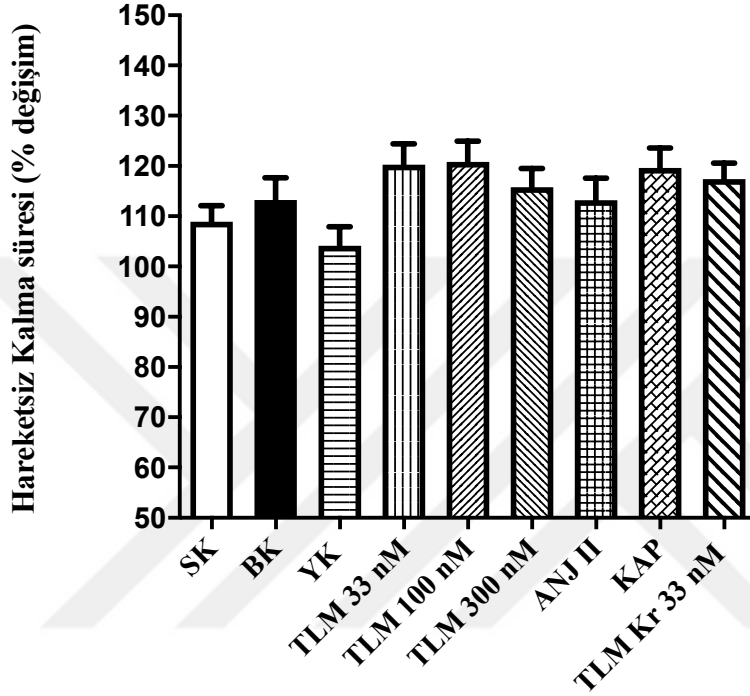
**Şekil 4.7.** SK (n=6), BK (n=6), YK (n=6), TLM 33 nM (n=6), TLM 100 nM (n=8), TLM 300 nM (n=8), ANJ II (n=7), KAP (n=7) ve TLM Kr 33 nM (n=7) gruplarındaki sıçanlara *unilateral* ICV enjeksiyon ile uygulanan tedavilerin morfin yoksunluk sendromundaki vertikal hareket sayısı üzerine yüzde değişim olarak etkisi. Kontrol gruplarına (SK, n=6; BK, n=6 ve YK, n=6) aynı hacimde çözücü sıvı uygulanmıştır. Veriler ortalama  $\pm$  standart hata şeklinde verilmiştir.

\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$  YK grubuna göre

#### **4.2.5. Telmisartan, kaptopril ve anjiyotensin II'nin naloksonla indüklenen morfin yoksunluk sendromunda hareketsiz kalma süresinin yüzde değişimi üzerine etkisi**

SK ve BK gruplarında SF uygulamasını takiben sırasıyla  $108 \pm 3$  ve  $113 \pm 4$  bulunan hareketsiz kalma süresinin yüzde değişimi; nalokson uygulaması sonrası YK grubunda  $104 \pm 4$ ; TLM 33 nM grubunda  $120 \pm 4$ ; TLM 100 nM grubunda  $121 \pm 4$ ; TLM 300 nM grubunda  $116 \pm 4$ ; ANJ II grubunda  $113 \pm 4$ ; KAP grubunda  $119 \pm 4$  ve TLM Kr 33 nM

grubunda  $117 \pm 33$  olarak bulunmuştur. Gruplar arası farklar istatistiksel olarak anlamlı değildir ( $p=0,07$ ;  $F=1,9$ ; Şekil 4.8).

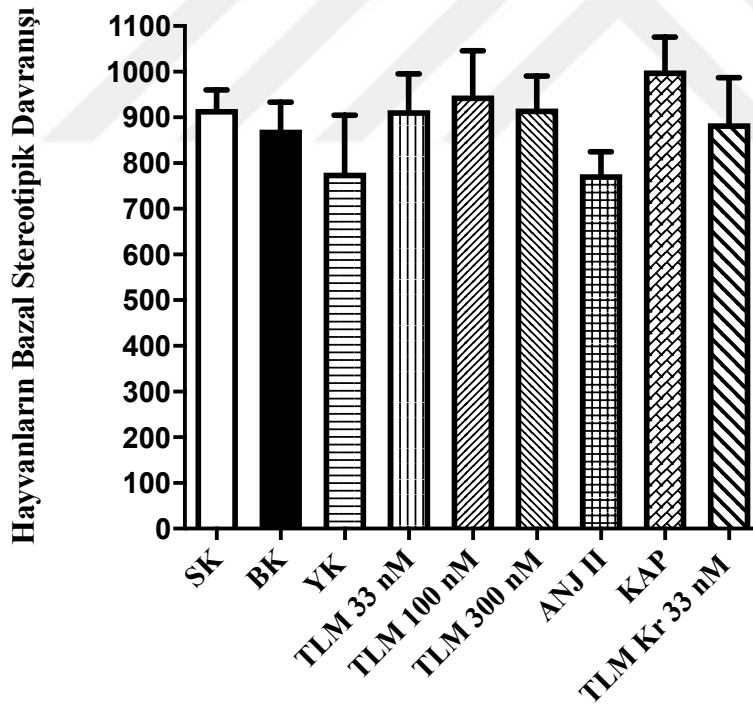


**Şekil 4.8.** SK (n=6), BK (n=6), YK (n=6), TLM 33 nM (n=6), TLM 100 nM (n=8), TLM 300 nM (n=8), ANJ II (n=7), KAP (n=7) ve TLM Kr 33 nM (n=7) gruplarındaki sıçanlara *unilateral* ICV enjeksiyon ile uygulanan tedavilerin morfin yoksunluk sendromundaki hareketsiz kalma süresi üzerine yüzde değişim olarak etkisi. Kontrol gruplarına (SK, n=6; BK, n=6 ve YK, n=6) aynı hacimde çözücü sıvı uygulanmıştır. Veriler ortalama  $\pm$  standart hata olarak verilmiştir.

### 4.3. Bazal ve Yoksunluk Sendromu Oluşturulmuş Sıçanlarda Telmisartan, Kaptopril ve Anjiyotensin II'nin Stereotipik Hareketlere etkisi

#### 4.3.1. Bazal stereotipik hareketler

Deneyin 8. gününde yapılan bazal lokomotor aktivite testinde SK grubunda stereotipik hareket sayısı  $918 \pm 42$ , BK grubunda  $873 \pm 60$ , YK grubunda  $779 \pm 125$ ; TLM 33 nM grubunda  $915 \pm 79$ ; TLM 100 nM grubunda  $948 \pm 97$ ; TLM 300 nM grubunda  $919 \pm 71$ ; ANJ II grubunda  $775 \pm 49$ ; KAP grubunda  $1003 \pm 72$  ve TLM Kr 33 nM grubunda  $887 \pm 99$  olarak bulunmuştur. Bu fark istatistiksel olarak anlamlı değildir ( $p=0,5$ ;  $F=0,8$ ; Şekil 4.9).

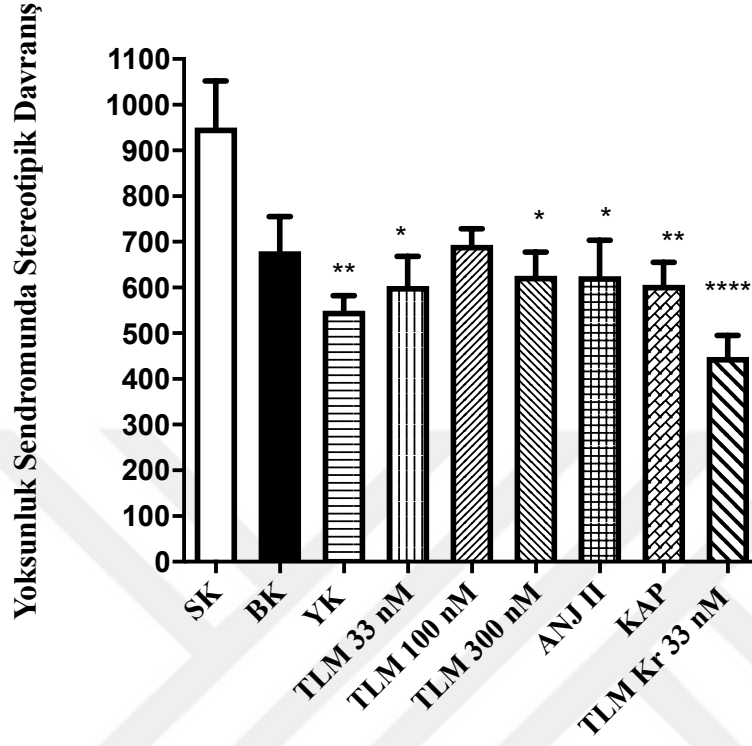


**Şekil 4.9.** SK (n=6), BK (n=6), YK (n=6), TLM 33 nM (n=6), TLM 100 nM (n=8), TLM 300 nM (n=8), ANJ II (n=7), KAP (n=7) ve TLM Kr 33 nM (n=7) gruplarındaki sıçanların 15 dk boyunca bazal lokomotor aktivite testi sırasındaki stereotipik hareketleri.

Veriler ortalama  $\pm$  standart hata şeklinde verilmiştir.

#### **4.3.2. Yoksunluk sendromu oluşturulmuş sıçanlarda telmisartan, kaptopril ve anjiyotensin II'nin stereotipik hareketlere etkisi**

SK ve BK gruplarında SF uygulamasını takiben sırasıyla  $950 \pm 101$  ve  $680 \pm 76$  bulunan stereotipik hareket sayısı; nalokson uygulamasını takiben YK grubunda  $549 \pm 33$ ; TLM 33 nM grubunda  $603 \pm 65$ ; TLM 100 nM grubunda  $694 \pm 35$ ; TLM 300 nM grubunda  $626 \pm 52$ ; ANJ II grubunda  $625 \pm 78$ ; KAP grubunda  $606 \pm 49$  ve TLM Kr 33 nM grubunda  $448 \pm 47$  olarak bulunmuştur. Bu değişimler YK, TLM 33 nM, TLM 300 nM, ANJ II, KAP ve TLM Kr 33 nM gruplarında SK grubuna göre istatistiksel olarak anlamlıdır ( $p=0,0003$ ;  $F=4,6$ ; Şekil 10).



**Şekil 4.10.** SK (n=6), BK (n=6), YK (n=6), TLM 33 nM (n=6), TLM 100 nM (n=8), TLM 300 nM (n=8), ANJ II (n=7), KAP (n=7) ve TLM Kr 33 nM (n=7) gruplarındaki sıçanlara *unilateral* ICV enjeksiyon ile uygulanan tedavilerin morfin yoksunluk sendromundaki stereotipik hareket sayısı üzerine etkisi. Kontrol gruplarına (SK, n=6; BK, n=6 ve YK, n=6) aynı hacimde çözücü sıvı uygulanmıştır. Veriler ortalama  $\pm$  standart hata şeklinde verilmiştir.

\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ , \*\*\*\* $p < 0,0001$  SK grubuna göre

## 5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Bu çalışmanın birincil bulgusu nalokson uygulamasını takiben YK grubuna göre tüm gruplarda (TLM 33 nM, TLM 100 nM, TLM 300 nM, ANJ II, KAP ve TLM Kr 33 nM) sıçrama sayısının istatistiksel olarak anlamlı derecede azalmasıdır. Bu azalma TLM 33 nM ve TLM Kr 33 nM gruplarında yüksek dozlara göre daha belirgin bulunmuştur (Şekil 4.1).

Sıçrama sayısı, sıçanlarda naloksonla indüklenen morfin yoksunluğunun şiddetini gösteren en önemli bulgudur. Opiyat antagonistlerinin tek bir uygulamasını takiben morfin bağımlılığı durumundan aniden yoksunluğa girerek, DA nörotransmisyonunda karmaşık değişiklikler görülen bir davranış olan zıplama da dahil olmak üzere; ıslak köpek silkinmesi, titreme, diyare, dış gıcırdatma ve iritabilite gibi bulgularla belirti verir (5, 52). Bir çalışmada DA miktarının azaldıktan sonra 3-(3,4-dihidroksifenil)-L-alanin (L-Dopa) verilmesi suretiyle DA seviyelerinin yükseltilmesine paralel zıplama davranışı artmıştır (155). Ayrıca, morfine bağımlı farelere nalokson uygulamasından sonraki 2 dakika içinde kortikal-striatal alanda DA seviyelerinin arttığı ve zıplama davranışı gösteren farelerin, zıplamayan farelere göre DA'da %20 daha fazla artış gösterdiği bildirilmiştir (156).

Opioid bağımlılığında, mezokortikolimbik dopaminerjik sistem NAc bölgesinde dopamin salınımını aktive eder ve indükler. Opioid bağımlılığında SSS'deki dopaminerjik aktivitedeki adaptif artış, yoksunluk sırasında baskılanır ve çekilme semptomları ortaya çıkar (84). Kronik ilaç maruziyeti sonrası NAc'de dopaminerjik ve serotonerjik iletimde azalma,  $\mu$  opioid reseptör yanıtında artış, GABAerjik iletide azalma ve NMDA glutamaterjik iletimde artış oluşması gibi değişiklikler yoksunluk sendromunun oluşmasına neden olmaktadır (85). Locus coeruleus (LC) ve nucleus tractus solitarius'tan (NTS) VTA'ya projekte olan noradrenerjik nöronal ağın ve NA'nın opioid kullanımı sonrasında ortaya çıkan yoksunluk sendromuna katkıda bulunduğu düşünülmektedir (86).

Kronik morfin alımı sonrası görülen yoksunluk durumunda DA ve NA nöronal aktivitesinde ilk opioid etkisinin tersi yönde değişiklikler görülür: Başka bir deyişle hem noradrenerjik nöronlar aktive olur hem de kortikal NA salınımı artar (157), VTA'dan projeksiyon alan dopaminerjik nöronlar inhibe edilir (84) ve bunun sonucu NAC'de DA

salınımı sürekli olarak azalır (158). Bununla birlikte, PFC'deki ekstrasellüler DA konsantrasyonlarının hem akut morfin verilmesinden sonra hem de kronik morfin yoksunluğunda, dopaminerjik nöronların aktivitesiyle belirgin bir kontrast içinde değiştiği gösterilmiştir. Bu nedenle DA nöronlarının aktivasyonuna rağmen, akut morfin uygulaması ekstrasellüler DA'yı artırmada başarısız olurken (159), VTA'da yer alan DA nöronlarının inhibisyonunun aksine (84) morfin yoksunluğu sırasında PFC'de ekstrasellüler DA belirgin şekilde artar (160). Opioid yoksunluğunda dopaminerjik aktivitenin zayıfladığını ve NAc'de dopamin salınımının azaldığını gösteren çok sayıda çalışma mevcuttur (84).

Literatürde naloksonla indüklenmiş morfin yoksunluk modellerinde DA ve NA nörotransmitterlerinin ve metabolitlerinin -sırasıyla 3,4-Dihidroksifenil asetik asit (DOPAC), homovanilik asit (HVA) ve vanilmandelik asit (VMA)- deney hayvanlarının beyni ekstrakte edildikten sonra çeşitli beyin bölgelerinde High Performance Liquid Chromatography (HPLC) yöntemi ile tespit edildiği çalışmalar mevcuttur. Bir çalışmada naloksonla indüklenmiş yoksunluktan 0,5 saat sonra kobay beyinlerinde hipotalamusta NA ve metaboliti düzeyleri ve metabolit/NA oranı artmış ve naloksondan 1 saat sonra hipotalamus, medulla/pons ve kortekste NA düzeyleri artmış olarak bulunmuştur. Naloksonla indüklenmiş yoksunluk, ayrıca 0,5 saat sonra korteks, orta beyin ve medullada, 1 saat sonra ise korteks, hipotalamus ve striatumda DA metabolizmasında artışa neden olmuştur. Dolayısıyla, yoksunluğun, NA ve DA'nın sentez ve metabolizmasında zamanla ve incelenen beyin bölgesiyle değişen karmaşık bir artış modeli (turnover) oluşturduğu söylenebilir (161). Morfin bağımlısı sıçanlara nalokson uygulamasının ardından hipotalamo-hipofiz-adrenal eksen aktivitesinde bir artış olduğunu gösteren çalışmalar sonrasında, morfin bağımlılığı ve yoksunluğu sırasında hipotalamik paraventriküler nükleustaki (PVN) noradrenalin (NA) ve dopamin (DA) miktarlarındaki değişiklikleri inceleyen bir çalışmada, NA ve DA içeriğinin yanı sıra bunların PVN'deki metabolitlerinin miktarı HPLC ile incelenmiştir. Nalokson ile yoksunluk indüklenmesi sonrası hem NA hem de DA metabolitinde belirgin bir artış gelişmiş bir diğer ifadeyle NA ve DA turnoverı artmış olarak bulunmuştur (162).

Beyin RAS ile DA ve NA ilişkisine bakıldığında; beyinde, dopamin ve ANJ II arasındaki bir etkileşim ilk olarak mikrodializ ile gösterilmiş ve ANJ II'nin akut striatal uygulamasının striatumda AT1 reseptör antagonistleri tarafından bloke edilebilen bir dopamin salınımına neden olduğu ortaya çıkmıştır. Bu sonuçlar, ANJ II'nin AT1 reseptörlerini aktive ederek dopamin salınımını arttırabildiğini ve dopamin seviyelerinde bir azalma olduğunda, ANJ II/AT1 reseptör aktivitesinde kompensatuar bir artış oluşturularak dopaminerjik fonksiyonun eski haline getirilmesinin sağlanacağını göstermektedir (121). Bununla beraber ANJ II katekolamin biyosentezi için kilit rol üstlenen tirozin hidroksilaz ve dopamin  $\beta$ -hidroksilaz enzimlerinin ifadesini ve metabolizmasını değiştirebilir, bu sayede NA ve DA sentezinin düzenlenmesinde rolü bulunur. Anjiyotensin ve DA reseptörleri arasındaki karşılıklı etkileşimler substantia nigra ve striatumda yapılan araştırmalarda gösterilmiştir (122).

RAS ile kolinerjik, dopaminerjik ve adrenerjik sistemler gibi diğer sistemler arasında bir çapraz etkileşim olduğu gösterilmiştir (14, 20). Spesifik olarak, ANJ II ve AT1R'nin ekspresyonu, hayvanlarda ve insanlarda VTA dahil olmak üzere DAerjik beyin ödül bölgeleri ile ilişkilidir (141). ADE1, DA reseptörlerinin aktivasyonunu kontrol ederek opioid bağımlılığının patofizyolojisine kapı açarken, ANJ II, DA sentezini uyarır ve oksidatif stresin indüklenmesi yoluyla rodent beyinlerinde veya nöronal kültürlerde DAerjik hücre ölümünü veya dejenerasyonunu şiddetlendirebilir (92).

Sprague-Dawley sıçanlarda yapılan iki şişe seçimine aralıklı erişim paradigması kullanılarak oluşturulan volunter yüksek alkol tüketimi modelinde, aşırı alkol alımı, oksidatif stresi indükleyerek RAS homeostazında önemli bozulmalara yol açmıştır. RAS dengesizliği volunter alkol tüketimini indüklemiş ve oksidatif stress ile DA birikimini tetikleyerek orta dereceden aşırı alkol tüketimine geçişe aracılık etmiştir, bu da alkolizm ve alkol bağımlılığının etiyopatogenezinde RAS dengesizliği, DA ve oksidatif stresin kısır döngüsünü ortaya koymuştur (147).

Bu tez çalışmasının sonuçlarına bakıldığında, yoksunluğun önemli bir göstergesi olan sıçrama davranışının tüm tedavi gruplarında azaldığı bulunmuştur (Şekil 4.1). Bu bulgu, literatürde morfin bağımlılığında beyin RAS'ın araştırıldığı, ANJ II ve kaptopril ile yapılan diğer çalışmalar ile kısmen uyumludur. Prelinik ve klinik çalışmalarda ADE

inhibitörü ve opioidler birlikte kullanıldığında opioidlerin etkinliğinin arttığı gösterilmiştir (134). ADE inhibitörü olan kaptopril ile sıçanlarda yapılan bir çalışmada, kaptoprilin olası inflamasyon yollarını inhibe ederek antinosiseptik özellik gösterdiği, morfinin analjezik etkisini artırdığı ve tekrarlayan morfin uygulamasına karşı tolerans gelişimini engellediği bildirilmiştir (135). VTA'ya yapılan ANJ II ve kaptopril enjeksiyonunun sıçanlarda morfinin kendi kendine uygulanması modelinde etkilerinin incelendiği bir çalışmada, ANJ II grubunda, aktif kola basma sayısı morfin grubuna göre anlamlı olarak düşük bulunmuştur. Bu çalışma, VTA'da ANJ II ile opioid sistemi arasındaki olası etkileşimi öne sürmüştür (21). NAc'e kaptopril uygulanan başka bir çalışmada da aktif kola basma morfin grubundan anlamlı olarak düşük bulunmuştur (22). ICV verilen kaptopril ve ANJ II'nin morfinle indüklenmiş koşullu yer tercihi ve morfin yoksunluğu modelinde etkilerinin incelendiği bir diğer çalışmada ise ICV kaptopril uygulamasının naloksonla indüklenmiş yoksunluk semptomlarını azalttığı ve ANJ II'nin bir önceki çalışmanın aksine yoksunluk semptomlarını artırdığı bildirilmiştir (23).

Bu çalışmada ANJ II grubu, YK grubuna göre sıçrama sayısı, ıslak köpek silkinmesi sayısı, lokomotor aktivite testinde ise bazale göre ambulatuvar hareket ve vertikal hareket sayısı yüzde değişimlerinde istatistiksel olarak anlamlı azalma göstermiştir. Bunun nedeni olarak, ANJ II'nin AT1R'lerine bağlandıktan sonra ANJ II/AT2 eksenini ve ANJ 1-7/MasR anti-oksidatif/anti-inflamatuar yolağında etki gösterebileceği düşünülmüştür. Şöyle ki, ANJ II ayrıca aminopeptidazlar tarafından ANJ III'e, ardından da ANJ IV'e dönüştürülebilir. ANJ III, AT2R'leri ANJ II'den daha yüksek bir afinite ile bağlar. ANJ IV, nöroprotektif etkilere yol açabilen AT4R'lere bağlanabilir (20).

KAP grubu ise YK grubuna göre sıçrama sayısı, ıslak köpek silkinmesi sayısı, lokomotor aktivite testinde ise bazale göre ambulatuvar hareket, kat edilen mesafe ve vertikal hareket sayısı yüzde değişimlerinde istatistiksel olarak anlamlı azalma göstermiştir. Bu sonuç karşısında, ADE inhibitörü ilaçların ANJ II oluşumunu engelleyerek RAS eksenini ADE2/ANJ 1-9/ANJ 1-7/MasR tarafına yönlendirdiği düşünülmektedir. Literatürde ADE'nin perindopril gibi santral sinir sistemini etkileyen inhibitör bir ilaç ile blokajı, Alzheimer hastalığı hayvan modellerinde bilişsel bozukluğu azaltmıştır. ADE inhibisyonu ile kognisyondaki iyileşmenin mekanizması; ADE ve

dopaminerjik nörotransmisyon arasındaki etkileşim ile açıklanabilir (127). Alkol bağımlılığı ve RAS ile ilgili sıçanlarda yapılan güncel bir çalışmaya göre aşırı alkol alımının VTA'da oksidatif stres yoluyla RAS dengesizliğine neden olduğu; kaptopril, ADE 2 aktivatörleri veya ANJ 1-7 mimetikleri kullanılarak RAS dengesizliğinin iyileştirildiği bildirilmiştir (147). Ayrıca önceki çalışmalar, kaptoprilin ROS süpürücü etkisini, kimyasal yapısındaki sülfhidril (-SH) grubunun varlığına bağlamıştır. Bu nedenle, lisinopril gibi SH içermeyen ADE1 inhibitörlerinin bağımlılık mekanizmalarındaki potansiyel etkileri daha fazla araştırma yapılmasını gerektirir (147, 163).

Losartanın (ARB blokörü) Alzheimer hastalığı amiloid- $\beta$  hayvan modeli deneyinde kullanıldığında, farelerde uzamsal öğrenme ve hafıza kapasitesini normalleştirdiği; ayrıca astrogliazisi azalttığı ve AT1R ve AT4R'nin ekspresyon seviyelerini normalleştirdiği bildirilmiştir (125). Çeşitli çalışmalar, kandesartan da dahil olmak üzere ARB'lerin etkilerine AT1R'nin bloke edilmesinin aracılık ettiğini ve bunun da AT2R'ye bağlanabilen bağlanmamış ANJ II miktarının artması nedeniyle AT2R'nin aktivasyonuna yol açtığını göstermiştir (128). Başka bir çalışmada, AT2R'nin doğrudan uyarılması uzamsal hafızayı geliştirmiş ve bir Alzheimer hastalığı modeli deneyinde ICV Amiloid Beta (1-40) enjeksiyonundan sonra bilişsel gerilemeyi önlemiştir (129). Alkol bağımlılığını konu alan bir çalışmada telmisartanın 100 nM ICV uygulamasının *Sardinian alcohol-preferring* sıçanların alkol yoksunluğu bulgularını ve alkol alma tercihlerini yeme içme davranışlarını etkilemeden azalttığı, ayrıca çalışmada telmisartanın bu etkisini dopamin düzeyini değiştirmeden yaptığı gösterilmiştir (24). ARB grubundan bir ajanın morfin yoksunluğu modelinde denendiği sadece bir çalışma mevcuttur. Valsartan ile çalışılan bu deneyde, valsartanın sıçanlara oral yoldan 7 gün boyunca kronik uygulanmasının morfin toleransını ve diyare, defekasyon gibi yoksunluk bulgularını azalttığı bildirilmiştir (25). Bu çalışmada valsartan alan grupta sıçrama sayısında anlamlı bir azalma görülmemiştir. Bizim çalışmamızda ise YK grubuna göre değerlendirildiğinde, yoksunluk öncesi ve sonrası tartılan sıçanların ağırlığı yüzde değişimi olarak hesaplandığında tüm tedavi grupları arasında yoksunluk sonrası anlamlı bir değişim görülmemiştir (Şekil 4.3). Bunun nedeni tüm tedavi gruplarına santral yolla (ICV) verilen tedaviler olabilir. Valsartan ile

yapılan çalışmada ilaç tedavisi sıçanlar oral uygulanmıştır (25). Opioid yoksunluk sendromunun uyarıcı edici etkilerinin LC bölgesiyle gerçekleştiği, diyare ve lakrimasyon bulgularının da periferik opioid reseptörlerine bağlı olabileceği öne sürülmüştür (79).

ARB grubu ilaçların yoksunluğu azaltıcı etki mekanizmaları şu şekilde açıklanabilir. AT1R'nin kronik blokajı ANJ IV üretimini artırır. Aşırı eksprese edilen ANJ IV, AT1R sinyalini aktive edebilir. AT1R bloke edildiğinde ANJ IV, yüksek konsantrasyonda bile, yalnızca AT4R reseptörlerine bağlanır. ANJ IV/AT4R sinyali, AT2R'leri aktive etmek üzere bağlanarak ANJ III konsantrasyonunu, anti-inflamatuar etkiler göstermek üzere nitrik oksiti artırır ve sinaptik iletimi ile uzun dönem hafıza oluşumunu geliştirir (126).

Islak köpek silkinmesi sayısı, naloksonla indüklenmiş yoksunluk sendromunda ANJ II ve KAP gruplarında YK grubuna göre anlamlı olarak düşük bulunmuştur (Şekil 4.2). Bilindiği üzere morfin yoksunluğu sendromunda baskın olarak mezokortikolimbik sistemdeki dopamin azalışının kritik bir öneme sahip olduğu bildirilse de NA, serotonin, glutamat, oreksin ve kortizol gibi nörotransmitterler de bu sürece katkıda bulunabilir (52, 76, 85, 121). Islak köpek silkinmesi hareketi serotonerjik sistemde olan değişiklikleri yansıtan bir göstergedir. Sadece ANJ II ve kaptopril grubunda anlamlı olarak düşük çıkması, AT1R blokajının tek başına bu hareketi azaltmada yeterli olmadığını düşündürmektedir (164).

TLM 33 nM dozda akut ve kronik tedavi verilen grupta, TLM 100 nM ve 300 nM dozlarında enjeksiyon yapılan gruba göre sıçrama sayısında daha fazla azalma olduğu göze çarpmaktadır. Yüksek doz TLM verildiğinde etkinin azalması, ilk bakışta TLM'nin AT1R üzerinde parsiyel agonist etkisi olduğunu düşündürmektedir, ancak literatürde TLM'nin böyle bir etkisine rastlanmamıştır. Bu konuda başka bir teori ise RAS'ın birbirine zıt çalışan iki kolunu harekete geçirerek, kompensatuvar yanıtlar oluşumuna neden olabilir. Şöyle ki, ANJ II/AT1 reseptör yolağı ve pro-renin reseptör fonksiyonları dopaminerjik nöronlarda ve glial hücrelerde oksidasyon ve inflamasyona yol açan mekanizmalarda görev almaktadır (120). ANJ II/AT2 sinyal yolağı ve ANJ 1-7/MasR mekanizması da oksidatif ve inflamatuvar etkileri tersine çeviren bir mekanizma olarak tanımlanmıştır (97). AT1 ve AT2 reseptörlerine ek olarak diğer anjiyotensin peptitleri ve reseptörleri, genel olarak pro-oksidatif ve pro-inflamatuar bir kol ile ona karşı düzenleyici

işlevleri bulunan anti-oksidatif ve anti-inflamatuar bir kol şeklinde organize olarak RAS fonksiyonlarını modüle eder. Fiziksel koşullarda her iki tarafın da doğru şekilde dengelenmesi gerekir. Oksidasyonu ve inflamasyonu arttırıcı etkiler temelde ANJ II/AT1 reseptör aktivasyonunun NADPH- oksidaz enzim kompleksinin işlevi düzenleyerek ve  $Ca^{+2}$  salınımını tetikleyen mekanizmalar ile oluşturulur. Buna ek olarak, renin ve öncüsü prorenin de ilgili reseptörler üzerinde etkilidir. Ayrıca, prorenin reseptörü, AT1 reseptör aktivasyonu tarafından indüklenenler gibi pro-oksidatif etkilere neden olan sinyal yolunu indükler (98). Anti-oksidatif/anti-inflamatuar eksen esas olarak ANJ II/AT2 reseptör bileşeni ve G-protein-bağlı Mas reseptörü (MasR) (99, 100) ve MrgD (101) ve MrgE (102) gibi Mas ile ilişkili G protein reseptör ailesi üyelerinin ANJ (1- 7) ve alamandin tarafından aktivasyonu ile oluşturulur. ADE2 oksidasyon oluşturan yolda bulunan peptitleri (ANJ I ve ANJ II), anti-oksidasyon mekanizmalarında yer alan ANJ 1-9 ve ANJ 1-7, ANJ A, ANJ III gibi diğer peptitlere türevlere parçalayarak sistemin iki ucu arasındaki dengeyi sağlamada önemli bir rol oynamaktadır (20). Mas ile ilişkili G proteini reseptörleri için ana ligand, alamandindir. Alamandin, ANJ 1-7'nin aspartik asit amino asidinin dekarboksilasyonu ile sentezlenir (101).

Yüksek doz TLM verildiğinde yoksunluk semptomlarında iyileşmenin azalması, yedek reseptör teorisi ile de açıklanabilir (28). Ayrıca kısmi PPAR $\gamma$  agonisti olan telmisartan, AT2R aktivasyonu ve serin-treonin fosfataz yolağı ile birlikte kognisyonu iyileştirir, hücre sağkalımını kolaylaştırır ve hem antioksidan özelliklere hem de anti-inflamatuar özelliklere sahiptir (43).

SK ve BK i.p. SF uygulaması, diğer gruplarda da i.p. nalokson uygulaması sonucunda bazal lokomotor aktivite testine göre gruplar arasında stereotipik hareket sayısının % değişimi istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (Şekil 4.4). Bazal lokomotor aktivite testinde gruplar arasında anlamlı bir fark görülmezken, yoksunluk sendromu oluşturulduktan sonraki ölçümde SK grubuna göre tüm gruplarda (yoksun ve bağımlı grup) stereotipik hareketlerin sayısında azalma bulunmuştur. Bu bulgu morfin peleti yerleştirilen sıçanların stereotipik aktivitelerinin azalması ile açıklanabilir. Stereotipik hareketler, belirli bir düzen içinde meydana gelen, tekrarlayan, dikkat dağıtan amaçsız hareketler olarak tanımlanır. Sıçanlardaki stereotipik hareketler ise yer değiştirmeksizin

yapılan ekstremite fleksiyon ve ekstansiyonları, baş ve boyun hareketleri, tımarlama, çiğneme, kemirme, koklama, orofasiyal hareketler ve başı sallama hareketleri olarak belirtilebilir (165). Mezoakkumbens ve striatal dopaminerjik yolların stereotipi oluşumunda rol aldıkları bilinmektedir. D1 ve D2 reseptör agonistlerinin çeşitli hayvanlarda stereotipi yarattığı, dopamin antagonistlerinin ise stereotipik davranışları baskıladığı gözlemlenmiştir. Mcbride ve Hemmings'in araştırmasına göre stereotipi gösteren hayvanların nucleus accumbens D1 ve D2 reseptör yoğunluğu kontrol grubuna kıyasla anlamlı olarak fazladır (166). SK grubu dışındaki hayvanların tümüne morfin peleti yerleştirilmiştir. Bu peletlerin zamanla dopaminerjik sistem etkilerini baskılayarak stereotipik davranışları azalttığı öne sürülebilir.

İleriki çalışmalarda, naloksonla indüklenmiş morfin yoksunluğu modelinde, önce 33 nM ICV TLM verilerek AT1R blokasyonu, sonrasında ise ANJ II verilerek ANJ II'nin ADE2/ANG 1-7/MasR eksenindeki etkilerinin incelenmesi düşünülmektedir. Ayrıca tüm hayvanların beyinlerinden PFC ve NAc bölgeleri çıkarılmış, -80°C sıcaklıktaki dolaba kaldırılmıştır. Bu beyin bölgelerinden LC-MS/MS cihazında DA, NA ve metabolitlerinin (sırasıyla DOPAC, HVA ve VMA) bakılması planlanmıştır. LC-MS/MS cihazı ile ilgili gelişen teknik sorunlar ve tez süresinin dolması nedeniyle bu tez çalışmasına sadece davranış deneylerinin bulguları dahil edilmiştir. DOPAC ve HVA dopamin metabolizmasında, VMA ise noradrenalin ve adrenalinin metabolizmasında yer almaktadır (26). Yoksunluk sendromunda, DA ve NA'nın sentez ve metabolizmasında, zamanla ve incelenen beyin bölgesiyle değişen karmaşık bir metabolizma hızında artış modeli (turnover) oluşturduğu söylenebilir (161). Çalışmanın devamında, bağımlılıkta rol alan önemli beyin bölgelerinin (PFC ve NAc) homojenatının hazırlanarak LC-MS/MS cihazında DOPAC/DA, HVA/DA ve VMA/NA oranlarının analizinin yapılması ve bu analiz ile beyin RAS modülasyonunun naloksonla indüklenen morfin yoksunluk sendromunda DA ve NA salınımı ve metabolizmasına etkisinin açıklanması hedeflenmektedir.

Sonuç olarak, yüksek dozda uygulanan TLM'nin düşük doz verilen gruba göre yoksunluk belirtilerini göreceli olarak düşürmesi bize beyindeki renin anjiyotensin etkisinin AT1 reseptörleri ile sınırlandırılmasının mümkün olmadığını göstermektedir.

Olası mekanizmalar arasında yüksek doz AT1R antagonizmasının AT2R, MasR ve AT4 reseptörlerinden biri veya birkaçı üzerinde desensitizasyon etkisi oluşturması yer alabilir. Reseptör desensitizasyonu, hücre yüzeyindeki reseptörlerin, bir agonist tarafından yüksek dozda veya sürekli olarak uyarılması sonucunda o agoniste karşı duyarlılığını geçici veya kalıcı olarak kaybetmesi durumudur. Aynı sinyal yoluna bağlı diğer reseptörlerde de duyarlılık azalabilir. İkincil habercilerin tükenmesi ve G proteine bağlı fosforile reseptörlerin  $\beta$  arrestin ile bağlanması desensitizasyon mekanizmaları arasında sayılabilir. Başka olası bir mekanizma ise yüksek dozda uygulanan TLM enjeksiyonunun AT2R, MasR, MrgDR ve AT4 reseptörlerinde downregülasyona yol açması olabilir. Ancak bu deneyde 33 nM TLM enjeksiyonunun hem akut hem de kronik verildiği (5 gün) göz önüne alındığında, kronik grupta bu etkinin görülmemesi bizi reseptör downregülasyonu teorisinden, yüksek ve tez dozda TLM verilmesinden dolayı desensitizasyon görülmesi fikrine itmektedir. Daha önce yapılan çalışmalar ve bizim çalışmamızdaki bulgular ışığında ANJ II'in yoksunluk semptomlarını azaltmasının nedeni olarak ANJ II'nin ADE2, Ap-A, Ap-N ve DC enzimleri ile ANJ 1-7, ANJ III, ANJ IV, ANJ A ve Alamandin peptitlerine dönüşerek anti-oksidatif ve anti-inflamatuar düzenleyici etkiler gösterdiği öne sürülebilir. Bu bulgular RAS'ın ve ANJ II'nin morfin yoksunluğuna etkisinin esasen beyinde pür bir endojen agonistik etkiye yol açan bir sistem gibi rol oynamasından ziyade bir modülatör gibi görev aldığını düşündürmektedir.

## 6. KAYNAKLAR

1. Zou Z, Wang H, d'Oleire Uquillas F, Wang X, Ding J, Chen H. Definition of Substance and Non-substance Addiction. *Adv Exp Med Biol.* 2017;1010:21-41.
2. Gardner EL. Addiction and brain reward and antireward pathways. *Adv Psychosom Med.* 2011;30:22-60.
3. Nestler EJ, Luscher C. The Molecular Basis of Drug Addiction: Linking Epigenetic to Synaptic and Circuit Mechanisms. *Neuron.* 2019;102(1):48-59.
4. Söderpalm B, Ericson M. Neurocircuitry Involved in the Development of Alcohol Addiction: The Dopamine System and its Access Points. Springer Berlin Heidelberg; 2011. p. 127-61.
5. Yananli H, Gören MZ, Berkman K, Aricioğlu F. Effect of agmatine on brain L-citrulline production during morphine withdrawal in rats: a microdialysis study in nucleus accumbens. *Brain Res.* 2007;1132(1):51-8.
6. Topkara B, Yananli HR, Sakalli E, Demirkapu MJ. Effects of Injection of Gamma-Aminobutyric Acid Agonists into the Nucleus Accumbens on Naloxone-Induced Morphine Withdrawal. *Pharmacology.* 2017;100(3-4):131-8.
7. Jafarova Demirkapu M, Yananlı HR, Kaleli M, Sakalli HE, Gören MZ, Topkara B. The role of adenosine A1 receptors in the nucleus accumbens during morphine withdrawal. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology.* 2020;47(4):553-60.
8. Ferreira AJ, Santos RA, Bradford CN, Mecca AP, Sumners C, Katovich MJ, et al. Therapeutic implications of the vasoprotective axis of the renin-angiotensin system in cardiovascular diseases. *Hypertension.* 2010;55(2):207-13.
9. Glodzik L, Santisteban MM. Blood-Brain Barrier Crossing Renin-Angiotensin System Drugs: Considerations for Dementia and Cognitive Decline. *Hypertension.* 2021;78(3):644-6.
10. Washida K, Ihara M, Nishio K, Fujita Y, Maki T, Yamada M, et al. Nonhypotensive dose of telmisartan attenuates cognitive impairment partially due to peroxisome

proliferator-activated receptor-gamma activation in mice with chronic cerebral hypoperfusion. *Stroke*. 2010;41(8):1798-806.

11. Allen AM, Oldfield BJ, Giles ME, Paxinos G, McKinley MJ, Mendelsohn FAO. Chapter iii Localization of angiotensin receptors in the nervous system. *Handbook of Chemical Neuroanatomy*. 2000;16:79-124.

12. Wharton W, Goldstein FC, Tansey MG, Brown AL, Tharwani SD, Verble DD, et al. Rationale and Design of the Mechanistic Potential of Antihypertensives in Preclinical Alzheimer's (HEART) Trial. *J Alzheimers Dis*. 2018;61(2):815-24.

13. Villapol S, Saavedra JM. Neuroprotective effects of angiotensin receptor blockers. *Am J Hypertens*. 2015;28(3):289-99.

14. Unger T. Inhibiting angiotensin receptors in the brain: possible therapeutic implications. *Curr Med Res Opin*. 2003;19(5):449-51.

15. Gao Q, Li X, Huang T, Gao L, Wang S, Deng Y, et al. Angiotensin-(1-7) relieves behavioral defects and  $\alpha$ -synuclein expression through NEAT1/miR-153-3p axis in Parkinson's disease. *Aging*. 2024.

16. Labandeira-Garcia JL, Labandeira CM, Guerra MJ, Rodriguez-Perez AI. The role of the brain renin-angiotensin system in Parkinson's disease. *Translational Neurodegeneration*. 2024;13(1).

17. Santiago TC, Parra L, Nani JV, Fidalgo TM, Bradshaw NJ, Hayashi MAF. Angiotensin-converting enzymes as druggable features of psychiatric and neurodegenerative disorders. *Journal of Neurochemistry*. 2023;166(2):138-55.

18. Lin HC, Tseng YF, Shen AL, Chao JC, Hsu CY, Lin HL. Association of Angiotensin Receptor Blockers with Incident Parkinson Disease in Patients with Hypertension: A Retrospective Cohort Study. *Am J Med*. 2022;135(8):1001-7.

19. The renin-angiotensin system in central nervous system tumors and degenerative diseases. *Frontiers in Bioscience-Landmark*. 2021;26(9):628.

20. Jackson L, Eldahshan W, Fagan SC, Ergul A. Within the Brain: The Renin Angiotensin System. *Int J Mol Sci*. 2018;19(3).

21. Hosseini M, Alaei HA, Havakhah S, Neemati Karimooy HA, Gholamnezhad Z. Effects of microinjection of angiotensin II and captopril to VTA on morphine self-administration in rats. *Acta Biol Hung*. 2009;60(3):241-52.
22. Hosseini M, Alaei HA, Headari R, Eslamizadeh MJ. Effects of microinjection of angiotensin II and captopril into nucleus accumbens on morphine self-administration in rats. *Indian J Exp Biol*. 2009;47(5):361-7.
23. Alaei H, Hosseini M. Angiotensin converting enzyme inhibitor captopril modifies conditioned place preference induced by morphine and morphine withdrawal signs in rats. *Pathophysiology*. 2007;14(1):55-60.
24. Tezcan K, Yananli HR, Demirkapu MJ, Goren MZ, Sakalli HE, Colombo G, et al. The effect of telmisartan, an angiotensin receptor blocker, on alcohol consumption and alcohol-induced dopamine release in the nucleus accumbens. *Alcohol*. 2021;96:73-81.
25. Kaeidi A, Amirteimoury M, Zare MS, Nazari A, Hakimizadeh E, Hassanshahi J, et al. Effects of valsartan on morphine tolerance and dependence in rats. *Res Pharm Sci*. 2021;16(3):286-93.
26. Laurence L B. Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics 13th edition. United States of America: McGraw-Hill Education; 2018.
27. Obladen M. Lethal Lullabies: A History of Opium Use in Infants. *J Hum Lact*. 2016;32(1):75-85.
28. Katzung BG. Basic & Clinical Pharmacology 14th edition. United States of America: McGraw-Hill Education; 2018.
29. Carlin MG, Dean JR, Ames JM. Opium Alkaloids in Harvested and Thermally Processed Poppy Seeds. *Front Chem*. 2020;8:737.
30. Mahluga Jafarova D, Hasan Raci Y. Opium Alkaloids. In: Kavita S, Kanchan M, Kula Kamal S, Corina D, editors. *Bioactive Compounds in Nutraceutical and Functional Food for Good Human Health*. Rijeka: IntechOpen; 2020. p. Ch. 11.
31. Kajino K, Tokuda A, Saitoh T. Morphinan Evolution: The Impact of Advances in Biochemistry and Molecular Biology. *J Biochem*. 2024;175(4):337-55.
32. Trescot AM, Datta S, Lee M, Hansen H. Opioid pharmacology. *Pain Physician*. 2008;11(2 Suppl):S133-53.

33. Holtt V. Opioid peptide processing and receptor selectivity. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 1986;26:59-77.
34. Fairbanks CA, Peterson CD. The opioid receptor: emergence through millennia of pharmaceutical sciences. *Front Pain Res (Lausanne).* 2023;4:960389.
35. Allouche S, Noble F, Marie N. Opioid receptor desensitization: mechanisms and its link to tolerance. *Front Pharmacol.* 2014;5:280.
36. Stein C, Schafer M, Machelska H. Attacking pain at its source: new perspectives on opioids. *Nat Med.* 2003;9(8):1003-8.
37. Connor M, Christie MD. Opioid receptor signalling mechanisms. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 1999;26(7):493-9.
38. Jordan B, Devi LA. Molecular mechanisms of opioid receptor signal transduction. *Br J Anaesth.* 1998;81(1):12-9.
39. Robinson FM. Chemistry of narcotic antagonists of the nalorphine type. *Adv Biochem Psychopharmacol.* 1973;8(0):21-31.
40. Dahan A, van der Schrier R, Smith T, Aarts L, van Velzen M, Niesters M. Averting Opioid-induced Respiratory Depression without Affecting Analgesia. *Anesthesiology.* 2018;128(5):1027-37.
41. Saari TI, Strang J, Dale O. Clinical Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Naloxone. *Clin Pharmacokinet.* 2024;63(4):397-422.
42. Moran TD, Abdulla FA, Smith PA. Cellular neurophysiological actions of nociceptin/orphanin FQ. *Peptides.* 2000;21(7):969-76.
43. Fioravanti B, Vanderah TW. The ORL-1 receptor system: are there opportunities for antagonists in pain therapy? *Curr Top Med Chem.* 2008;8(16):1442-51.
44. Largent-Milnes TM, Vanderah TW. Recently patented and promising ORL-1 ligands: where have we been and where are we going? *Expert Opin Ther Pat.* 2010;20(3):291-305.
45. Davis MP. Sigma-1 receptors and animal studies centered on pain and analgesia. *Expert Opin Drug Discov.* 2015;10(8):885-900.
46. Merlos M, Romero L, Zamanillo D, Plata-Salaman C, Vela JM. Sigma-1 Receptor and Pain. *Handb Exp Pharmacol.* 2017;244:131-61.

47. Hutcheson DM, Matthes HW, Valjent E, Sanchez-Blazquez P, Rodriguez-Diaz M, Garzon J, et al. Lack of dependence and rewarding effects of deltorphin II in mu-opioid receptor-deficient mice. *Eur J Neurosci*. 2001;13(1):153-61.
48. Tien LT, Park Y, Fan LW, Ma T, Loh HH, Ho IK. Increased dopamine D2 receptor binding and enhanced apomorphine-induced locomotor activity in mu-opioid receptor knockout mice. *Brain Res Bull*. 2003;61(1):109-15.
49. Bodnar RJ. Endogenous opiates and behavior: 2023. *Peptides*. 2024;179:171268.
50. Reeves KC, Shah N, Munoz B, Atwood BK. Opioid Receptor-Mediated Regulation of Neurotransmission in the Brain. *Front Mol Neurosci*. 2022;15:919773.
51. North RA, Williams JT, Surprenant A, Christie MJ. Mu and delta receptors belong to a family of receptors that are coupled to potassium channels. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1987;84(15):5487-91.
52. Listos J, Łupina M, Talarek S, Mazur A, Orzelska-Górka J, Kotlińska J. The Mechanisms Involved in Morphine Addiction: An Overview. *International Journal of Molecular Sciences*. 2019;20(17):4302.
53. Mansour A, Khachaturian H, Lewis ME, Akil H, Watson SJ. Autoradiographic differentiation of mu, delta, and kappa opioid receptors in the rat forebrain and midbrain. *J Neurosci*. 1987;7(8):2445-64.
54. Patel D, Callaway J, Vaezi M. Opioid-Induced Foregut Dysfunction. *Am J Gastroenterol*. 2019;114(11):1716-25.
55. Toubia T, Khalife T. The Endogenous Opioid System: Role and Dysfunction Caused by Opioid Therapy. *Clin Obstet Gynecol*. 2019;62(1):3-10.
56. Shippenberg TS, LeFevour A, Thompson AC. Sensitization to the conditioned rewarding effects of morphine and cocaine: differential effects of the kappa-opioid receptor agonist U69593. *Eur J Pharmacol*. 1998;345(1):27-34.
57. Drews E, Zimmer A. Modulation of alcohol and nicotine responses through the endogenous opioid system. *Prog Neurobiol*. 2010;90(1):1-15.
58. Van't Veer A, Carlezon WA, Jr. Role of kappa-opioid receptors in stress and anxiety-related behavior. *Psychopharmacology (Berl)*. 2013;229(3):435-52.

59. Leroy F, Brann DH, Meira T, Siegelbaum SA. Input-Timing-Dependent Plasticity in the Hippocampal CA2 Region and Its Potential Role in Social Memory. *Neuron*. 2017;95(5):1089-102 e5.
60. van Steenbergen H, Eikemo M, Leknes S. The role of the opioid system in decision making and cognitive control: A review. *Cogn Affect Behav Neurosci*. 2019;19(3):435-58.
61. Hamilton GR, Baskett TF. In the arms of Morpheus the development of morphine for postoperative pain relief. *Can J Anaesth*. 2000;47(4):367-74.
62. Paul AK, Smith CM, Rahmatullah M, Nissapatorn V, Wilairatana P, Spetea M, et al. Opioid Analgesia and Opioid-Induced Adverse Effects: A Review. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2021;14(11).
63. Vadivelu N, Mitra S, Hines RL. Peripheral opioid receptor agonists for analgesia: a comprehensive review. *J Opioid Manag*. 2011;7(1):55-68.
64. Rossi GC, Bodnar RJ. Interactive Mechanisms of Supraspinal Sites of Opioid Analgesic Action: A Festschrift to Dr. Gavril W. Pasternak. *Cell Mol Neurobiol*. 2021;41(5):863-97.
65. Masood AR, Thomas SH. Systemic absorption of nebulized morphine compared with oral morphine in healthy subjects. *Br J Clin Pharmacol*. 1996;41(3):250-2.
66. Neumann PB, Henriksen H, Grosman N, Christensen CB. Plasma morphine concentrations during chronic oral administration in patients with cancer pain. *Pain*. 1982;13(3):247-52.
67. Mazak K, Noszal B, Hosztafi S. Advances in the Physicochemical Profiling of Opioid Compounds of Therapeutic Interest. *ChemistryOpen*. 2019;8(7):879-87.
68. Hunt A, Joel S, Dick G, Goldman A. Population pharmacokinetics of oral morphine and its glucuronides in children receiving morphine as immediate-release liquid or sustained-release tablets for cancer pain. *J Pediatr*. 1999;135(1):47-55.
69. Coates S, Lazarus P. Hydrocodone, Oxycodone, and Morphine Metabolism and Drug-Drug Interactions. *J Pharmacol Exp Ther*. 2023;387(2):150-69.
70. Christrup LL. Morphine metabolites. *Acta Anaesthesiol Scand*. 1997;41(1 Pt 2):116-22.

71. Osborne R, Thompson P, Joel S, Trew D, Patel N, Slevin M. The analgesic activity of morphine-6-glucuronide. *Br J Clin Pharmacol.* 1992;34(2):130-8.
72. Gronich N. Central Nervous System Medications: Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Considerations for Older Adults. *Drugs Aging.* 2024;41(6):507-19.
73. Owen JA, Sitar DS, Berger L, Brownell L, Duke PC, Mitenko PA. Age-related morphine kinetics. *Clin Pharmacol Ther.* 1983;34(3):364-8.
74. Smith MT. Neuroexcitatory effects of morphine and hydromorphone: evidence implicating the 3-glucuronide metabolites. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2000;27(7):524-8.
75. Koch T, Widera A, Bartzsch K, Schulz S, Brandenburg LO, Wundrack N, et al. Receptor endocytosis counteracts the development of opioid tolerance. *Mol Pharmacol.* 2005;67(1):280-7.
76. Christie MJ. Cellular neuroadaptations to chronic opioids: tolerance, withdrawal and addiction. *Br J Pharmacol.* 2008;154(2):384-96.
77. Witt LB, Greenberg J, Cantone RE. Harm Reduction and Substance Use in Adolescents. *Prim Care.* 2024;51(4):629-43.
78. O'Brien CP, Crowley TJ. Diagnostic and statistical manual of mental disorders, Fifth Edition. *Am Psychiatric Assoc.* 2013;21(21):591-643.
79. Koob GF. Drugs of abuse: anatomy, pharmacology and function of reward pathways. *Trends Pharmacol Sci.* 1992;13(5):177-84.
80. Di Chiara G. Role of dopamine in the behavioural actions of nicotine related to addiction. *Eur J Pharmacol.* 2000;393(1-3):295-314.
81. Koob GF, Ahmed SH, Boutrel B, Chen SA, Kenny PJ, Markou A, et al. Neurobiological mechanisms in the transition from drug use to drug dependence. *Neurosci Biobehav Rev.* 2004;27(8):739-49.
82. Kreek MJ, Koob GF. Drug dependence: stress and dysregulation of brain reward pathways. *Drug Alcohol Depend.* 1998;51(1-2):23-47.
83. Koob GF, Le Moal M. Review. Neurobiological mechanisms for opponent motivational processes in addiction. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2008;363(1507):3113-23.

84. Diana M, Pistis M, Muntoni A, Gessa G. Profound decrease of mesolimbic dopaminergic neuronal activity in morphine withdrawn rats. *J Pharmacol Exp Ther.* 1995;272(2):781-5.
85. Koob GF, Volkow ND. Neurobiology of addiction: a neurocircuitry analysis. *Lancet Psychiatry.* 2016;3(8):760-73.
86. Smith RJ, Aston-Jones G. Noradrenergic transmission in the extended amygdala: role in increased drug-seeking and relapse during protracted drug abstinence. *Brain Struct Funct.* 2008;213(1-2):43-61.
87. Butler K, Le Foll B. Impact of Substance Use Disorder Pharmacotherapy on Executive Function: A Narrative Review. *Front Psychiatry.* 2019;10:98.
88. Nishimura H. Renin-angiotensin system in vertebrates: phylogenetic view of structure and function. *Anat Sci Int.* 2017;92(2):215-47.
89. Garcia MI, Boehning D. Cardiac inositol 1,4,5-trisphosphate receptors. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res.* 2017;1864(6):907-14.
90. Basu U, Case AJ, Liu J, Tian J, Li YL, Zimmerman MC. Redox-sensitive calcium/calmodulin-dependent protein kinase IIalpha in angiotensin II intra-neuronal signaling and hypertension. *Redox Biol.* 2019;27:101230.
91. Bollag WB. Regulation of aldosterone synthesis and secretion. *Compr Physiol.* 2014;4(3):1017-55.
92. Rodriguez-Pallares J, Rey P, Parga JA, Munoz A, Guerra MJ, Labandeira-Garcia JL. Brain angiotensin enhances dopaminergic cell death via microglial activation and NADPH-derived ROS. *Neurobiol Dis.* 2008;31(1):58-73.
93. de Gasparo M, Catt KJ, Inagami T, Wright JW, Unger T. International union of pharmacology. XXIII. The angiotensin II receptors. *Pharmacol Rev.* 2000;52(3):415-72.
94. Bhat SA, Sood A, Shukla R, Hanif K. AT2R Activation Prevents Microglia Pro-inflammatory Activation in a NOX-Dependent Manner: Inhibition of PKC Activation and p47(phox) Phosphorylation by PP2A. *Mol Neurobiol.* 2019;56(4):3005-23.
95. McCarthy CA, Widdop RE, Denton KM, Jones ES. Update on the angiotensin AT(2) receptor. *Curr Hypertens Rep.* 2013;15(1):25-30.

96. Patel SN, Fatima N, Ali R, Hussain T. Emerging Role of Angiotensin AT2 Receptor in Anti-Inflammation: An Update. *Curr Pharm Des.* 2020;26(4):492-500.
97. Garrido-Gil P, Pedrosa MA, Garcia-Garrote M, Pequeno-Valtierra A, Rodriguez-Castro J, Garcia-Souto D, et al. Microglial angiotensin type 2 receptors mediate sex-specific expression of inflammatory cytokines independently of circulating estrogen. *Glia.* 2022;70(12):2348-60.
98. Nguyen G, Contrepas A. The (pro)renin receptors. *J Mol Med (Berl).* 2008;86(6):643-6.
99. Kostenis E, Milligan G, Christopoulos A, Sanchez-Ferrer CF, Heringer-Walther S, Sexton PM, et al. G-protein-coupled receptor Mas is a physiological antagonist of the angiotensin II type 1 receptor. *Circulation.* 2005;111(14):1806-13.
100. Santos RAS, Sampaio WO, Alzamora AC, Motta-Santos D, Alenina N, Bader M, et al. The ACE2/Angiotensin-(1-7)/MAS Axis of the Renin-Angiotensin System: Focus on Angiotensin-(1-7). *Physiol Rev.* 2018;98(1):505-53.
101. Hrenak J, Paulis L, Simko F. Angiotensin A/Alamandine/MrgD Axis: Another Clue to Understanding Cardiovascular Pathophysiology. *Int J Mol Sci.* 2016;17(7).
102. Valenzuela R, Rodriguez-Perez AI, Costa-Besada MA, Rivas-Santisteban R, Garrido-Gil P, Lopez-Lopez A, et al. An ACE2/Mas-related receptor MrgE axis in dopaminergic neuron mitochondria. *Redox Biol.* 2021;46:102078.
103. Paz Ocaranza M, Riquelme JA, Garcia L, Jalil JE, Chiong M, Santos RAS, et al. Counter-regulatory renin-angiotensin system in cardiovascular disease. *Nat Rev Cardiol.* 2020;17(2):116-29.
104. Durdagi S, Erol I, Salmas RE, Aksoydan B, Kantarcioglu I. Oligomerization and cooperativity in GPCRs from the perspective of the angiotensin AT1 and dopamine D2 receptors. *Neurosci Lett.* 2019;700:30-7.
105. AbdAlla S, Lothar H, Abdel-tawab AM, Quitterer U. The angiotensin II AT2 receptor is an AT1 receptor antagonist. *J Biol Chem.* 2001;276(43):39721-6.
106. Rivas-Santisteban R, Lillo J, Munoz A, Rodriguez-Perez AI, Labandeira-Garcia JL, Navarro G, et al. Novel Interactions Involving the Mas Receptor Show Potential of

- the Renin-Angiotensin system in the Regulation of Microglia Activation: Altered Expression in Parkinsonism and Dyskinesia. *Neurotherapeutics*. 2021;18(2):998-1016.
107. Martinez-Pinilla E, Rodriguez-Perez AI, Navarro G, Aguinaga D, Moreno E, Lanciego JL, et al. Dopamine D2 and angiotensin II type 1 receptors form functional heteromers in rat striatum. *Biochem Pharmacol*. 2015;96(2):131-42.
108. Re RN. Role of intracellular angiotensin II. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2018;314(4):H766-H771.
109. Fountain JH, Kaur J, Lappin SL. *Physiology, Renin Angiotensin System*. StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing Copyright © 2023, StatPearls Publishing LLC.; 2023.
110. Lezama-Martinez D, Flores-Monroy J, Fonseca-Coronado S, Hernandez-Campos ME, Valencia-Hernandez I, Martinez-Aguilar L. Combined Antihypertensive Therapies That Increase Expression of Cardioprotective Biomarkers Associated With the Renin-Angiotensin and Kallikrein-Kinin Systems. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2018;72(6):291-5.
111. Guyton AC, Hall JE. *Textbook of medical physiology* (13th edition). Philadelphia, PA: Elsevier Saunders; 2016.
112. Bakris G, Yang YF, Pitt B. Mineralocorticoid Receptor Antagonists for Hypertension Management in Advanced Chronic Kidney Disease: BLOCK-CKD Trial. *Hypertension*. 2020;76(1):144-9.
113. Phillips MI, de Oliveira EM. Brain renin angiotensin in disease. *J Mol Med (Berl)*. 2008;86(6):715-22.
114. Milsted A, Barna BP, Ransohoff RM, Brosnihan KB, Ferrario CM. Astrocyte cultures derived from human brain tissue express angiotensinogen mRNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990;87(15):5720-3.
115. Bader M, Ganten D. It's renin in the brain: transgenic animals elucidate the brain renin angiotensin system. *Circ Res*. 2002;90(1):8-10.
116. Schelling P, Hutchinson JS, Ganten U, Sponer G, Ganten D. Impermeability of the blood-cerebrospinal fluid barrier for angiotensin II in rats. *Clin Sci Mol Med Suppl*. 1976;3:399s-402s.

117. Bali A, Randhawa PK, Jaggi AS. Interplay between RAS and opioids: opening the Pandora of complexities. *Neuropeptides*. 2014;48(4):249-56.
118. Costa-Besada MA, Valenzuela R, Garrido-Gil P, Villar-Cheda B, Parga JA, Lanciego JL, et al. Paracrine and Intracrine Angiotensin 1-7/Mas Receptor Axis in the Substantia Nigra of Rodents, Monkeys, and Humans. *Mol Neurobiol*. 2018;55(7):5847-67.
119. Wright JW, Harding JW. Brain angiotensin receptor subtypes AT1, AT2, and AT4 and their functions. *Regul Pept*. 1995;59(3):269-95.
120. Allen AM, MacGregor DP, Chai SY, Donnan GA, Kaczmarczyk S, Richardson K, et al. Angiotensin II receptor binding associated with nigrostriatal dopaminergic neurons in human basal ganglia. *Ann Neurol*. 1992;32(3):339-44.
121. Mendelsohn FA, Jenkins TA, Berkovic SF. Effects of angiotensin II on dopamine and serotonin turnover in the striatum of conscious rats. *Brain Res*. 1993;613(2):221-9.
122. Villar-Cheda B, Dominguez-Meijide A, Valenzuela R, Granado N, Moratalla R, Labandeira-Garcia JL. Aging-related dysregulation of dopamine and angiotensin receptor interaction. *Neurobiol Aging*. 2014;35(7):1726-38.
123. Kishi T, Hirooka Y, Sunagawa K. Telmisartan protects against cognitive decline via up-regulation of brain-derived neurotrophic factor/tropomyosin-related kinase B in hippocampus of hypertensive rats. *J Cardiol*. 2012;60(6):489-94.
124. Min LJ, Mogi M, Shudou M, Jing F, Tsukuda K, Ohshima K, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma activation with angiotensin II type 1 receptor blockade is pivotal for the prevention of blood-brain barrier impairment and cognitive decline in type 2 diabetic mice. *Hypertension*. 2012;59(5):1079-88.
125. Ongali B, Nicolakakis N, Tong XK, Aboukassim T, Papadopoulos P, Rosa-Neto P, et al. Angiotensin II type 1 receptor blocker losartan prevents and rescues cerebrovascular, neuropathological and cognitive deficits in an Alzheimer's disease model. *Neurobiol Dis*. 2014;68:126-36.
126. Braszko JJ, Walesiuk A, Wielgat P. Cognitive effects attributed to angiotensin II may result from its conversion to angiotensin IV. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst*. 2006;7(3):168-74.

127. Gadelha A, Vendramini AM, Yonamine CM, Nering M, Berberian A, Suiama MA, et al. Convergent evidences from human and animal studies implicate angiotensin I-converting enzyme activity in cognitive performance in schizophrenia. *Transl Psychiatry*. 2015;5(12):e691.
128. Alhusban A, Kozak A, Ergul A, Fagan SC. AT1 receptor antagonism is proangiogenic in the brain: BDNF a novel mediator. *J Pharmacol Exp Ther*. 2013;344(2):348-59.
129. Jing F, Mogi M, Sakata A, Iwanami J, Tsukuda K, Ohshima K, et al. Direct stimulation of angiotensin II type 2 receptor enhances spatial memory. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2012;32(2):248-55.
130. Irvine RJ, White JM. The effects of central and peripheral angiotensin on hypertension and nociception in rats. *Pharmacol Biochem Behav*. 1997;57(1-2):37-41.
131. Rabkin SW. Endogenous kappa opioids mediate the action of brain angiotensin II to increase blood pressure. *Neuropeptides*. 2007;41(6):411-9.
132. Koyuncuoglu H, Enginar N, Hatipoglu I. The in vitro and in vivo effects of enkephalins and beta-endorphin on ACE activity in mice. *Pharmacol Res Commun*. 1986;18(3):301-9.
133. Cox SL, Schelb V, Trendelenburg AU, Starke K. Enhancement of noradrenaline release by angiotensin II and bradykinin in mouse atria: evidence for cross-talk between G(q/11) protein- and G(i/o) protein-coupled receptors. *Br J Pharmacol*. 2000;129(6):1095-102.
134. Oktay S, Onur R, Ilhan M, Turker RK. Potentiation of the morphine-induced respiratory rate depression by captopril. *Eur J Pharmacol*. 1981;70(3):257-62.
135. Taskiran AS, Avci O. Effect of captopril, an angiotensin-converting enzyme inhibitor, on morphine analgesia and tolerance in rats, and elucidating the inflammation and endoplasmic reticulum stress pathway in this effect. *Neurosci Lett*. 2021;741:135504.
136. Krazinski BE, Kozirowski M, Brzuzan P, Okrasa S. The expression of genes encoding opioid precursors and the influence of opioid receptor agonists on steroidogenesis in porcine adrenocortical cells in vitro. *J Physiol Pharmacol*. 2011;62(4):461-8.

137. Yamada Y, Ohinata K, Lipkowski AW, Yoshikawa M. Angiotensin AT(2) receptor agonists act as anti-opioids via EP(3) receptor in mice. *Peptides*. 2009;30(4):735-9.
138. Fukuhara M, Matsumura K, Abe I, Fujishima M. Interaction of opioids and vasopressin in central action of angiotensin II in conscious rabbits. *Hypertens Res*. 1998;21(2):89-95.
139. Cheng BC, Tao PL, Cheng YY, Huang EY. LVV-hemorphin 7 and angiotensin IV in correlation with antinociception and anti-thermal hyperalgesia in rats. *Peptides*. 2012;36(1):9-16.
140. Jiang L, Zhu R, Bu Q, Li Y, Shao X, Gu H, et al. Brain Renin-Angiotensin System Blockade Attenuates Methamphetamine-Induced Hyperlocomotion and Neurotoxicity. *Neurotherapeutics*. 2018;15(2):500-10.
141. Garrido-Gil P, Valenzuela R, Villar-Cheda B, Lanciego JL, Labandeira-Garcia JL. Expression of angiotensinogen and receptors for angiotensin and prorenin in the monkey and human substantia nigra: an intracellular renin-angiotensin system in the nigra. *Brain Struct Funct*. 2013;218(2):373-88.
142. Maul B, Siems WE, Hoehe MR, Grecksch G, Bader M, Walther T. Alcohol consumption is controlled by angiotensin II. *FASEB J*. 2001;15(9):1640-2.
143. Ferrari MF, Raizada MK, Fior-Chadi DR. Differential regulation of the renin-angiotensin system by nicotine in WKY and SHR glia. *J Mol Neurosci*. 2008;35(2):151-60.
144. Visniauskas B, Perry JC, Oliveira V, Dalio FM, Andersen ML, Tufik S, et al. Cocaine administration increases angiotensin I-converting enzyme (ACE) expression and activity in the rat striatum and frontal cortex. *Neurosci Lett*. 2012;506(1):84-8.
145. Oros-Gonzalez A, Gallardo-Ortiz IA, Montes S, Del Valle-Mondragon L, Paez-Martinez N. Captopril and losartan attenuate behavioural sensitization in mice chronically exposed to toluene. *Behav Brain Res*. 2022;418:113640.
146. Paz MC, Marchese NA, Stroppa MM, Gerez de Burgos NM, Imboden H, Baiardi G, et al. Involvement of the brain renin-angiotensin system (RAS) in the neuroadaptive responses induced by amphetamine in a two-injection protocol. *Behav Brain Res*. 2014;272:314-23.

147. Sun M, Wu C, Liu L, Gu L, Wang Z, Xu F, et al. Interplay between the renin angiotensin system and oxidative stress contributes to alcohol addiction by stimulating dopamine accumulation in the mesolimbic pathway. *Biochem Pharmacol.* 2023;212:115578.
148. Chen YJ, Li LJ, Tang WL, Song JY, Qiu R, Li Q, et al. First-line drugs inhibiting the renin angiotensin system versus other first-line antihypertensive drug classes for hypertension. *Cochrane Database Syst Rev.* 2018;11(11):CD008170.
149. Ahire YS, Bairagi VA, Somavanshi DB, Jadhav SR, Jadhav SB, Jagtap SD. Expanding telmisartan's therapeutic horizon: exploring its multifaceted mechanisms beyond cardiovascular disorders. *Future Journal of Pharmaceutical Sciences.* 2024;10(1):84.
150. Craft RM, Stratmann JA, Bartok RE, Walpole TI, King SJ. Sex differences in development of morphine tolerance and dependence in the rat. *Psychopharmacology (Berl).* 1999;143(1):1-7.
151. Bobzean SAM, Kokane SS, Butler BD, Perrotti LI. Sex differences in the expression of morphine withdrawal symptoms and associated activity in the tail of the ventral tegmental area. *Neurosci Lett.* 2019;705:124-30.
152. Ozkula S, Jafarova Demirkapu M, Yananli HR, Aydin B, Nacar C, Cabadak H. The effect of acute topiramate administration on morphine withdrawal syndrome and brain-derived neurotrophic factor in central nervous system. *Neurol Res.* 2023;45(8):730-7.
153. Thompson AC, Zapata A, Justice JB, Jr., Vaughan RA, Sharpe LG, Shippenberg TS. Kappa-opioid receptor activation modifies dopamine uptake in the nucleus accumbens and opposes the effects of cocaine. *J Neurosci.* 2000;20(24):9333-40.
154. Paxinos G, Watson C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates* 6th Edition. San Diego: Elsevier Academic Press; 2007.
155. Maruyama Y, Takemori AE. The role of dopamine and norepinephrine in the naloxone-induced abstinence of morphine-dependent mice. *J Pharmacol Exp Ther.* 1973;185(3):602-8.

156. Iwamoto ET, Ho IK, Way EL. Elevation of brain dopamine during naloxone-precipitated withdrawal in morphine-dependent mice and rats. *J Pharmacol Exp Ther.* 1973;187(3):588-67.
157. Rossetti ZL, Longu G, Mercurio G, Gessa GL. Extraneuronal noradrenaline in the prefrontal cortex of morphine-dependent rats: tolerance and withdrawal mechanisms. *Brain Res.* 1993;609(1-2):316-20.
158. Acquas E, Carboni E, Di Chiara G. Profound depression of mesolimbic dopamine release after morphine withdrawal in dependent rats. *Eur J Pharmacol.* 1991;193(1):133-4.
159. Bassareo V, Tanda G, Petromilli P, Giua C, Di Chiara G. Non-psychostimulant drugs of abuse and anxiogenic drugs activate with differential selectivity dopamine transmission in the nucleus accumbens and in the medial prefrontal cortex of the rat. *Psychopharmacology (Berl).* 1996;124(4):293-9.
160. Bassareo V, Tanda G, Di Chiara G. Increase of extracellular dopamine in the medial prefrontal cortex during spontaneous and naloxone-precipitated opiate abstinence. *Psychopharmacology (Berl).* 1995;122(2):202-5.
161. Brent PJ, Chahl LA. Effects of naloxone-precipitated withdrawal after a single dose of morphine on catecholamine concentrations in guinea-pig brain. *Neurochem Res.* 1991;16(5):525-31.
162. Fuertes G, Laorden ML, Milanes MV. Noradrenergic and dopaminergic activity in the hypothalamic paraventricular nucleus after naloxone-induced morphine withdrawal. *Neuroendocrinology.* 2000;71(1):60-7.
163. Tamba M, Torreggiani A. Free radical scavenging and copper chelation: a potentially beneficial action of captopril. *Free Radic Res.* 2000;32(3):199-211.
164. Wojtas A, Gołombiowska K. Molecular and Medical Aspects of Psychedelics. *Int J Mol Sci.* 2023;25(1).
165. Ma D, Guest PC. Hyperlocomotion Test for Assessing Behavioral Disorders. *Methods Mol Biol.* 2018;1735:421-5.

166. McBride SD, Hemmings A. Altered mesoaccumbens and nigro-striatal dopamine physiology is associated with stereotypy development in a non-rodent species. *Behav Brain Res.* 2005;159(1):113-8.

