



T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü



Nikotin Bağımlı Sıçan Soylarında TCF7L2'nin Nikotin Bağımlılığı ve Glukoz Metabolizması Üzerine Etkileri

Doktora Tezi

İbrahim Halil ÇİTÇİ

Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

İzmir
2024

T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Nikotin Bağımlı Sıçan Soylarında TCF7L2'nin Nikotin Bağımlılığı ve Glukoz Metabolizması Üzerine Etkileri

İbrahim Halil ÇİTÇİ

Danışman(lar)
Prof. Dr. Buket KOSOVA
Prof. Dr. Oğuz GÖZEN

Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı
Yüksek Lisans Derecesi ile Doktora Programı

İzmir
2024

Tez Değerlendirme Kurulu Üyeleri

(Adı Soyadı)

(İmza)

Başkan : Doç. Dr. Buket KOSOVA Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi
Biyoloji Anabilim Dalı

(Danışman)

Üye : Prof. Dr. Cumhur GÜNDÜZ Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi
Biyoloji Anabilim Dalı

Üye : Doç. Dr. Vildan BOZOK Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi
ÇETİNTAŞ Biyoloji Anabilim Dalı

Üye : Prof. Dr. Yasemin ERAÇ Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi
Farmakoloji Anabilim Dalı

Üye : Doç. Dr. Hilmi BOLAT Balıkesir Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Genetik Anabilim Dalı

Üye : Dr. Öğr. Üyesi Metin Uşak Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi
ÇALIŞKAN Biyoloji Anabilim Dalı

Doktora tezinin kabul edildiği tarih: 02.09.2024

Önsöz

Akademik hayatıma başladığım günü daha dün gibi hatırlarken, bir anda kendimi doktora eğitimimin sonunda buldum. Avustralya’da doktora başlama planları yaparken bir anda ani bir karar ile Türkiye’ye dönüp Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı’nda 2019 yılında doktora eğitimime başladım. Aldığım bu kararın ne kadar doğru olduğunu yıllar içinde yaşayarak gördüm. Bu eğitimim boyunca gerek aldığım dersler gerekse laboratuvar çalışmaları ile akademik bilgi ve birikimimi genişlettim. İçimde hiçbir zaman sönmeyen merak duygusu her zaman kendime fazla şeyler katmamı sağladı.

Bir bilim insanı olmak üzere çıktığım bu yolda, zorluk çektiğim zamanlarda oldu fakat her karanlığın sonu mutlaka aydınlıktır diyerek hiçbir zaman pes etmedim. Şimdi ise bu bilim yolculuğunda Amerika’da tezimi yazıyorum.

Bu çıktığım yolda bana her zaman güvenen, fırsat veren hocalarımı ve ailemi gururlandırmak için her zaman daha çok çalışacağım.

Doktora eğitimimin bitmesi benim için bir son değil, bilim için çıktığım bu yolda başlangıçtır.

İzmir, 29.09.2024

Saygılarımla,
İbrahim Halil ÇİTÇİ

Özet

Nikotin Bağımlı Sıçan Soylarında TCF7L2'nin Nikotin Bağımlılığı ve Glukoz Metabolizması Üzerine Etkileri

Günümüzde sigara kullanımı önlenabilir ölüm nedenleri arasında birinci sırada bulunmaktadır. Dünyada her yıl yaklaşık 5 milyon kişi sigara-ilişkili hastalıklardan kaybedilmektedir. Sigarayı bırakmaya çalışan kişilerin %10'undan daha azı bunu başarabilmektedir. Sigara dumanındaki temel bağımlılık yapıcı ajan nikotindir. Nikotin beyinde psikostimülan etkili bir maddedir, aynı zamanda ödül duygusunu uyarmaktadır, stresi ve anksiyeteyi ise azaltmaktadır. Sigaraya başlama, bağımlı hale gelme ve sigarayı bırakabilme açısından herediter özelliklerin önemli olduğu pek çok yayında ileri sürülmektedir.

Son çalışmalar, nikotin bağımlılığının glikoz metabolizması ile ilişkili olduğunu göstermiştir. *Tcf7l2*'nin (The transcription factor 7-like 2) pankreastaki rolü birkaç yıldır araştırma konusu olmuştur. Bununla birlikte, bu transkripsiyon faktörünün beyin bölgelerindeki kesin işlevi belirsizliğini korumaktadır. Bu çalışmada, *tcf7l2* sinyal yolunu analiz ederek nikotin bağımlılığından başlıca sorumlu moleküler mekanizmaları aydınlatmayı amaçladık.

Sıçanlara altı hafta boyunca içme sularına nikotin (başlangıç dozu: 10 µg/ml, bakım dozu: 20 µg/ml) eklenerek verildi. Kontrol grubuna sadece musluk suyu verildi. Nikotin uygulamasının ardından tüm hayvanlar dekapite edildi. Nukleus akkumbens (NAc), Ventral Tegmentel Area (VTA), medial habenula (mHb) ve pankreas sisteminde *Tcf7l2*, Brain-Derived Neurotrophic Factor (*Bdnf*), Glycogen synthase kinase-3 beta (*Gsk3β*), glucagon like peptide 1 receptor (*Glp1r*) ve cholinergic receptor nicotinic alpha 7 subunit (*Chrna7*) genlerinin mRNA seviyeleri qRT-PCR ile ölçüldü. Açlık kan şekeri seviyeleri stripler kullanılarak belirlenirken, insülin ve glukagon gibi hormon seviyeleri ELISA yöntemi ile belirlendi.

Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qRT-PCR) analizi, kronik nikotin tedavisinin NAc, VTA, mHb ve pankreasta *tcf7l2* ve *glp1r* mRNA seviyelerinde azalmaya yol açtığını ortaya koydu. Buna karşılık, kronik nikotin tedavisi, NAc, VTA, mHb ve pankreasta *gsk3β*, *bdnf* ve *chrna7* mRNA seviyelerinin artmasına neden oldu. Bu değişikliklerin tamamı istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0,05$).

Ayrıca, nikotin uygulamasının açlık kan şekeri ve insülin seviyelerinde artışa yol açtığı gözlemlendi ($p<0,05$). Ayrıca, dolaşımdaki glukagon seviyelerinde azalma meydana geldi.

Bu çalışmanın sonuçları, nikotinin NAc, VTA, mHb ve pankreasta TCF7L2 sinyalini artırma etkisine sahip olduğunu göstermektedir. Bu, beyin ve pankreas arasındaki glikoz metabolizmasını düzenlemede önemli bir mekanizma olabilir. Bu çalışma, Ege Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu tarafından desteklenmiştir (Proje numarası: 28522, EÜHADYK 2022-072R1).

Anahtar Kelimeler; Nikotin, Diyabet, TCF7L2, Medial Habenula, Glikoz Metabolizması

Abstract

The Effects of TCF7L2 on Nicotine Addiction and Glucose Metabolism in Nicotine Dependent Rat Breed

Today, smoking is taking the first place amongst the causes of preventable death. 5 million deaths occur in the world each year, because of smoking-related diseases. Less than 10% of people who try to quit smoking succeed. The main addictive agent in smoking is nicotine. Nicotine is a psychostimulant effected substance at the brain, it also stimulates the reward emotion and reduces stress and anxiety. It is asserted in so many publishing that the hereditary features are playing an important role at starting smoking, becoming addicted and quitting smoking.

Recent studies have demonstrated that nicotine addiction is associated with glucose metabolism. The role of TCF7L2 in the pancreas has been the subject of investigation for several years. Nevertheless, the precise function of this transcription factor in brain regions remains uncertain. In this study, we aimed to elucidate the molecular mechanisms primarily responsible for nicotine addiction by analyzing the TCF7L2 signalling pathway.

The rats were administered nicotine (initial dose: 10 µg/ml, maintenance dose: 20 µg/ml) in their drinking water for a period of six weeks. The control group was provided only with tap water. Following the administration of nicotine, all animals were decapitated. mRNA levels of the *Tcf7l2*, *Bdnf*, *Gsk3β*, *Glp1-r*, and *Chrna7* genes in the NAc, VTA, mHb, and pancreas system were quantified by qRT-PCR. Fasting blood glucose levels were determined using strips, while hormone levels such as insulin and glucagon were determined using the ELISA method.

qRT-PCR analysis revealed that chronic nicotine treatment resulted in a decrease in TCF7L2 and GLP1R mRNA levels in the NAc, VTA, mHb and pancreas. Conversely, chronic nicotine treatment resulted in increased mRNA levels of GSK3B, BDNF, and CHRNA7 in the NAc, VTA, mHb, and pancreas. All of these changes were found to be statistically significant ($p < 0,05$). Furthermore, it was observed that nicotine administration resulted in elevated fasting blood glucose and insulin levels ($p < 0,05$). Furthermore, it resulted in a reduction in circulating glucagon levels.

The results of this study indicate that nicotine has the effect of enhancing TCF7L2 signaling in the NAc, VTA, mHb, and pancreas. This could be a crucial mechanism involved in regulating the glucose metabolism between the brain and pancreas. This study is supported by Ege University Scientific Research Projects Commission (Project number: 28522, EÜHADYK 2022-072R1).

Keywords; Nicotine, Diabetes, TCF7L2, Medial Habenula, Glucose Metabolism



İçindekiler

Önsöz	II
Özet.....	III
Abstract.....	V
İçindekiler	VII
Tablolar Dizini	IX
Şekiller Dizini	XI
GrafiklerDizini.....	XII
Kısaltma Listesi	XIII
1. GİRİŞ	1
1.1. Araştırmanın Problemi	1
1.2. Araştırmanın Sorusu	4
1.3. Araştırmanın Hipotezleri.....	5
1.4. Araştırmanın Varsayımları	5
1.5. Araştırmanın Sınırlılıkları.....	6
1.6. Araştırmanın Amacı	6
2. GENEL BİLGİLER.....	8
2.1. Nikotin Etki Mekanizması	8
2.2. Nikotin Bağımlılığı	9
2.3. Nikotin Bağımlılığının Nörobiyolojisi	10
2.4. Nikotinin İnflamatuar Etkisi.....	14
2.5. Nikotinin Epigenetik Biyobelirteçleri	16
2.6. Nikotin, Diyabet ve Bağımlılık	16
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	19
3.1. Araştırmanın Tipi	20
3.2. Araştırmanın Yeri ve Zamanı	20
3.3. Araştırmanın Evreni ve Örneklemi	20
3.4. Araştırmanın Bağımlı ve Bağımsız Değişkenleri	21
3.5. Veri Toplama Yöntemleri	21
3.6. Deney Grupları ve Hayvanlara Nikotin Uygulanması.....	21
3.7. Nikotin Uygulanması	23
3.8. Dokuların Diseksiyonu	25
3.9. Biyokimyasal Analizler	26

3.10. Total RNA İzolasyonu	30
3.11. İzole Edilen RNA'ların Kalite ve Miktar Tayini	34
3.12. cDNA sentezi	36
3.13. Primer Tasarımı.....	37
3.14. Kantitatif Real Time PCR (qPCR-RT)	38
3.15. İstatistiksel Analiz	41
4. BULGULAR	42
4.1. Nikotin Tüketim Sonuçları	42
4.2. Haftalık Ağırlık Değişim Sonuçları.....	45
4.3. Açık Kan Glukoz Değerleri	47
4.4. Dolaşımdaki Insulin ve Glukagon Değerleri.....	48
4.4.1. Insulin Değerleri.....	48
4.4.2. Glukagon Değerleri	51
4.5. Gen Ekspresyon Analiz Sonuçları.....	53
4.5.1. Nikotinin TCF7L2 mRNA ifadesi üzerindeki etkisi	53
4.5.2. Nikotinin GLP1R mRNA ifadesi üzerindeki etkisi	58
4.5.3. Nikotinin GKS3 β mRNA ifadesi üzerindeki etkisi	62
4.5.4. Nikotinin CHRNA7 mRNA ifadesi üzerindeki etkisi.....	66
4.5.5. Nikotinin BDNF mRNA ifadesi üzerindeki etkisi	70
TARTIŞMA.....	73
SONUÇ VE ÖNERİLER.....	89
KAYNAKLAR.....	91
EKLER.....	100
TEŞEKKÜR	101

Tablolar Dizini

Tablo 1. Deney Grupları	22
Tablo 2. Çalışma Dizaynı	24
Tablo 3. cDNA sentez bileşenleri (OneScript® Plus cDNA Synthesis Kit)	36
Tablo 4. cDNA sentez protokolü	37
Tablo 5. Primer Dizileri.....	38
Tablo 6. qPCR çalışmaları için kullanılan bileşenlerin hacim ve konsantrasyonları.....	39
Tablo 7. qPCR tepkime koşulları BlasTaq™ 2X qPCR MasterMix (Cat. No. G891, ABM, CA)	40
Tablo 8. Grupların Haftalık Ortalama Nikotin Tüketimi	42
Tablo 9. Kg başına nikotin tüketimi (mg)	43
Tablo 10. Grupların Haftalık Ağırlık Değişimi	45
Tablo 11. Açlık Kan Glukoz Verilerinin One-way ANOVA analizi sonucu	48
Tablo 12. pg/mL cinsinden insülin değerleri.....	48
Tablo 13. µU/mL cinsinden insülin değerleri.....	49
Tablo 14. Elisa İnsulin Verilerinin One-way ANOVA analizi sonucu	50
Tablo 15. TCFL2 NAc Verilerinin One-way ANOVA analizi sonucu	54
Tablo 16. TCFL2 mHb Verilerinin One-way ANOVA analizi sonucu	55
Tablo 17. TCFL2 VTA Verilerinin One-way ANOVA analizi sonucu	56
Tablo 18. TCFL2 Pankreas Verilerinin One-way ANOVA analizi sonucu	57
Tablo 19. GLP1R NAc Verilerinin One-way ANOVA analizi sonucu	59
Tablo 20. GLP1R mHb Verilerinin One-way ANOVA analizi sonucu	60
Tablo 21. GLP1R VTA Verilerinin One-way ANOVA analizi sonucu.....	61
Tablo 22. GLP1R Pankreas Verilerinin One-way ANOVA analizi sonucu	62
Tablo 23. GSK3β NAc Verilerinin One-way ANOVA analizi sonucu	63
Tablo 24. GSK3β mHb Verilerinin One-way ANOVA analizi sonucu	64
Tablo 25. GSK3β VTA Verilerinin One-way ANOVA analizi sonucu	65
Tablo 26. GSK3β Pankreas Verilerinin One-way ANOVA analizi sonucu	66
Tablo 27. CHRNA7 NAc Verilerinin One-way ANOVA analizi sonucu	68
Tablo 28. CHRNA7 VTA Verilerinin One-way ANOVA analizi sonucu	69
Tablo 29. CHRNA7 mHb Verilerinin One-way ANOVA analizi sonucu.....	69
Tablo 30. BDNF NAc Verilerinin One-way ANOVA analizi sonucu	71

Tablo 31. BDNF mHb Verilerinin One-way ANOVA analizi sonucu..... 71

Tablo 32. BDNF VTA Verilerinin One-way ANOVA analizi sonucu..... 72



Şekiller Dizini

Şekil 1: mHb-IPN yolunun afferent ve efferent bağlantıları.....	13
Şekil 2: Nikotinin kullanım amacına göre etkileri.	15
Şekil 3: TCF7L2'nin nikotinin motivasyonel özelliklerini ve kan şekeri homeostazı üzerindeki yıkıcı etkilerini düzenlediği önerilen mekanizma.....	17
Şekil 4: Nikotin, diyabet ve bağımlılık arasındaki ilişki.....	18
Şekil 5: Tüm Deney Protokolünün Şematik Olarak Özeti	19
Şekil 6: Nikotin Uygulamasından önce deney hayvanı.....	20
Şekil 7: Tekli kafeslere ayrılmadan önce deney hayvanları	22
Şekil 8. Nikotin bağımlı soydan gelen deney hayvanı	24
Şekil 9. Çalışma Planı	24
Şekil 10. Koronal Beyin Kesitleri.....	26
Şekil 11. Elabscience® Rat INS(Insulin) ELISA Kit (Catalog No: E-EL-R3034) standart solüsyon hazırlama.....	28
Şekil 12. Elabscience® Rat GC(Glucagon) ELISA Kit (Catalog No: E-EL-R0425) standart solüsyon hazırlama	30
Şekil 13. NucleoSpin RNA, Mini kit for RNA purification kiti aracılığı ile Total RNA izolasyonu özeti.....	34
Şekil 14. LightCycler® 480 cihazı (Roche Diagnostics, USA)	40

GrafiklerDizini

Grafik 1. Ortalama Nikotin Tüketim Grafiği.....	43
Grafik 2. Kg Başına Nikotin Tüketim Grafiği.....	44
Grafik 3. Kg Başına Nikotin Tüketim Grafiği.....	44
Grafik 4. Haftalık Ağırlık Takibi Grafiği.....	46
Grafik 5. Açlık Kan Glukozu Değerleri.....	47
Grafik 6. Dolaşımdaki İnsülin Hormonu Seviyeleri	49
Grafik 7. HOMA-IR Grafiği.....	50
Grafik 8. HOMA- β Grafiği	51
Grafik 9. Grafiği Dolaşımdaki Glukagon Hormonu Seviyeleri	52
Grafik 10. TCF7L2'nin NAc bölgesindeki kat değişim grafiği	54
Grafik 11. TCF7L2'nin mHb bölgesindeki kat değişim grafiği.....	55
Grafik 12. TCF7L2'nin VTA bölgesindeki kat değişim grafiği	56
Grafik 13. TCF7L2'nin Pankreas bölgesindeki kat değişim grafiği	57
Grafik 14. GLP1R'nin NAc bölgesindeki kat değişim grafiği	58
Grafik 15. GLP1R'nin mHb bölgesindeki kat değişim grafiği	59
Grafik 16. GLP1R'nin VTA bölgesindeki kat değişim grafiği.....	60
Grafik 17. GLP1R'nin Pankreas bölgesindeki kat değişim grafiği.....	61
Grafik 18. GSK3 β 'nin NAc bölgesindeki kat değişim grafiği	63
Grafik 19. GSK3 β 'nin mHb bölgesindeki kat değişim grafiği	64
Grafik 20. GSK3 β 'nin VTA bölgesindeki kat değişim grafiği	65
Grafik 21. GSK3 β 'nin Pankreas bölgesindeki kat değişim grafiği	66
Grafik 22. CHRNA7'nin NAc bölgesindeki kat değişim grafiği.....	67
Grafik 23. CHRNA7'nin VTA bölgesindeki kat değişim grafiği	68
Grafik 24. CHRNA7'nin mHb bölgesindeki kat değişim grafiği.....	69
Grafik 25. BDNF'nin NAc bölgesindeki kat değişim grafiği.....	70
Grafik 26. BDNF'nin mHb bölgesindeki kat değişim grafiği.....	71
Grafik 27. BDNF'nin VTA bölgesindeki kat değişim grafiği	72

Kısaltma Listesi

TUD	: Tütün Kullanımı ile İlişkili Oluşan Hastalıklar
TCF7L2	: The transcription factor 7-like 2
BDNF	: Brain-Derived Neurotrophic Factor
GLP1R	: Glucagon Like Peptide 1 Receptor
GSK3 β	: Glycogen synthase kinase-3 beta
CHRNA7	: Cholinergic Receptor Nicotinic Alpha 7 Subunit
NAc	: Nukleus Akkumbens
VTA	: Ventral Tegmentel Area
mHb	: Medial Habenula
qRT-PCR	: Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu
nAChRs	: Nikotinik Asetilkolin Reseptörleri
PFC	: Prefrontal Korteks
AMG	: Amigdala
MSN	: Medium-Spiny Nöronlar
DA	: Dopamin
GLP-1	: Glukagon-Benzeri Peptid 1
NTS	: Nükleus Traktus Solitarius

IPN	: İnterpeduncular Nucleus
DPP-4	: Dipeptidyl Peptidase IV
PD-1	: Hücre Ölümü Proteini-1
PD	: Parkinson Hastalığı
MSS	: Merkezi Sinir Sistemi
MAO-A	: Monoamin Oksidaz A
MAO-B	: Monoamin Oksidaz B
NRT	: Nikotin Replasman Tedavisi
ACh	: Asetilkolin
mAChR	: Muskarinik Asetilkolin Reseptörleri
GABA	: Gamma-Aminobutyric Acid
CRF	: Corticotropin-Releasing Factor
CRHR1	: Corticotropin Releasing Hormone Receptor 1
IQ	: Intelligence Quotient
TM1	: Transmembrane Domain 1
Cys	: Cysteine
EC50	: 50% Effecitive Concentration
IC50	: 50% Inhibitory Concentration

CPP	: Nikotin Koşullu Yer Tercihi
DDC	: Dorsal Diensefalik İletim Sistemi
DNAm	: DNA metilasyonu
HADYEK	: Hayvan Deneyleri Merkezi Etik Kurulu
HAYMER	: Laboratuvar Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezi
DST	: Dorsal striatum
MHA	: Medial Hipotalamik Alan
HIP	: Hipokampus
OD	: Optical Density
cDNA	: Komplementer DNA
T _m	: The melting temperature
Ct	: Cycle Threshold

1. GİRİŞ

1.1. Araştırmanın Problemi

Yapılan araştırmalara göre sigara tüketimi ya da tütün kullanımı ile ilişkili oluşan hastalıklar (TUD), dünya genelinde özellikle de gelişmiş olan ülkelerde engellenebilir ölümlerin başını çekmektedir. Elde edilen son verilere göre ise, sigara kullanımı dünya genelinde yıllık olarak 5 milyondan fazla prematüre ölümlere yol açtığı gösterilmiştir Jamal (2016). Tütünün içerisinde bulunan ve ana bileşeni olan nikotin, sigara içenlerde bağımlılığa sebep olan temel maddedir (Benowitz, 2009; Valentine & Sofuoglu, 2018).

Nikotinin bağımlılığa sebep olan etkilerine baktığımızda, etkilerini beyin ödül sistemi olarak adlandırılan mezokortikolimbik dopaminerjik sistem yapılarında bulunan sodyum, potasyum ve kalsiyum iyonlarına geçirgen bir merkezi gözenek etrafında düzenlenmiş oluşan ligand kapılı iyon kanalları olan nikotinik asetilkolin reseptörleri (nAChRs) üzerinden gösterir. Bu reseptörler 9 α alt birimi ($\alpha 2$ - $\alpha 10$) ve 3 β ($\beta 2$ - $\beta 4$) alt biriminin çeşitli pentamerik kombinasyonlarından oluşmaktadır. Mezokortikolimbik sistemde; VTA, NAc, Prefrontal Korteks (PFC), Amigdala (AMG), hipokampus gibi yapılar yer alır. NAc'teki MSN'lar (medium-spiny nöronlar) VTA'dan DA(dopamin)erjik girdiler alırlar ve VTA'a negatif geri bildirim gönderirler. PFC piramidal nöronları VTA ve NAc'e projeksiyonlar göndererek DAerjik nöron aktivitesinin hedef beyin bölgelerindeki etkilerini kontrol ederler. Bu projeksiyonların çoğu nAChR'leri içerir. Beyindeki en belirgin nAChR'ler $\alpha 4\beta 2$ ve $\alpha 7$ alt tipleridir (De Biasi & Dani, 2011; Picciotto & Kenny, 2013).

Yapılan çalışmalarda, mHb nöronlarının %90-100'e kadarının nAChR'leri eksprese ettiğini ve çoğunluğunun $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 5$, $\alpha 7$, $\beta 2$ ve/veya $\beta 4$ alt birimini içerdiği gösterilmiştir. Buna ek olarak, nikotinin mHb nöronları üzerindeki uyarıcı etkilerini düzenleyen mekanizmalar tam olarak anlaşılamamıştır. Nikotinin bilişsel işlev üzerindeki etkilerinin altında yatan nörobiyolojik mekanizmalar iyi tanımlanmamış olsa da, farklı analiz seviyelerinde veriler ortaya çıkmaya devam etmektedir (Fowler & Kenny, 2014; McLaughlin, Dani, & De Biasi, 2015).

Son zamanlarda yapılan bir çalışmada, Duncan ve ark., nAChR'lerin yüksek seviyelerde ifade edildiği nöronlar ile pankreastaki kan glukoz seviyesinin düzenlenmesi arasındaki ilişkiyi birbirine bağlayan bir yolak tanımladılar. Diyabet ilişkili transkripsiyon faktörü olduğu bilinen TCF7L2, bu yolağın en önemli elemanı olarak ise karşımıza çıkmaktadır. Temel olarak, TCF7L2, pankreasta glukagon-benzeri peptid 1 (GLP-1) üretilmesi ile ardından bunun salgılanması işlevlerini düzenleyen sinyal yolağının önemli bir parçasıdır. Aynı zamanda bu peptid hormonu, pankreatik β hücrelerinden insülin salınımının da uyarılmasını düzenlemektedir. Bütün bunlar göz önüne alındığında, TCF7L2 ifadesindeki değişiklikler kan glukoz seviyelerinin değişimi üzerinde etkili olabileceğini düşündürmektedir (Bruschetta & Diano, 2019; Duncan et al., 2019).

GLP-1 beyin sapında bulunan nükleus traktus solitarius (NTS)'da üretilmektedir ve çeşitli beyin bölgelerinde bir nörotransmitter olarak salınmaktadır (Mette Kruse Klausen, 2022).

Nikotinin son zamanlarda GLP-1'i sentezleyen arka beyindeki nöronları aktive ettiği gösterilmiştir. Bu nöronlar, lokal olarak salınan GLP-1'in mHb'daki sinyali interpeduncular nucleus (IPN)'ye ulaştırır. Bu eylem nikotin ödülü mekanizmasını ortadan kaldırarak kaçınma davranışlarını teşvik etmektedir (Bruschetta & Diano, 2019; McLaughlin, Dani, & De Biasi, 2017).

Aynı zamanda GLP-1 reseptörleri, ödül mekanizması ve bağımlılıkla ilgili olduğu bilinen beyin bölgelerinde eksprese edilmektedir. Farelerde yapılan araştırmalar, birkaç GLP-1 reseptör agonistinin, sistemik olarak uygulandığında en azından bir dereceye kadar kan-beyin bariyerini geçebileceğini göstermektedir (Egecioglu et al., 2013).

Nikotin bağımlılığında GLP-1 reseptör agonistlerinin tedavi olarak kullanıldığı çalışmalar mevcuttur. Bu çalışmalardan birinde, akut sistemik eksenatid uygulamasının nikotin kaynaklı lokomotor hiperaktivite ve nikotin kaynaklı dopamin salınımının zayıflamasını göstermiştir. Diğer bir çalışmada ise, sistemik olarak uygulanan eksenatid veya Dipeptidyl Peptidase IV (DPP-4) inhibitörü sitagliptinin, farelerde nikotin alımını azalttığını göstermiştir.

Aynı zamanda, GLP-1 reseptörü nakavt farelerin, wild type kontrollerden daha fazla nikotin aldığı sonucuna ulaşılmıştır. Çalışma ayrıca, IPN'ye enjekte edilen eksenatidin, nikotin alımını azalttığını göstermektedir. NTS'de GLP-1 nöronlarının kemogenetik aktivasyonu, benzer şekilde nikotin alımının azalmasını sağlamaktadır. Son olarak ise, NTS'den salınan endojen GLP-1'in, mHb-IPN döngüsünü aktive ederek nikotin alımını azalttığı gösterilmiştir (Damla Erbil, 2019; Egecioglu et al., 2013).

GSK3, programlanmış hücre ölümü proteini-1 (PD-1) ekspresyonunun merkezi bir düzenleyicisidir. Yapılan çalışmalarda, GSK-3 β yüksek aktivitesinin Parkinson hastalığı (PD) patogeneze katkıda bulunduğunu göstermektedir (Mojtaba Golpich, 2015). GSK-3 β 'nin inhibisyonu ise, parkinson tedavisinde potansiyel güçlü bir seçenek olarak kabul edilmiştir (Przemysław Duda, 2018). GSK-3 β aktivasyonu, iskeminin neden olduğu hücre ölümünün temelleri olan inflamasyon ve apoptozu indüklemektedir. Ayrıca Dikkat çekici bir şekilde, GSK3- β , son zamanlarda mikrogliadaki inflamatuvar yanıtın birçok yolak üzerinden önemli bir düzenleyicisi olarak tanımlanmıştır.

GSK-3 β aktivasyonunun, IL-1, IL-6, TNF- α üretimini teşvik ettiği ve aynı zamanda JNK-, STAT3/5- ve NF- κ B sinyalleşmesini aktive ettiği gösterilmiştir. GSK-3 β 'nin yüksek ekspresyonu, insülin duyarlılığının azalmasına, kan glukozu seviyesinin değişmesine, ve insülin direncine yol açmaktadır. Bu nedenle, GSK-3 β ile diyabetes mellitus (DM) oluşumu arasındaki ilişkinin araştırılmasına giderek daha fazla ilgi gösterilmiştir. Wnt sinyal yolağının bir parçası olan GSK-3 β , TCF7L2'nin upstream bölgesinde bulunmaktadır ve bu transkripsiyon faktörünün ekspresyonunu düzenlemektedir. Bundan yola çıkarak, nikotin tüketiminin beyinde ve pankreasta bu genin ifadesini değiştirdiği düşünülmektedir. Bu genin ifadesinin değişmesi ise, TCF7L2'nin ifadesinin değişmesine yol açabilmektedir (Beurel, Grieco, & Jope, 2015; Constantin Polychronakos, 2011).

Bunlara ek olarak, nikotinin beyinde etkisini gösterdiği reseptör olan α 7 nAChR ile IL-1 β ve TNF α gibi bazı inflamatuvar faktörler arasında çift yönlü bir düzenleme olabileceği doğrulanmıştır. Ayrıca, nikotinin inflamatuvar yanıtı, GSK-3 β 'yi içeren çoklu sinyal yollarını aktive edebilir.

$\alpha 7$ -nAChR, merkezi sinir sistemi (MSS) ve periferde immün yanıtların ve oksidatif stresin düzenlenmesinde çok önemli bir oyuncu olarak karşımıza çıkmaktadır. Geleneksel bir ligand kapılı iyon kanalından daha fazlası olan $\alpha 7$ -nAChR, öğrenme, bellek konsolidasyonu, hareket ve dikkat süreçlerinde yer almaktadır. $\alpha 7$ nAChR'nin uyarılması, çoklu hücre içi sinyal yollarının aktivasyonu ile bağlantılıdır. $\alpha 7$ -nAChR'nin downstreaminde bulunan PI3K/AKT yolağının aktivasyonu, proinflamatuvar sitokinlerin salınımını engelleyen, GSK-3 β 'yi inhibe etmektedir (Xue et al., 2019; Zhou et al., 2020).

Tüm bu bilgiler ışığında araştırmanın problemi özetlenecek olursa, GSK-3 β , downstream bölgesinde bulunan TCF7L2 ve GLP-1 başta olmak üzere CHRNA7 ve BDNF genlerinin NAc, VTA, mHb ve pankreas bölgelerindeki ifalarını belirlemek birinci önceliğimiz olmaktadır. Bunun glukoz metabolizması üzerine etkisi ana problemimizi oluşturmaktadır

Nikotin bağımlılığı özelinde düşünülecek olunursa, nikotinin bu genlerin ekspresyonunu değiştirdiği düşünülebilir. Aynı zamanda, bu genlerin inhibe ya da aktive edilmesi nikotin bağımlılığını tersine çevirecek etkiye sahip olabilir.

1.2. Araştırmanın Sorusu

Günümüzde sigara bağımlılığının tedavisinde kullanılan birçok farmakoterapötik ajan bulunmakla beraber, tedaviye yanıt her kişide aynı olmamaktadır. Bunun altında yatan birçok sebep olmakla birlikte, en önemlisi genetik yatkınlık ve farklılıklardır. Bu yüzden nikotin bağımlılığında kullanılacak olan tedavi şekli ve süresi kişiye özel olmak zorundadır. Yapılan çalışmalarda, kanser gibi birçok hastalıkla ilişkilendirilmiş olan Wnt sinyal yolağının yukarı (*upregulation*) ya da aşağı (*downregulation*) düzenlenmesinin potansiyel olarak nörodejeneratif ve psikiyatrik hastalıklar üzerine olumlu etkileri gösterilmiştir. Bu etkiler göz önüne alındığında; araştırmada, bu yolağın önemli bir parçası olan '*TCF7L2 ifadesindeki değişimler, nikotin bağımlılığının etkisini tersine çevirebilecek potansiyelde bir aksiyon gösterebilir mi?*' sorusuna cevap alabilmek için yola çıkılmıştır.

Aynı zamanda, ‘Oral nikotin tercih uygulaması ile oluşturulan deney modelinin sıçan NAc, VTA ve mHb beyin bölgelerindeki ve pankreastaki *Tcf7l2*, *Bdnf*, *Gsk3β*, *Glp1-r*, *Chrna7* mRNA ifade düzeyleri üzerine etkisi var mı?’, ‘Nikotin açlık kan glukoz seviyesini nasıl etkiler?’; ve ‘Nikotinin dolaşımdaki insulin ve glukagon gibi hormonlar üzerine etkisi var mıdır?’ sorularına da cevap aranmaktadır.

1.3. Araştırmanın Hipotezleri

Son yıllarda yapılan çalışmalarda, nikotin bağımlılığının glukoz metabolizması üzerindeki etkisi başta olmak üzere, çeşitli psikolojik ve nörolojik hastalıklarla da ilişkili olduğunu gösterilmiştir. Fakat Wnt sinyal yolağının bir parçası olan *Tcf7l2*’nin nikotin bağımlılığındaki rolü ve özellikle de medial habenula-interpediküler nucleus nöron devresindeki, VTA, NAc gibi beyin bölgelerindeki etki mekanizması bilinmemektedir. Buna ek olarak, nikotin bağımlılığı üzerindeki etkisi de henüz aydınlatılamamıştır.

Oral nikotin uygulaması ile oluşturulan nikotin tercihi deney modelinde nikotinin, mHb, VTA ve NAc beyin bölgelerinde *Tcf7l2*, *Bdnf*, *Gsk3β*, *Glp1-r*, *Chrna7* mRNA düzeyleri üzerinde etkisi olduğu öngörülmektedir. Bu deney modelinde,

1. Nikotin belirlenen genleri upregüle ya da downregüle olarak ifadesini değiştireceği düşünülmektedir.
2. Nikotin alımının açlık kan glukoz seviyelerini arttıracak olduğu öngörülmektedir.
3. İnsülinin ve glukagonun nikotin ödül ve yoksunluk mekanizmasını nasıl etkilediği aydınlatılamamakla beraber, nikotinin dolaşımdaki insulin seviyesini arttırarak hiperinsülinemiye yol açacağı ön görülmektedir.

1.4. Araştırmanın Varsayımları

TCF7L2’nin Tip 2 diyabetle olan ilişkisi uzun yıllardır bilinmektedir; ki, bu sebepten dolayı ‘Tip 2 diyabet ilişkili transkripsiyon faktörü’ olarak da bilinmektedir. Fakat diyabet ve iştah mekanizmaları üzerindeki etkilerinin yanı sıra; depresyon, şizofreni, bipolar bozukluk, major depresif bozukluk, psikoz gibi birçok psikolojik hastalıkla da ilişkili olduğu görülmektedir. Nikotin bağımlılığının, diyabet, iştah ve vücut ağırlığı üzerine olan etkileri uzun yıllardır araştırma konusudur ve bazı etkileri bilinmektedir. Nikotinin bu etkilerini TCF7L2 aracılığı ile gösteriyor olması mümkündür.

Bu çalışmada, bu sorunun yanıtı aranmaktadır. Fakat bu mekanizmalar karmaşık olup, birçok nörotransmitter sistemlerin ortak aktivasyonları ile ortaya çıkmaktadır. Bu yüzden, tek bir geni araştırmak ile bu sorulara tümüyle yanıt verilemeyeceğinden, TCF7L2 transkripsiyon faktörünün *upstream* ve *downstream* bölgesinde yer alan *Gsk3 β* ve *Glp1-r* genleri de incelenecektir. Bunların yanı sıra, nikotin bağımlılık etkisini gösterdiği reseptör olan *Chrna7* ve bilişsel fonksiyonlarda önemli olduğu bilinen *Bdnf*'in mRNA seviyelerinin de incelenecek olması, bu konu hakkında daha çok bilgi üretecektir.

1.5. Araştırmanın Sınırlılıkları

Çalışmada kaynak sorunu sebebi ile sadece erkek Sprague-Dawley sıçan cinsi kullanılmıştır. Cinsiyetin bağımlılık ve diyabet üzerindeki etkisi bilindiğinden bu çalışmanın en büyük sınırlılığı bu olarak karşımıza çıkmaktadır. Diğer yandan ödül sisteminin parçasını oluşturan, mezokortikolimbik sistemden sadece üç bölge incelenebilmiştir. Çalışmada, belirlenen genlerin mRNA ifade düzeylerinin yanı sıra protein seviyelerinin incelenememiş olması çalışmanın sınırlılıklarından bir diğeridir.

1.6. Araştırmanın Amacı

Bu çalışmada, TCF7L2 geninin nikotin bağımlılığındaki ve komorbiditeleri üzerindeki potansiyel rolünün anlaşılması için epitalamusta bulunan habenulanın yanı sıra VTA, NAc ve pankreas gibi bölgelerdeki moleküler fonksiyonlarını nitelendirilmesi hedeflenmiştir.

- Çalışma kapsamında, TCF7L2 geninin incelenmesiyle birlikte, temel olarak nikotin bağımlılığından sorumlu moleküler mekanizmaların aydınlatılması amaçlanmaktadır. Buna ek olarak, *Tcf7l2*, *Bdnf*, *Gsk3 β* , *Glp1-r*, *Chrna7* gibi genlerin diyabet ve nikotin bağımlılığındaki rollerinin ayrıntılı bir şekilde incelenmesi hedeflenmektedir.
- TCF7L2 transkripsiyon faktörünün pankreastaki rolü yıllardır araştırılmaktadır ve kısmen bilinmektedir. Ancak, beyindeki görevi hala gizemini korumaktadır; dolayısıyla da beyin bölgelerindeki işlevinin detaylı bir şekilde araştırılması amaçlanmıştır.

Bu hedefler doğrultusunda,

- Bağımlı soydan gelen Sprague-Dawley cinsi sıçanlarda, içme suyu aracılığı ile verilen nikotinin soy hayvanları tarafından daha çok tüketildiğini göstererek, nikotin bağımlılığının kuşaklar arası kalıtılabileceğini kanıtlamak amaçlanmıştır.
- Oluşturulan tercihe bağlı nikotin tüketimi modelinde, yoksunluk yaratılmadan ödül ilişkili beyin bölgelerinden olan mHb, VTA ve NAc'ın yanı sıra; pankteastaki *Tcf7l2*, *Bdnf*, *Gsk3 β* , *Glp1-r*, *Chrna7* genlerin ifade düzeylerinin qRT-PCR aracılığı ile değerlendirilmesi hedeflenmiştir.
- Deney sonunda, sakrifikasyon öncesinde elde edilecek kandan; açlık kan glukozu, hemogram değerlerinin *Hasvet VH5R* lazer kan sayım cihazı ile tespit edilmesinin yanı sıra, insülin ve glukagon gibi hormon seviyelerinin ELISA yöntemi ile tespit edilmesi amaçlanmıştır.

TCF7L2'nin Wnt sinyal yolağının önemli bir efektörü olduğu düşünüldüğünde; bu çalışma, TCF7L2 transkripsiyon faktörünün diyabet ve nikotin bağımlılığı üzerindeki rolünün daha iyi anlaşılmasını hedeflemektedir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Nikotin Etki Mekanizması

Bir alkaloid olarak sınıflandırılan nikotin, yalnızca tütün bitkilerinde sentezlenmektedir. Tersiyer amin olarak işlev gören nikotinin yapısında pirolidin ve piridin halkaları bulunur. Özellikle beyin, nöromusküler kavşaklar, adrenal medulla ve gangliyonlar dahil olmak üzere çeşitli bölgelerde bulunan nikotinik-kolinerjik reseptörlere bağlanır. Sigara içimi yoluyla solunduğunda, nikotin akciğerler yoluyla kan dolaşımına nüfuz eder ve sonunda beyne ulaşır. Etkisi limbik sistem içindeki ödül sistemine odaklanır ve beyin korteks bölgesi üzerinde teşvik edici bir etkiye katkıda bulunur. Bu, frontal korteks, mezolimbik bölge ve korpus striatum gibi bölgelerde dopamin salınımını tetikleyerek zevkli hislere yol açar. Son araştırmalar nikotinin, bağımlılığı teşvik etmede kritik bir faktör olan dopamin yıkımında rol oynayan Monoamin Oksidaz A (MAO-A) ve B enzimlerinin aktivitesini potansiyel olarak etkilediğini göstermiştir (Tiwari, Sharma, Pandey, & Shukla, 2020).

Nikotin Replasman Tedavileri (NRT'ler) sigara içmenin ortaya çıkardığı nikotin tepkisini taklit etmeyi amaçlamaktadır. Özellikle, daha yüksek NRT dozları daha ödüllendirici hisler verme eğilimindeyken, daha düşük nikotin seviyeleri daha yüksek bir teşvik edici sonuç üretmektedir (Loukas, Marti, & Perry, 2019; Zhu, Nelson, Toth, & Muscat, 2019).

Devam eden araştırmalar nikotinin bilişsel yetenekler üzerindeki etkisini anlamaya odaklanmıştır. Nikotinden etkilenen kesin bilişsel yetenekler ve bilişsel etkisindeki bireysel farklılıklar konusunda bazı tartışmalar devam etse de, hem hayvanları hem de insanları içeren çalışmalardan elde edilen çok sayıda kanıt, nikotinin bilişsel işlevleri geliştirme potansiyelinin nikotin psikofarmakolojisinin önemli bir yönü olarak kabul edilmesini sağlamıştır. Buna ek olarak, bu etkilerin altında yatan nörobiyolojik mekanizmaların çözülmesinde önemli ilerlemeler kaydedilmiştir. Bu ilerlemeler nAChR bilişsel işlev ve güçlendirmede oynadığı rolün daha iyi kavranmasını (Changeux, 2010; dos Santos Coura & Granon, 2012), nikotinin bilişsel yetenekler üzerindeki etkisine aracılık etmekten sorumlu beyin bölgelerinin tam olarak belirlenmesini (Jasinska, Zorick, Brody, & Stein, 2014) ve özellikle $\alpha 7$ ve $\alpha 4\beta 2$ nAChR'ler olmak üzere belirli nAChR alt tiplerinin tanımlanmasını kapsamaktadır.

Bu alt tipler, farmakolojik müdahaleler yoluyla nöropsikiyatrik bozukluklarda ve TUD'un bilişsel eksikliklerin giderilmesi için uygun hedefler sunmaktadır.

Son olarak, klinik yaklaşımlar yoluyla TUD'lu bireylerde bilişsel bozuklukları ele almayı amaçlayan yenilikçi terapötik stratejiler önerilmiştir (Robinson, Waters, Kang, & Sofuoğlu, 2017; Valentine & Sofuoğlu, 2018).

2.2. Nikotin Bağımlılığı

Nikotin, bağımlılık yapıcı özelliklerini beynin ödül mekanizmasını harekete geçirerek ortaya çıkarmaktadır. Beynin ödül sistemi, özellikle dopamin adlı nörotransmitterin salınımı ile ilişkilidir. Nikotin, beyin hücrelerindeki nikotinik asetilkolin reseptörlerine bağlanarak bu hücreleri uyarmaktadır ve dopamin salınımını artırmaktadır. Bu süreç, ödül ve zevk duygularını tetikleyerek kişinin nikotin kullanmaya devam etme isteğini artırarak ve bağımlılığa yol açmaktadır.

Nikotin bağımlılığı ile ilgili olarak beyin ödül sisteminin belirli bölgeleri şunlardır:

VTa: Bu bölgedeki dopaminerjik nöronlar, dopamini nucleus accumbens'e salgılamaktadır.

NAc: Dopaminin etkisiyle, ödül ve motivasyon duygularını ortaya çıkarmaktadır.

PFC: Karar verme ve dürtü kontrolü ile ilgilidir. Nikotin, bu bölgeyi de etkileyerek bağımlılığın devamını sağlamaktadır (Benowitz, 2010; Egemen KAYA, 2019).

Diğer bağımlılık yapıcı ajanlara bakıldığı zaman nikotin de uyuşturucu madde sınıfına giren kokain ve eroin maddeleri gibi yüksek orandan bağımlılık yapıcı etkiye sahip bir madde olarak karşımıza çıkmaktadır (Egemen KAYA, 2019).

Asetilkolin (*acetylcholine*; ACh), nikotin doğal agonist olduğu reseptörlere bağlanmaktadır. ACh'nin sentezlenmesi için kolin asetil transferaz enzimi gerekmektedir. Bu enzim ACh'i kolin ve AsetilCoA maddelerinden sentezlemektedir ve etkisini gösterdiği başlıca iki reseptör bulunmaktadır; bunlardan biri nAChR iken, diğeri ise muskarinik asetilkolin reseptörleri (*muscarinicacetylcholinereceptor*; mAChR) olarak karşımıza çıkmaktadır. Nikotin ise bu reseptörlerden, bağımlılık yapıcı etkilerini nAChR üzerinden göstermektedir. Bu reseptörler, beyin ödül sisteminin önemli bileşenleri olan VTA ve NAc gibi bölgelerde yüksek oranlarda bulunmaktadır.

VTA bölgesinde nAChR reseptörleri GABA- (*gamma-aminobutyric acid*) ve DAerjik sinir hücrelerinde etkili olurken, sinir uçları ve sinapslarda da bulunabilmektedir (Laviolette, 2004; Ruby Klink, 2001).

Nikotin etkileri, reseptörlerinin dağılımı ve karmaşıklığı nedeniyle sadece dopaminerjik sistem üzerinden değil, aynı zamanda diğer mekanizmalar üzerinden de ortaya çıkarmaktadır. Buna örnek olarak, nikotin yoksunluğunda görülen stres ve anksiyete, ekstrapotalamik CRF (*corticotropin-releasing factor*) seviyelerindeki artış ve CRF'nin CRHR1'e (*corticotropin releasing hormone receptor 1*) olan afinitesinin artmasıyla ilişkilendirilmiştir (Olivier George, 2007).

Nikotin bağımlılık etkisi, daha sonraki nesillerin bilişsel bozukluklarında zihinsel performansta düşüş, bilişsel işlevlerde zorluklar, düşük zekâ (*intelligence quotient*; IQ) seviyeleri ve psikososyal görülmesinde artışa sebep olabilmektedir (Wakschlag, 1997).

Nikotine maruziyet, konsantrasyon güçlüğü ve motor kontrol sorunları için bir risk faktörü olarak kabul edilmektedir. Buna ek olarak, prenatal nikotin maruziyeti deney hayvanlarında, anksiyete gibi psikososyal bozuklukların geliştiğini de göstermiştir (Schneider et al., 2011; Winzer-Serhan, 2008).

2.3. Nikotin Bağımlılığının Nörobiyolojisi

Hem beyinde hem de periferik sinir sisteminde, tütündeki birincil psikoaktif bileşik olan nikotini tanıyan nAChR'ler bulunmaktadır. Bu reseptörler genellikle nAChR olarak adlandırılır ve çeşitli alt birim kombinasyonlarına sahip pentamerik iyon kanalları olarak işlev görmektedir (Le Foll et al., 2022). Özellikle, α alt birimi TM1 (*transmembrane domain 1*) başlangıcına yakın bir Cys-Cys (*cysteine-cysteine*) çiftine sahipken, β alt biriminde bu özellik yoktur. Bu alt birimlerin değişen kombinasyonlarına bağlı olarak heteromerik ve homomerik nAChR'ler oluşur. Bunlar arasında beyinde en yaygın olan alt tipler $\alpha 7$ homomerik ve $\alpha 4\beta 2$ heteromerik nAChR'lerdir. Bir etken maddenin (örn.: nikotin), azami etkisinin yarısını ortaya çıkaran konsantrasyon değerine EC50 (*50% effective concentration*) denirken, inhibitör etkisinin yarısını ortaya çıkaran konsantrasyon değerine de IC50 (*50% inhibitory concentration*) denir.

nAChR'lerin bileşimi, nikotin bağımlılığının, up-regülasyonunda ve duyarsızlaştırma oranlarının etkisinin anlaşılmasında çok önemli bir rol oynar (Turner, Gold, Schnoll, & Blendy, 2013). Örneğin, sıçan $\alpha 7$ ve $\alpha 3\beta 4$ reseptörleri karşılaştırıldığında, aynı düzeyde yanıt elde etmek için $\alpha 7$ reseptörlerinin (EC_{50} 513) $\alpha 3\beta 4$ reseptörlerine (EC_{50} 14) kıyasla daha fazla agonist asetilkolin üretimi gerekmektedir. Alt ünite bileşimine bağlı EC değerine ek olarak, IC_{50} değerleri aynı agonist kullanıldığında bile farklı olabilmektedir. Örneğin, sıçan $\alpha 4\beta 2$ reseptörlerinde, yanıtı yarı yarıya azaltmak için çok az miktarda nikotin gerekirken ($IC_{50} < 0.01$), sıçan $\alpha 7$ reseptörleri için daha fazla miktarda nikotin gerekmektedir (IC_{50} 1.3) . Ayrıca, $\beta 2$ içeren nAChR'nin duyarsızlaştırılması $\alpha 7$ içerenlere kıyasla daha hızlı gerçekleşmektedir (Le Foll et al., 2022). Nikotinin insan beynindeki etkilerini anlamak için nAChR'lerin alt birim tiplerinin çok önemli bir rol oynadığı açıkça görülmektedir.

Ekstraselüler olarak yerleştirilmiş nöronal heteromerik nAChR'ler, her bir alt birim arasında beş bağlanma bölgesine sahip olan $\alpha 7$ 'den oluşan ve ağırlıklı olarak daha fazla bulunan homomerik nAChR'lere kıyasla agonistin bağlanması için iki bağlanma bölgesine sahiptir. Agonistin nAChR üzerindeki bağlanma bölgelerinden birine bağlanması üzerine, reseptör içinde bir dizi konformasyonel değişiklik başlatılmaktadır (Gipson & Fowler, 2020). Bu değişiklikler dizisi, sodyum ve kalsiyum iyonlarının hızlı akışına izin veren bir kapı oluşumuyla sonuçlanmaktadır (Le Foll et al., 2022). Dikkat çekici bir şekilde, tüm bu süreç sadece mikrosaniyeler sürmektedir ve bu ise reseptörün hızlı doğasının altını çizmektedir.

Ligandın (agonist) bağlanmasını takiben, ligand bağlama bölgesinin yakınında bulunan amino asitler arasında hidrojen bağları kurulmaktadır. Bu bağlar, bu amino asitlerin yeniden düzenlenmesine yol açarak C-loop'un reseptörün merkezi gözeneğine doğru kaymasına neden olmaktadır. C-loop bu şekilde hareket ettikçe, ligand nAChR'nin alt birimleri içinde hapsolmaktadır (Gipson & Fowler, 2020). Bu karmaşık süreçlerin ardından, iyon akışı ve reseptörün yapısal bileşenlerinin yeniden düzenlenmesi sonucunda beynin belirli bölgelerinden, özellikle VTA ve NAc'ten dopamin adlı nörotransmitterin salınımı gerçekleşmektedir. VTA ve NAc'i içeren mezolimbik yolakta dopamin salınımı, ödül sistemi ve haz duygularıyla ilgili olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu yol, beynin ödül sisteminin ayrılmaz bir parçasıdır ve bağımlılıkla ilişkilendirilmektedir (Le Foll et al., 2022).

Nikotin koşullu yer tercihi (CPP) kullanılarak, nikotinin ödüllendirici ve pekiştirici etkilerinin $\beta 2$ *nAChR'lerin varlığına bağlı olduğu, $\beta 2$ alt birimi eksik farelerin kullanıldığı deneysel bir modelde gösterilmiştir. $\beta 2$ alt biriminin $\alpha 6$ ve $\alpha 4$ alt birimleriyle düzenlenmesi, VTA ve NAc birbirine bağlayan devrede özellikle aktif olan $\alpha 6\beta 2$, $\alpha 4\beta 2$ ve $\alpha 4\alpha 6\beta 2$ gibi çeşitli nAChR alt tiplerinin oluşmasına yol açmaktadır. Buna ek olarak, genetik olarak etkisiz hale getirilmiş $\beta 2$, $\alpha 6$ ve $\alpha 4$ nAChR alt birimlerine sahip fareleri içeren araştırmalarda, farelerin nikotin tüketiminde bir zayıflama olduğunu ortaya koymuştur. Bu etki, bu alt birimlerin lentiviral vektör kullanılarak VTA'ya yeniden entegre edilmesiyle tersine döndüğü gösterilmiştir. Ayrıca, $\alpha 4$ alt biriminde spesifik bir mutasyon (Leu9' Ala) ile tasarlanan fare modellerinin, kontrollere kıyasla daha düşük dozda nikotin tercih ettiği gösterilmiştir (Fowler, Turner, & Imad Damaj, 2020).

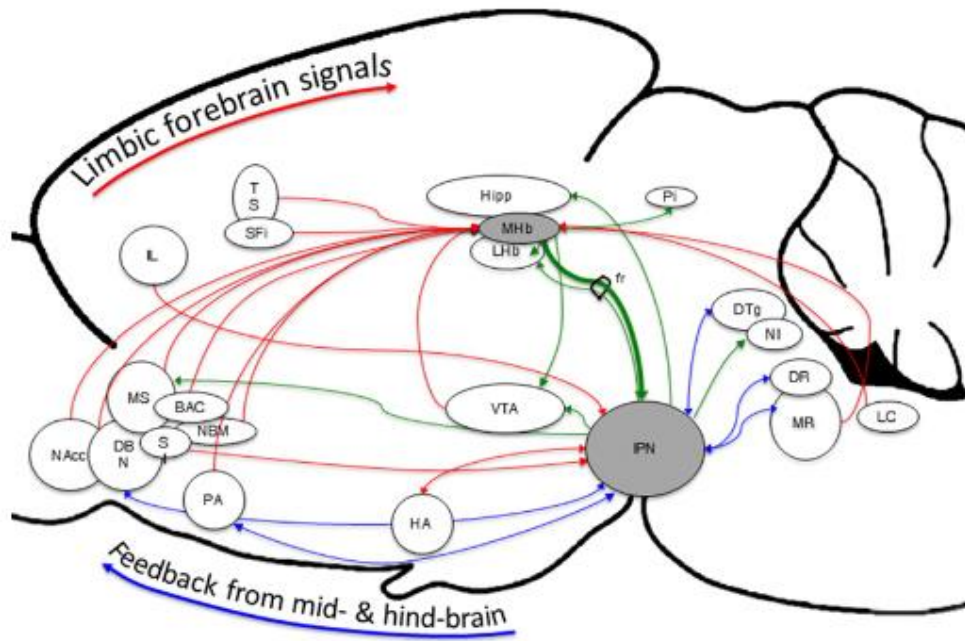
Beyindeki ödöl sistemi, tütün ürünlerinden nikotine uzun süre maruz kaldıktan sonra adaptasyona uğramakta ve bu da nikotin bağımlılığının gelişmesine katkıda bulunmaktadır (Fowler et al., 2020). Nikotin kullanımının bırakılmasıyla birlikte fiziksel, duygusal ve bilişsel semptomları kapsayan yoksunluk sendromu ortaya çıkmaktadır (Le Foll et al., 2022). Örneğin, anksiyete ve benzeri davranışlar gibi bazı duygusal yoksunluk semptomları $\beta 2$, $\alpha 6$, $\beta 4$ ve $\alpha 7$ nAChR alt birimlerinden etkilenmektedir.

Bununla birlikte, nikotinin glutamat, GABA ve dopamin dahil olmak üzere çeşitli nörotransmitterlerin salınımını etkileme kabiliyeti nedeniyle nöronal aktivitenin artmasına ya da engellenmesine yol açabilmektedir.

Bu nedenle, nikotinin VTA, NAc ve mHb beyin bölgelerini nasıl etkilediğinin kapsamlı bir şekilde araştırılması, sadece nikotin bağımlılığını nöronal devre düzeyinde anlamamızı geliştirmekle kalmamakla birlikte, aynı zamanda etkili tedaviler geliştirmek için potansiyel yollar da sağlayabilmektedir (Fowler et al., 2020).

İlginç bir şekilde bağımlılık, yoksunluk ve psikolojik durumların temelini oluşturan mekanizmalara ilişkin araştırmalarda, ortak bir yolu işaret edilmektedir, bu yol ise mHb ve IPN'u içermektedir. Dorsal diensefalik iletim sisteminin (DDC) bu iki bileşeni evrimsel olarak korunmuştur ve limbik ön beyin aracılığı ile orta beyin ile arka beyin bölgesine sinyaller iletmektedir.

DDC sistemi, alkol, opioidler ve nikotin dahil olmak üzere birden fazla ilaca bağımlılığın patofizyolojisinde önemli bir nokta olarak ortaya çıkmaktadır. Madde kullanımı ve bağımlılık buna dahil olmasına ek olarak, DDC'nin psikiyatrik durumları da düzenlediği görülmektedir. Bunu destekleyecek nitelikteki veriler, DDC'nin ve özellikle mHb-IPN yolunun, hem bağımlılıkta hem de psikolojik koşullarda önemli olduğunu göstermektedir ve mHb-IPN iletişimi, her iki koşul kümesinin altında yatan sinyallemenin bir kavşağı olarak temsil edilebilmektedir. mHb-IPN yolunda nAChR'lerin varlığı göz önüne alındığında, bu iletişim, her iki koşul kümesinin tedavi sonuçlarını iyileştirmek için farmakolojik terapötikler için stratejik hedefler sağlayabilir. Bununla ilgili yapılan bir çalışmada, kronik nikotin maruziyetini takiben, mHb veya IPN'ye nAChR antagonisti olan mekamilamin infüzyonunun, anksiyete ile ilişkili davranışları ve nikotin yoksunluğu semptomlarını indüklediği tespit edilmiştir. Bundan yola çıkarak, mHb-IPN nöronal devresinin yoksunluk ve bağımlılık altında yatan sinyale katkıda bulunduğu düşünülmektedir. Şekil 1'de bu iletişim özetlenmiştir. (Hitoshi Okamoto, 2012; McLaughlin et al., 2017).



Şekil 1: mHb-IPN yolunun afferent ve efferent bağlantıları. Medial habenula-interpeduncular nöronal devresi, ön limbik bölge ile orta beyin ve arka beyin arasındaki ödül sinyali ile birleştirir. Medial habenula, çeşitli ön beyin limbik yapılarından afferent girdiler alır ve interpeduncular nucleus, bağımlılığın ve çeşitli ruh hali ile ilgili psikiyatrik durumların altında yatan nörofizyolojide yer alan çeşitli orta beyin ve arka beyin yapılarına efferent projeksiyonlar gönderir. Kırmızı çizgiler, MHb veya IPN'ye afferent projeksiyonları gösterir ve yeşil çizgiler, efferent'i tanımlar (McLaughlin et al., 2017).

2.4. Nikotinin İnflamatuvar Etkisi

Yapılan çalışmalar sonucunda elde edilen bilgiler, çeşitli nörolojik ve psikiyatrik hastalıklarda beyindeki inflamasyonun önemli bir rolünün olduğunu vurgulamaktadır. Nöroinflamasyonun nedenleri genel olarak viral enfeksiyon, otoimmün hastalıklar, periferik organlardan kaynaklanan inflamasyon, zihinsel stres, metabolik bozukluklar ve yaşam tarzı faktörleri olarak sınıflandırılabilir. Kan-beyin bariyerinin bozulması, sistemik immün aktivasyonla bağlantılı glial hücrelerin aktivasyonu ve organ-beyin eksenini yoluyla otonom sinirler üzerindeki etkiler, periferik inflamasyon kaynaklı nöroinflamasyona neden olan bazı mekanizmalardır (Sun, Koyama, & Shimada, 2022).

Tütün yapraklarında bulunan bir bileşik olan ve nikotinin birincil metaboliti olan kotinin, potansiyel terapötik özellikleriyle dikkat çekmektedir. Kotinin güvenlidir ve bağımlılık yapmamaktadır. Araştırmalar, kotininin serotonerjik, kolinerjik ve dopaminerjik yollar gibi nörotransmitter sistemlerini modüle ederken antipsikotik, anksiyolitik ve antidepresan özellikler sergilediğini göstermiştir. Bunlara ek olarak, nAChR'lerinin pozitif allosterik modülatörü olan kotinin anti-enflamatuvar etkiler de göstermektedir. Kolinerjik sistemin aktivasyonundan kaynaklanan nöroinflamasyondaki azalma, kotininin çeşitli nörolojik ve psikiyatrik koşullardaki yararlı etkilerinin olabileceğini göstermektedir (Valentina Echeverria, 2016).

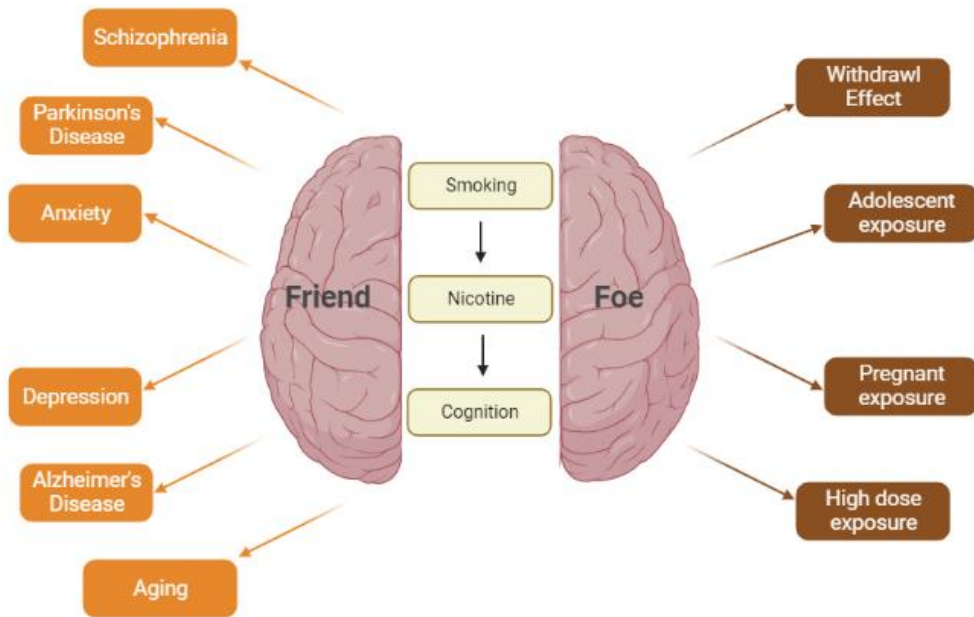
Daha önce yapılan çalışmalarda, $\alpha 7$ nAChR agonisti olan nikotinin inflamasyonu düzenleme yeteneğine sahip olduğu keşfedilmiştir. $\alpha 7$ nAChR'nin nöroproteksiyon açısından koruyucu etkileri, global iskemi, Parkinson hastalığı, siyatik sinir ezilme hasarı ve pankreatit gibi durumların hayvan modellerinde nöroinflamasyonun azaltılmasıyla ilişkilendirilmiştir. Yapılan bir çalışmada, $\alpha 7$ nAChR'nin uyarılmasının preeklampsi ve eklampside koruyucu bir etki sağladığını ve bunun potansiyel olarak yüksek sistemik inflamasyonu azaltarak elde edildiğini göstermiştir (Han, Zhou, Hu, Li, & Liu, 2020).

$\alpha 7$ nAChR hem makrofajlarda hem de T hücrelerinde inflamasyonu azaltmak için bir hedef olarak tanımlanmıştır.

Bu reseptörün bağışıklık hücreleri üzerindeki varlığı, epidemiyolojik verilere dayanarak sigara içimi ile çeşitli inflamatuvar hastalıklar arasında gözlenen negatif korelasyonu açıklayabilmektedir (Nizri et al., 2009).

Bu reseptörün makrofajlar üzerindeki aktivasyonunun TNF- α , IL-1 β ve IL-6 gibi inflamatuvar sitokinlerin salgılanmasını azalttığı gösterilmiştir. Bununla birlikte, IL-10 gibi anti-inflamatuvar sitokinlerin üretimi etkilenmemiştir (Nizri et al., 2009; Skok, Grailhe, Agenes, & Changeux, 2007). Bütün bunlardan yola çıkarak nikotinin bağışıklık sistemi üzerine olan etkisi, bu hücrelerde bulunan $\alpha 7$ nAChR'leri aktive etme kabiliyetinden kaynaklanmaktadır (Nizri et al., 2009).

Özet olarak, inflamasyon ve nörolojik/psikiyatrik hastalıklar arasındaki karmaşık ilişkinin var olduğu görülmektedir. Buna ek olarak, kotinin ve $\alpha 7$ nAChR gibi bileşiklerin nöroinflamasyonu ve ilişkili yan etkileri azaltmadaki potansiyel terapötik rolü göze çarpmaktadır. Diğer bir deyişle nikotin farklı dozlarda farklı amaçlarla kullanılabileceği gibi, kullanılış amacına göre dost veya düşman olarak da tanımlanabilmektedir (Şekil2).



Şekil 2: Nikotinin kullanımı amacına göre etkileri. Daha sonra nikotinin Alzheimer hastalığı, Parkinson hastalığı, Şizofreni, Stres kaynaklı Anksiyete, Depresyon ve ilaç kaynaklı hafıza bozukluğu gibi patolojik koşullar altında biliş üzerindeki yararlı etkisini özetliyoruz. Nikotinin etkisinin altında yatan olası mekanizma da araştırılmıştır. Son olarak, nikotinin doğum öncesi ve ergenlik dönemleri de dahil olmak üzere biliş üzerindeki zararlı etkisi tartışılmakta ve yüksek doz nikotin ve yoksunluğa bağlı hafıza bozukluğu vurgulanmaktadır. Dolayısıyla nikotin hem dost hem de düşman olarak hizmet etmektedir (Wang et al., 2023).

2.5. Nikotin Epigenetik Biyobelirteçleri

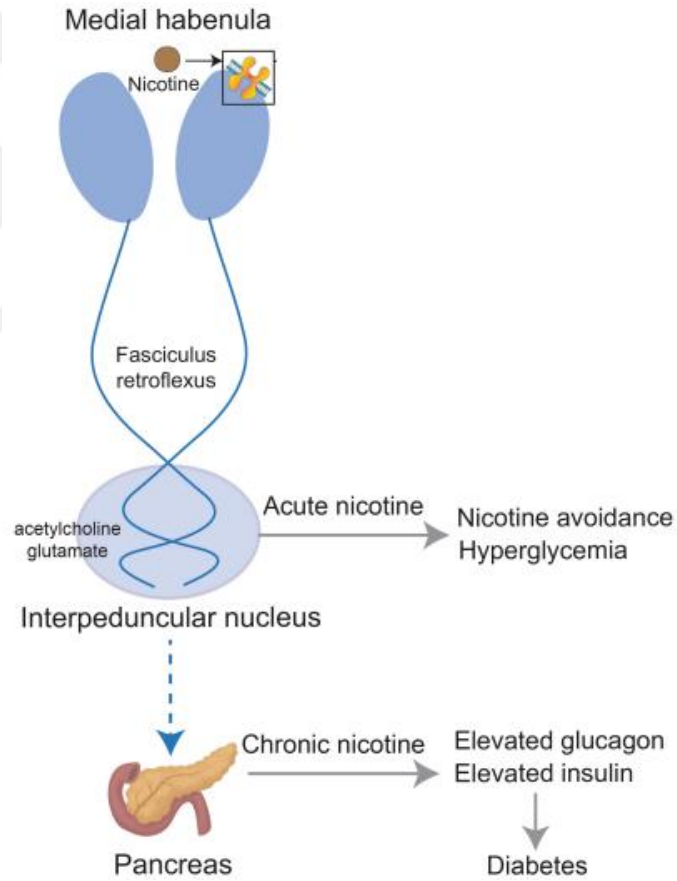
Epigenetik biyobelirteçler, nikotin bağımlılığında önemli bir potansiyel olarak karşımıza çıkmaktadır. Epigenetik değişiklikler, zaman içinde hem dalgalanma hem de kararlılık gösterebilen çeşitli modifikasyonları kapsamaktadır. Bu değişiklikler, gelişim, yaşlanma gibi süreçler boyunca ve farklı yaşam tarzı seçimleri ve çevresel etkilere tepki olarak gen ifadesi üzerinde bir etkiye sahiptir. Çeşitli epigenetik modifikasyonlar arasında DNA metilasyonu (DNAm) en kapsamlı şekilde araştırılmış modifikasyon olarak görülmektedir. DNAm, genellikle DNA dizileri içindeki belirli Sitozin-Guanin (CpG) nükleotidlerine metil gruplarının bağlanmasıyla karakterize edilen kimyasal değişimleri ifade etmektedir. Bu değişiklik, periferik kan veya tükürük gibi kolaylıkla elde edilebilen örneklerle tespit edilebilirken, sigara içme alışkanlıklarının ve bırakmanın moleküler bir işareti olarak hareket edebilme potansiyeline sahiptir (Bird, 2007; Fang, Andersen, Philibert, & Hancock, 2023). Nikotin veya karbon monoksit seviyeleri gibi geleneksel ölçümlerin aksine DNAm, bir kişinin ne kadar nikotine maruz kaldığına dair daha hassas bir gösterge sunabilmektedir. Bununla ilgili çalışmalar çok sınırlı olup, daha fazla çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır. Nikotin bağımlılığı ile ilgili bir epigenetik biyobelirtecini keşfedilmesi durumunda, tükürük yoluyla bile kişinin nikotine bağımlılık seviyesi tespit edilebilir ve buna uygun tedaviler seçilebilir (Chang et al., 2017).

2.6. Nikotin, Diyabet ve Bağımlılık

Sigara içmek, glukoz mekanizmasını etkileyerek açlık kan şekerinin yükselmesine neden olmaktadır, bu ise diyabete karşı daha fazla hassasiyet oluşturmaktadır (Chiolero, Faeh, Paccaud, & Cornuz, 2008). Nikotin, beyin mHb bölgesinde bulunan ve nAChR proteinlerini ifade eden bir grup nöronu aktive etmektedir (Benowitz, 2010). Bu nöronlar nikotine karşı aversif tepkileri teşvik etmektedir (Bruschetta & Diano, 2019). Ayrıca, sigaranın diyabetle ilişkili etkilerini de yönetip yönetmedikleri ve bunun arkasındaki mekanizma henüz bilinmemektedir.

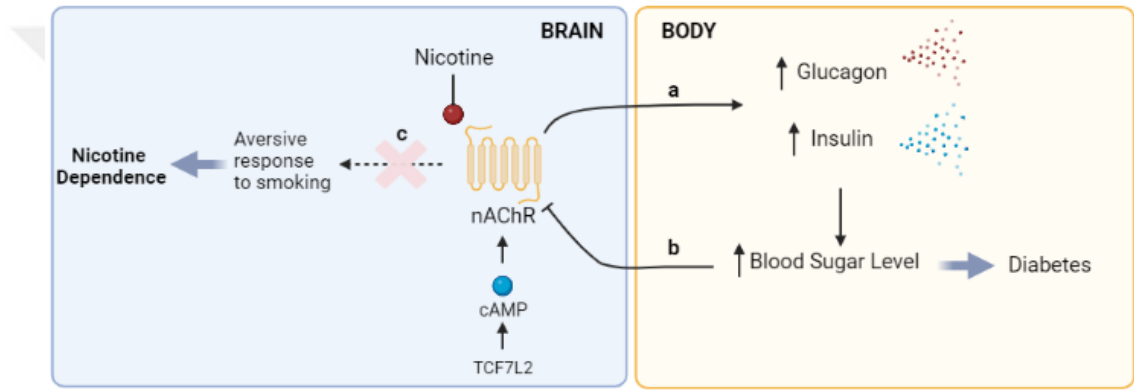
Duncan ve arkadaşları, yakın zamanda yaptıkları bir çalışmada mHb'de nAChR ifade eden nöronlar ile pankreas tarafından kan glukoz düzenlemesi arasında bir sinyal yoluna işaret etmişlerdir.

Bu yolak içerisinde, diyabetle ilişkilendirilen bir transkripsiyon faktörü olan TCF7L2 yer almaktadır. TCF7L2, GLP-1 hormonunun üretimini ve salınımını düzenleyen bir sinyal yolunun bir parçası olarak yer almaktadır. GLP-1, pankreastan insulin salınımını teşvik etmektedir ve insulin kan dolaşımından dokulara glukoz Emilimini artırarak yağ olarak depolanmasını sağlamaktadır. Dolayısıyla, TCF7L2'nin ifade veya aktivitesindeki değişiklikler glukoz metabolizmasını etkileyebilmektedir. Nikotin, mHb nöronlarını TCF7L2'ye bağımlı bir şekilde uyarak, pankreasa nöronal sinyal gönderdiği ve böylece kan glukoz seviyelerini değiştirdiği düşünülmektedir (Bruschetta & Diano, 2019; Duncan et al., 2019; Z. Liu & Habener, 2008) (Şekil 2).



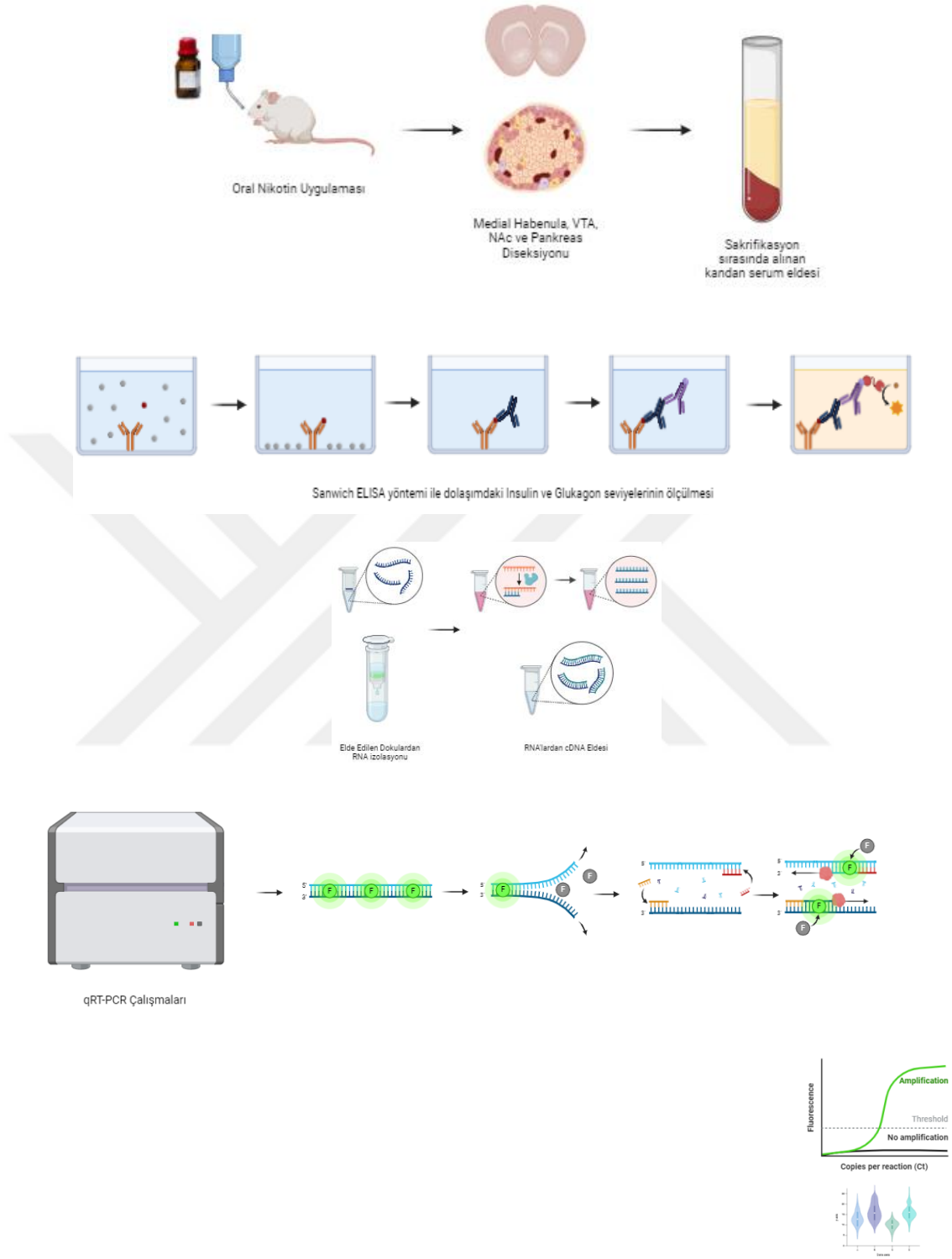
Şekil 3: TCF7L2'nin nikotinik motivasyonel özelliklerini ve kan şekeri homeostazi üzerindeki yıkıcı etkilerini düzenlediği önerilen mekanizma. Fasciculus retroflexus aracılığıyla monosinaptik olarak IPN'ye (her ikisi de mavi renkte) ve polisinaptik bir yol (kesik çizgi) aracılığıyla pankreasa projeksiyon yapan bir mHb nöronunun temsili gösterilmektedir (Duncan et al., 2019).

2011 yılında yayınlanan bir rapor, her yıl sigara içenlerin yalnızca %6'sının sigarayı başarılı bir şekilde bıraktığını ve verilerin diyabet hastalarının sigarayı bırakmasının, bu rahatsızlığı olmayanlara göre daha zor olduğunu gösterdiğini belirtmiştir. Bir dizi deneyde, Duncan ve arkadaşları farelere 6 hafta boyunca her gün sükröz vermiş ve kan şekeriindeki müteakip artışın TCF7L2 seviyelerinin düşmesine ve nAChR eksprese eden nöronlarda nikotinle uyarılan aktivitede azalmaya yol açtığını göstermiştir. Bu gözlem, diyabetli kişilerin sigarayı bırakmasının neden daha zor olduğunu açıklayabilecek bir geri bildirim mekanizmasına işaret etmektedir (Bruschetta & Diano, 2019; Solberg, Desai, O'Connor, Bishop, & Devlin, 2004) (Şekil3).



Şekil 4: Nikotin, diyabet ve bağımlılık arasındaki ilişki. Nikotin, nöronlardaki nikotin asetilkolin reseptör (nAChR) proteinlerini aktive eder. Beynin medial habenula (mHb) bölgesindeki nAChR eksprese eden nöron popülasyonunun aktivasyonu nikotine karşı aversif tepkilere yol açar (Bruschetta & Diano, 2019).

3. GEREÇ VE YÖNTEM



Şekil 5: Tüm Deney Protokolünün Şematik Olarak Özeti

3.1. Araştırmanın Tipi

Araştırma in vivo ve ex vivo çalışmalardan oluşmuş olup, deneysel bir çalışmadır.

3.2. Araştırmanın Yeri ve Zamanı

Araştırmanın in vivo kısmını oluşturan bütün çalışmalar, dekapitasyon ve diseksiyon da dahil olmak üzere Ege Üniversitesi Laboratuvar Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde yapılmış olup, dokular elde edildikten sonraki moleküler çalışmaların hepsi Ege Üniversitesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı laboratuvarlarında gerçekleştirilmiştir. Çalışmalar Ağustos 2023 tarihinde başlamış olup, Mayıs 2024 tarihinde tamamlanmıştır. Tez savunmasının ise Ağustos 2024 tarihinde yapılması planmaktadır.

3.3. Araştırmanın Evreni ve Örneklemi

Çalışmada kullanılacak tüm deney hayvanları Sprague-Dawley cinsi olup, Mayıs 2023 doğumludur ve Ege Üniversitesi Laboratuvar Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezi'nden temin edilmiştir. Dişi sıçanların menstrüel döngülerinden dolayı hormonal değişiklikler yaşayabilmekteydiler, bunun beyin üzerinde çeşitli etkilere sebep olarak nikotin tüketimini etkileceği düşünülmektedir. Bu ise elde edilecek verilerin etkilenme potansiyeli sebebi ile erkek sıçanlar tercih edilerek çalışma planlanmıştır. Bu çalışmada nesiller boyu üretilen ve maksimum oranda nikotin tüketen 30. nesilden 20 adet erkek sıçan, aynı tarihlerde doğan 20 adet naîve erkek sıçan olmak üzere toplamda 40 adet 12 haftalık Sprague-Dawley erkek sıçan kullanılmıştır.



Şekil 6: Nikotin Uygulamasından önce deney hayvanı

3.4. Araştırmanın Bağımlı ve Bağımsız Değişkenleri

Nikotin bağımlı soydan gelmeleri ve nikotin uygulaması bağımsız değişkenken, içilen su miktarı, cinsiyet, belirlenen genlerin izole edilen beyin ve pankreasta ekspresyon seviyeleri ile kan ve serumdan bakılan glukoz seviyesi, dolaşımdaki glukagon ve insülin seviyeleri bağımlı değişkenler arasında yer almaktadır.

3.5. Veri Toplama Yöntemleri

Çalışmada, Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı'ndan temin edilecek nikotin bağımlı sıçan soyları kullanılmıştır.

Elde edilen veriler, unpaired t-test, Mann-Whitney U testi, one-way ANOVA/Bonferroni çoklu karşılaştırma testleri uygun oldukları testlere göre kullanılarak analiz edilecektir. Veriler ortalama ($\pm$ SD) ya da medyan ve çeyrekler açıklığı olarak yayınlanacaktır.

Tcf7l2, *Bdnf*, *Gsk3 β* , *Glp1-r*, *Chrna7* ACTB genlerin ekspresyon düzeyleri qRT-PCR ile LightCycler® 480 cihazında belirlenmiştir.

Ayrıca, deney ve kontrol grupları arasındaki istatistiksel farklılıklar Windows SPSS 22.0 programı kullanılarak post-hoc testleriyle analiz edilmiştir ve $p < 0.05$ değerleri anlamlı olarak kabul edilmiştir. qRT-PCR sonuçları $\Delta\Delta$ CT yöntemiyle hesaplanmış olup, deneyler 3-tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir.

3.6. Deney Grupları ve Hayvanlara Nikotin Uygulanması

Tüm deney hayvanı çalışmaları, hayvanları refahı gözetilerek ve T.C. Tarım Orman Bakanlığı yönergeleri izlenerek gerçekleştirilmiştir. Tüm bu çalışmalar Ege Üniversitesi HADYEK'ten alınan etik kurul onayından sonra gerçekleştirilmiştir (Etik Kurul Onay No: 2022-072R1).

Bu çalışmada, seçici tohumlama yöntemi kullanılarak oluşturulmuş nikotini yüksek oranda tercih eden sıçan soyu kullanılmıştır. Kullanılan deney hayvanları, bu yöntem ile üretilen 30. nesile ait sıçanlardır. Çalışma boyunca 12:12 aydınlık-karanlık döngüsü (07:00am-07:00pm) takip edilerek oda sıcaklığı 21-22°C olarak tutulmuştur. Deney sırasında hayvanların tamamı tekli olarak kafeslenmiştir.

Yem, su ve nikotine erişimleri ad libitum olarak tutulmuştur. Hayvanların ağırlık ve nikotin takipleri deney sırasında düzenli olarak takip edilmiştir. Deney grupları Tablo 1’de gösterilmiştir.

Tablo 1. Deney Grupları

1. Grup	Naive Kontrol + Su (n=10)
2. Grup	Naive Kontrol + Nikotin (n=10)
3. Grup	Nikotin Tercih Eden Soy + Su (n=10)
4. Grup	Nikotin Tercih Eden Soy + Nikotin (n=10)

Deney hayvanlarının bütün besleme, bakım ve nikotin uygulamaları Ege Üniversitesi HAYMER merkezinde yapılmıştır.

Çalışma başlamadan önce ötenazi kriterleri belirlenmiş olup bunlar; %20’den fazla kilo kaybı, kambur durma eğilimi, zayıflamış fiziksel ve/veya metal durum, nöbet durumları, kaşeksi, uyuşukluk durumu ve nörolojik semptomlardır. Fakat deney süresince herhangi bir kayıp yaşanmamıştır.

In vivo oral nikotin uygulanması sorununda deney hayvanları dekapite edilip, beyin dokuları ve pankreas diseke edilmiştir. Bunun yanı sıra her hayvandan alınan kan, tüplere toplanmıştır. Elde edilen doku ve kanlar daha sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere -80°C’de saklanmıştır.



Şekil 7: Tekli kafeslere ayrılmadan önce deney hayvanları

3.7. Nikotin Uygulaması

40 adet Sprague-Dawley sıçan Ege Üniversitesi HAYMER merkezinden temin edildikten sonra, tekli kafeslenerek ortama adapte olmaları için iki hafta beklenmiştir.

Daha sonrasında oluşturulan gruplara nikotin uygulamasına başlanmıştır. Nikotin içme sularına karıştırılacak hayvanlara verildiği için, sulukları kafeslere takmadan önce pH değerleri 7,4 olarak ayarlanmıştır. Her kafeste 2 adet suluk bulunmaktadır. Nikotin uygulanan gruplardaki hayvanların kafeslerindeki bir suluk nikotin içerirken, diğer suluk ise saf içme suyu içermektedir. Böylelikle nikotin zorunlu kılınmamış olup, tercihe bırakılmıştır ve bu şekilde sıçanların nikotin tercih edip etmeyeceği araştırılmıştır. Nikotinin oluşturduğu acı tadı gidermek için normalde hacimce %0,2 sakkarin eklenebilmektedir, bu şekilde deney hayvanlarının nikotine alışma süreçleri hızlandırılmış olmaktadır. Fakat sakkarin uygulaması çalışmamızda incelenecek olan insulin, glukagon ve açlık kan glukozu gibi biyokimyasal parametreleri etkileyeceğinden tercih edilmemiştir. Aynı zamanda yapılan bazı çalışmalarda sakkarinin ödül mekanizmasını uyaracağı gösterilmiştir. Bu sebepten dolayı sulara sakkarin eklenmeyip, düşük dozda nikotin uygulaması ile başlayarak bağımlılık modeli oluşturulmuştur. İki haftalık adaptasyon süresi sonrasında deney hayvanlarının araştırmacılara alışması amacıyla handling uygulaması yapılmıştır. Şekil 3'deki deney planında da gösterildiği üzere, nikotin uygulamasına başlamadan önce tüm gruplardaki tüm hayvanlardan bazal seviyedeki biyokimyasal parametreleri tespit etmek için kan alınmıştır.

Daha sonra nikotin uygulancak gruplara, ilk iki haftada litrede 10mg olacak şekilde (10mg/L) içme sularına nikotin karıştırılarak uygulanmıştır. Bu iki haftadan sonra nikotinin dozu iki katına çıkarılarak nikotin uygulancak gruplara litrede 20mg olacak şekilde (20mg/L) uygulanmıştır. Çalışma sonu olan 6. haftanın sonuna kadar bu doz uygulanmıştır. Gruplara uygulanan dozlar Tablo 2'deki çalışma dizaynı tablosunda gösterilmiştir.

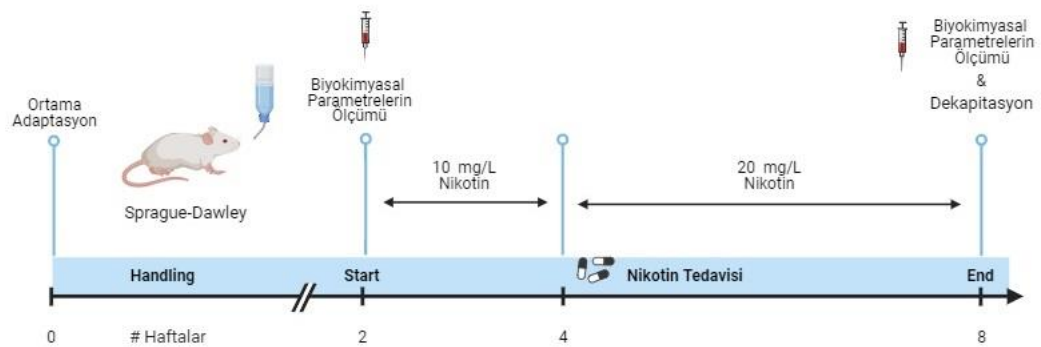
Tablo 2. Çalışma Dizaynı

Gruplar	2 Hafta	1.Hafta	2.Hafta	3-6.Hafta	7.Hafta
Kontrol+Su	Adaptasyon & Handling	Su	Su	Su	0 saat yoksunluk & Dekapitasyon
Kontrol+Nikotin		10mg/L Nikotin	10mg/L Nikotin	20mg/L Nikotin	
Nikotin Tercih Eden Soy + Su		Su	Su	Su	
Nikotin Tercih Eden Soy + Nikotin		10mg/L Nikotin	10mg/L Nikotin	20mg/L Nikotin	



Şekil 8. Nikotin bağımlı soydan gelen deney hayvanı

Çalışmadaki tüm gruplar 6. hafta bittiğinde dekapitasyon işlemine tabi tutulmuştur. Bütün deney hayvanlarının dekapitasyon işlemleri 09:00am-11:00am zaman diliminde gerçekleştirilmiştir. PCR ve biyokimyasal sonuçlardan elde edilecek verilerin etkilenmemesi için dekapitasyon işlemi sırasında anestezik bir madde kullanılmamıştır.



Şekil 9. Çalışma Planı

3.8. Dokuların Diseksiyonu

Nikotin uygulamasından sonra, sıçanlar bir giyotin kullanılarak başları kesilmiş, beyinleri çıkarılmış ve ilgilenilen beyin bölgeleri buz üzerinde diseke edilmiştir. Diseksiyon tekniği daha önce Birdogan ve arkadaşları tarafından tarif edilmiştir (BİRDOĞAN A., 2021). Diseksiyonun başında dört koronal beyin dilimi hazırlanmıştır. Beyin dilimlerini elde etmek için Paxinos ve Watson'ın sıçan beyin atlasında belirtilen stereotaksik koordinatları kullanılmıştır (Paxinos G, 2006). Bregmaya göre rostral-kaudal dilim koordinatları;

İlk dilim için 5.20-2.20 mm,

İkinci dilim için 2.20-0.20 mm,

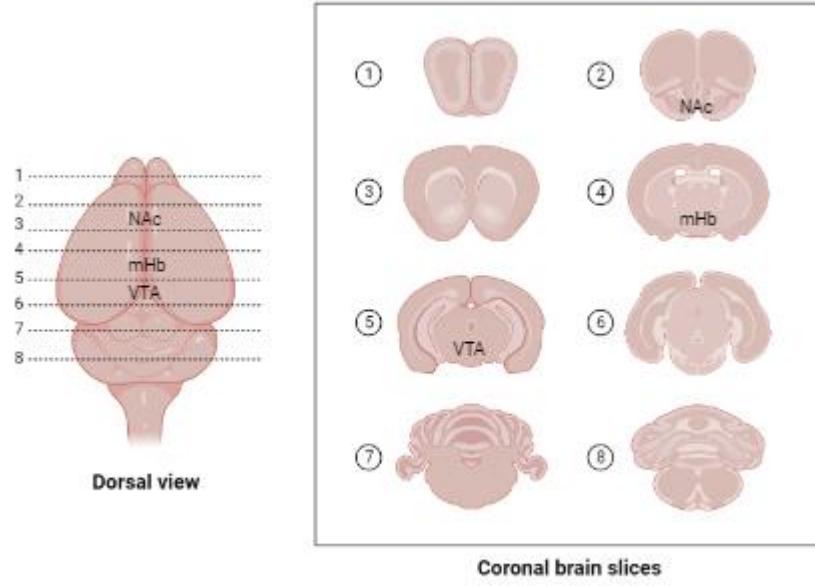
Üçüncü dilim için -1.40--3.30 mm,

Dördüncü dilim için -4.30--6.30 mm olarak belirlenmiştir.

İlk dilim mPFC ve infralimbik, prelimbik ve anterior singulat korteksleri içermektedir. Dorsal striatum (DST), NAc ve septum (lateral ve medial septal alanlar) doku örnekleri ikinci dilim içerisinde yer almaktadır. Medial hipotalamik alan (MHA), AMG, hipokampus (HIP) ve mHb doku örnekleri üçüncü dilimde bulunmaktadır. Son olarak, VTA ise dördüncü dilimde yer almaktadır.

Bu çalışmada kullanılan NAc ilk dilimden, mHb üçüncü dilimden ve VTA ise dördüncü dilimden kesilerek çıkarılmıştır.

NAc, mHb ve VTA'nın diseksiyonu beyin punch aparatı kullanılarak yapılmıştır.



Şekil 10. Koronal Beyin Kesitleri

3.9. Biyokimyasal Analizler

Nikotin uygulamasından sonra sıçanlar sakrifiye edilirken “*trunk blood*” toplanmıştır. Akan kanın bir kısmı mor kapaklı K2 EDTA içeren bu tüplere alınırken, bir kısmı ise serum eldesi için özel jel formülasyonu içeren sarı kapaklı tüplere alınmıştır.

Mor kapaklı tüplere alınan kanlar alt üst yapılarak pıhtılaşması engellenmiştir. Bu tüplerdeki kanlardan açlık kan glukozu ve hemogram değerleri analiz edilmiştir.

Kan glukoz değerleri strip yardımı ile tespit edilirken, hemogram değerleri Ege Üniversitesi HAYMER merkezinde bulunan hasvet vh5r lazer kan sayım cihazı ile tespit edilmiştir.

Sarı kapaklı tüplerdeki kanlar ise 1000 xg de 15 dakika santrifüj edilerek serum elde edilmiştir. Bu serumlar daha sonraki analizlerde kullanılmak üzere -20°C’de saklanmıştır. Elde edilen serumlardan dolaşımdaki insulin ve glukagon hormonlarının seviyeleri ELISA yöntemi kullanılarak tespit edilmiştir.

İnsulin için, Elabscience® Rat INS(Insulin) ELISA Kit (Catalog No: E-EL-R3034) kullanılırken, glukagon için Elabscience® Rat GC(Glucagon) ELISA Kit (Catalog No: E-EL-R0425) kullanılmıştır.

Bu analizler üretici firmanın protokolüne uygun olarak gerçekleştirilmiştir.

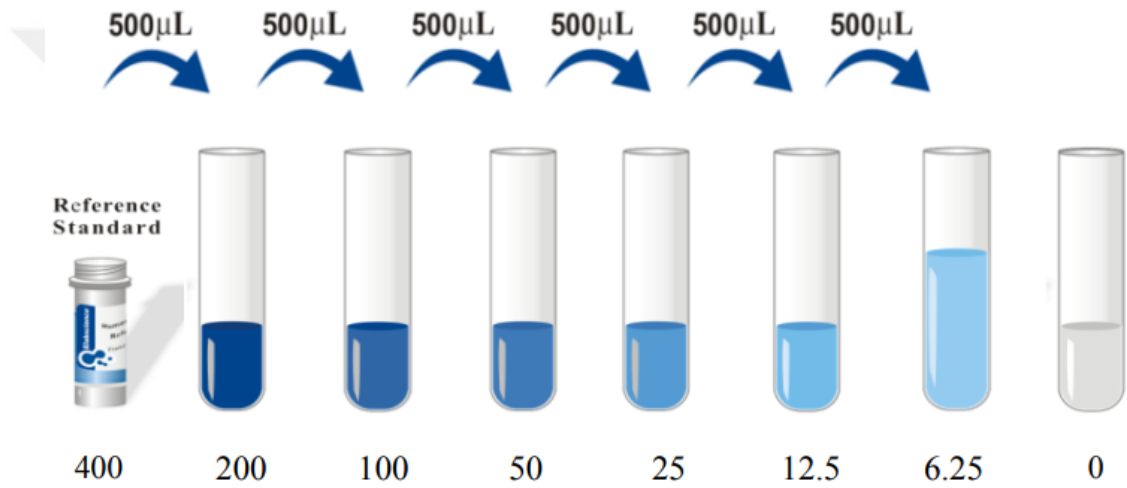
İnsulin Analiz Protokolü;

- Deneylere başlanmadan önce kit içeriğindeki reagent'lar üretici firmanın talimatlarına uyularak hazırlanmıştır.
 - Standart solüsyonu, referans standart ve numune dilue edici reagent ile Şekil 6'da gösterildiği gibi hazırlanmıştır. Bu şekilde 400 pg/mL'lik standart solüsyon hazırlanmış olmaktadır.
 - Biotinlenmiş Ab solüsyonu ve HRP Konjugat çözeltisi 100x konsantrasyonundadır ve bunlar kullanılmadan önce numune dilue edici reagent ile 1:99 oranında seyreltilerek kullanılmıştır.
 - Kullanılacak olan numunelerin konsantrasyon aralığı bilinmediği için, konsantrasyonu belirlemek amacı ile ön deneyler yapılmıştır ve bu oran insulin için 1:10 dilüsyon olarak tespit edilmiştir.
1. Deney aşamasına geçildiğinde, uygun kuyucuklara standart, blank ve numunenin her bir dilüsyonundan 100 µL eklenmiştir. Plate üzeri seal ile kaplanarak 37°C'de 90 dk boyunca inkübasyona bırakılmıştır.
 2. İnkübasyon sonrasında kuyucuklardaki sıvı uzaklaştırılarak, her bir kuyucuğa hızlı bir şekilde 100 µL Biotinlenmiş Ab solüsyonu eklenmiştir. Plate yeni bir seal ile kapatılarak, 37°C'de 1 saat boyunca inkübe edilmiştir.
 3. İnkübasyon sonrasında kuyucuklardaki sıvı uzaklaştırılarak, her bir kuyucuğa 350 µL yıkama tamponu eklenmiştir. 1 dk bekledikten sonra, yıkama solüsyonu aspire edilerek bu işlen üç kez tekrarlanmıştır (bu aşamada her bir yıkama arasında kuyucukların kurummasına izin verilmemelidir).
 4. Yıkama aşamasından sonra, her bir kuyucuğa 100 µL HRP Konjugat solüsyonu eklenmiştir. Plate yeni bir seal ile kaplanarak, 37°C'de 30 dakika boyunca inkübe edilmiştir.
 5. İnkübasyon sonrasında kuyucuklardaki sıvı uzaklaştırılarak, 3. basamaktaki yıkama aşaması 5 kez tekrar edilmiştir.
 6. Bu aşamadan sonra ise, her bir kuyucuğa 90 µL Substrat Reaktifi eklenmiştir. Plate yeni bir seal ile kaplanarak, 37°C'de 15 dakika inkübe edilmiştir.

Bu aşamada plate ışıktan korunmalıdır. Not: Reaksiyon süresi gerçek renk değişimine göre kısaltılabilir veya uzatılabilir, ancak 30 dakikadan fazla olmamalıdır.

7. Son olarak her bir kuyucuğa 50 μ L Stop Solüsyonu eklenmiştir.
8. Ardından, Plate hızlı bir şekilde 450 nm (Optical Density- OD değeri) ayarlanmış bir mikro plaka okuyucu ile tek seferde okutulmuştur.

Standart solüsyonların OD değerlerine göre standart eğri grafiği çizilmiştir. Bu eğrinin denkleminde yola çıkarak her bir örneğin insülin değerleri hesaplanmıştır.



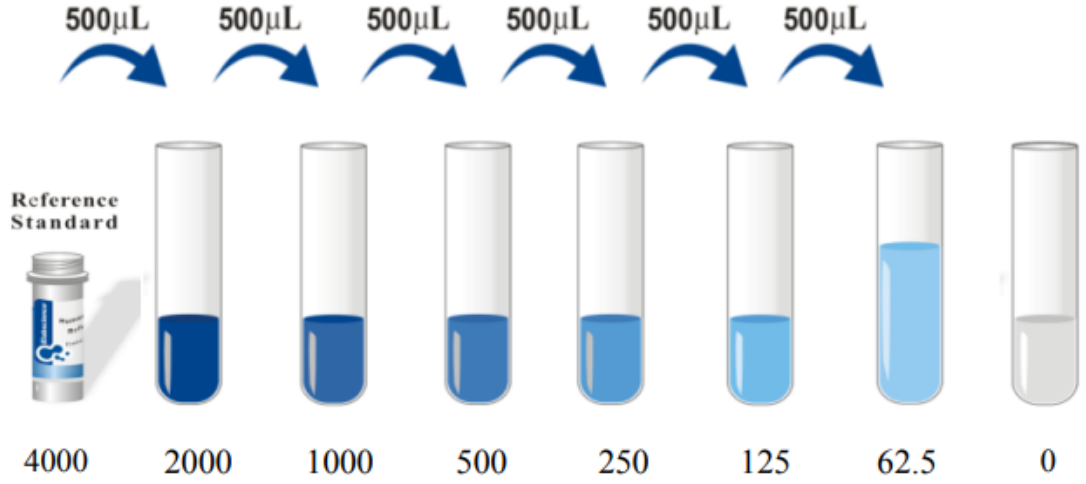
Şekil 11. Elabscience® Rat INS(Insulin) ELISA Kit (Catalog No: E-EL-R3034) standart solüsyon hazırlama

Glukagon Analiz Protokolü;

- Deneylere başlanmadan önce kit içeriğindeki reagent'lar üretici firmanın talimatlarına uyularak hazırlanmıştır.
- Standart solüsyonu, referans standart ve numune dilue edici reagent ile Şekil 7'de gösterildiği gibi hazırlanmıştır. Bu şekilde 4000 pg/mL'lik standart solüsyon hazırlanmış olmaktadır.
- Biotinlenmiş Ab solüsyonu ve HRP Konjugat çözeltisi 100x konsantrasyonundadır ve bunlar kullanılmadan önce numune dilue edici reagent ile 1:99 oranında seyreltilerek kullanılmıştır.

- Kullanılacak olan numunelerin konsantrasyon aralığı bilinmediği için, konsantrasyonu belirlemek amacı ile ön deneyler yapılmıştır ve bu oran insulin için 1:50 dilüsyon olarak tespit edilmiştir.
1. Deney aşamasına geçildiğinde, uygun kuyucuklara standart, blank ve numunenin her bir dilüsyonundan 50 µL eklenmiştir ve bunun üzerine hemen 50 µL Biotinlenmiş Ab solüsyonu eklenmiştir. Plate üzeri seal ile kaplanarak 37°C'de 45 dk boyunca inkübasyona bırakılmıştır.
 2. İnkübasyon sonrasında kuyucuklardaki sıvı uzaklaştırılarak, her bir kuyucuğa 350 µL yıkama tamponu eklenmiştir. 1 dk bekledikten sonra, yıkama solüsyonu aspire edilerek bu işlem üç kez tekrarlanmıştır (bu aşamada her bir yıkama arasında kuyucukların kurummasına izin verilmemelidir).
 3. Yıkama aşamasından sonra, her bir kuyucuğa 100 µL HRP Konjugat solüsyonu eklenmiştir. Plate yeni bir seal ile kaplanarak, 37°C'de 30 dakika boyunca inkübe edilmiştir.
 4. İnkübasyon sonrasında kuyucuklardaki sıvı uzaklaştırılarak, 2. basamaktaki yıkama aşaması 5 kez tekrar edilmiştir.
 5. Bu aşamadan sonra ise, her bir kuyucuğa 90 µL Substrat Reagent eklenmiştir. Plate yeni bir seal ile kaplanarak, 37°C'de 15 dakika inkübe edilmiştir. Bu aşamada plate ışıktan korunmalıdır. Not: Reaksiyon süresi gerçek renk değişimine göre kısaltılabilir veya uzatılabilir, ancak 30 dakikadan fazla olmamalıdır.
 6. Son olarak her bir kuyucuğa 50 µL Stop Solüsyonu eklenmiştir.
 7. Ardından, Plate hızlı bir şekilde 450 nm (OD değeri) ayarlanmış bir mikro plaka okuyucu ile tek seferde okutulmuştur.

Standart solüsyonların OD değerlerine göre standart eğri grafiği çizilmiştir. Bu eğrinin denkleminde yola çıkarak herbir örneğin glukagon değerleri hesaplanmıştır.



Şekil 12. Elabscience® Rat GC(Glucagon) ELISA Kit (Catalog No: E-EL-R0425) standart solüsyon hazırlama

3.10. Total RNA İzolasyonu

Taze bir şekilde diseke edilen VTA, NAc, mHb ve pankreas dokuları RNAlater™ Stabilization Solution (Cat No. AM7021) içerisinde, çalışmalar gerçekleştirilinceye kadar protokolüne uygun olacak şekilde saklanmıştır.

RNAlater içerisinde doku saklama protokolü;

- RNAlater sadece taze dokuların uzun süreler saklanabilmesi için gerekli olan bir solüsyondur.
- Doku RNAlater solüsyonu içersine bırakılmadan önce ≤ 0.5 cm'den küçük parçalara kesilmelidir.
- Bu işlemten sonra doku, hacminin 5-10 katı hacimdeki RNAlater solüsyonu içersine bırakılmaktadır. Bu şekilde solüsyon hücrelere nüfuz ederek RNA'yı stabilize etmektedir.
- RNAlater® Solüsyonundaki çoğu numune, RNA kalitesinden ödün vermeden oda sıcaklığında 1 hafta veya -20°C veya -80°C 'de süresiz olarak saklanabilmektedir.
- Örnekleri RNAlater® Solüsyonu içinde hemen dondurulmamaktadır; gece boyunca 4°C 'de saklanmaktadır (solüsyonun dokuya iyice nüfuz etmesini sağlamak için)

- Daha sonra süpernatant uzaklaştırılarak, uzun süreli saklama için -80°C'ye kaldırılmıştır.

Örnekler daha sonra süresiz olarak -20°C veya -80°C'de saklanabilmektedir. Bunun yanı sıra bir aya kadar 4°C'de veya bir haftaya kadar 25°C'de saklanabilmektedir.

RNA izolasyonu için doku basitçe RNAlater solüsyonundan çıkarılır ve yeni alınmış gibi muamele edilmektedir. Çoğu doku doğrudan bir lizis tamponuna aktarılabilen ve homojenize edilebilmektedir. RNAlater solüsyonu ile muamele edilip dondurulan numuneler havan yardımı ile öğütülebilir veya çözündürülebilir. RNazlar zaten inaktive edildiğinden hücre rüptürü ve RNaz salınımı endişesi olmadan taze doku gibi işlenebilmektedir.

Total RNA izolasyon öncesinde, doku steril forsepsle RNAlater® Solüsyonundan alındı, fazla RNAlater® Solüsyonunu steril kurutma kağıtları aracılığı ile hızlıca kurulandı ve ardından örneği RNA izolasyon lizis solüsyonu içerisine alındı. Dokuyu lizis/denatürasyon solüsyonu içerisine alındıktan hemen sonra homojenize edilmiştir.

Total RNA izolasyonu için iki farklı yöntem kullanılmıştır. Bunlardan birinde NucleoZOL reagent (MACHEREY-NAGEL, Ref No. 740404.200) kullanılmışken, diğeri ise NucleoSpin RNA, Mini kit for RNA purification (MACHEREY-NAGEL, Ref No. 740955.50) kit kullanılmıştır.

NucleoZOL reagent aracılığı ile Total RNA izolasyonu protokolü;

- RNAlater® Solüsyonu içerisinden alınan 100 mg doku için 1 ml NucleoZOL reagent eklenerek pellet pestle aracılığı mekanik olarak doku parçalanmıştır (bu oran DNA içeriği bakımından zengin dokularda 50mg doku için 1 ml NucleoZOL reagent olarak kullanılmalıdır).
- Beyin dokuları yağ açısından zengin dokular olduğu için, mekanik parçalama sonrasında örnekler 12,000 x g'de 5 dk santrifüj edilmiştir.

Santrifüj sonrasında yağ tabaka tüpün en üstünde yer almaktadır. Pipet ucu aracılığı ile bu tabaka delinerek süpernatant başka bir tüpe aktarılmıştır ve bu örnekler üzerinden çalışmaya devam edilmiştir.

- Daha sonra 1 ml NucleoZOL lizatı için 400 µL RNase-free su tüp içersine eklenmiştir, 15 sn. boyunca örnekler hızlı bir şekilde çalkalanmıştır ve 15 dk. boyunca oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır.

- İnkübasyon sonrasında örnekler 12,000 x g'de 15 dk santrifüj edilmiştir (santrifüj 4–28 °C arasında olmalıdır).
- Santrifüj sonrasında, 1 ml süpernatant yeni bir tüpe transfer edilmiştir ve bunun üzerine 1ml isopropanol eklenerek oda sıcaklığında 10 dk. boyunca oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır (Burdaki amaç kısaca RNA çökmesini sağlamaktır. İsoopropanol, nükleik asitleri kromatografik olarak izole etmek ve izole edilen nükleik asitlerin hücrelerdeki transfeksiyon verimliliğini artırmak için RNA izolasyonunda kullanılmaktadır. Ayrıca İsoopropanol RNA'yı çöktirmede etanolden daha etkilidir. İnkübasyon süresi 4 °C'de 30 dakikaya kadar arttırılabilir).
- İnkübasyon sonrasında örnekler 12,000 x g'de 10 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrasında tüpün dibinde beyaz RNA pelleti görülmektedir. Süpernatant uzaklaştırılarak pelletin yıkanması aşamasına geçilmiştir.
- Santrifüj sonrasında, isopropanol uzaklaştırılarak pellet üzerine 600 µL 75 % ethanol eklenmiştir. Sonrasında 3dk. 8,000 x g'de santrifüj edilmiştir. Bu aşama bir kez daha tekrarlanmıştır (Pelletin kurumamasına dikkat etmek lazım, kuruyan pelletin sudaki çözünmek oranı düşmektedir.)
- Yıkama aşamasından sonra etanol pipet yardımıyla tamamen uzaklaştırılmıştır ve 2-5 dk arasında oda sıcaklığında beklenerek kalan etanolün uçması sağlanmıştır.
- Daha sonrasında 1–2 µg/µL konsantrasyon olacak şekilde pelletler RNase-free suda çözülmüştür.

NucleoSpin RNA, Mini kit for RNA purification kiti aracılığı ile Total RNA izolasyonu protokolü;

- Kullanılan bu kit 200 µg RNA bağlama kapasitesine sahiptir.
- RNAlater® Solüsyonu içerisinden alınan 30 mg doku için 350 µL RA1 Buffer ve 3.5 µL β-mercaptoethanol eklenerek pellet pestle aracılığı mekanik olarak doku parçalanmıştır.

Bu aşamada kuvvetli bir şekilde vorteks yapılabilir (β -ME'e alternatif olarak indirgeyici ajan DTT veya TCEP kullanılabilir.)

- Vizkoziteyi azaltmak için lizat NucleoSpin® Filtre'den (mor halkalı filtreden) geçirmek gerekmektedir. Lizat filtre üzerine eklenerek 11.000 x g'de 1 dakika santrifüj edilmiştir.
- Filtre atılmıştır ve filtreden geçen lizat üzerine 350 μ L %70'lik ethanol eklenerek iyice pipetaj yapılmıştır.
- Daha sonra bu lizat NucleoSpin® RNA Kolon'a (açık mavi halkalı filtre) yüklenmiştir ve 11.000 x g'de 30 saniye santrifüj edilmiştir (NucleoSpin® RNA Kolonlarının maksimum yükleme kapasitesi 750 μ L'dir. Daha büyük hacimler işlenecekse prosedürü tekrarlanmalıdır.)
- Filtreden geçen kısım atılarak, filtre üzerine 350 μ L MDB (Membrane Desalting Buffer) eklenmiştir ve 11.000 x g'de 1 dakika santrifüj edilmiştir (buradaki MDB devam eden basamaktaki rDNase aşamasını daha etkili hale getirmektedir.)
- Santrifüj sonrasında 95 μ L DNaz reaction mix doğrudan kolonun içerisindeki silika membranının ortasına eklenmiştir ve oda sıcaklığında 15 dakika inkübe edilmiştir (DNaz reaction mix steril bir 1,5 mL mikrosantrifüj tüpünde hazırlanmalıdır: Her örnek için 10 μ L sulandırılmış rDNaz üzerine 90 μ L rDNaz reaction buffer eklenmektedir ve totalde 100 μ L olan karışımdan 95 μ L kullanılmaktadır).
- Bu aşamadan sonra silica membranı yıkama ve kurutma aşaması gelmektedir. 200 μ L RAW2 Buffer NucleoSpin® RNA Kolon'a eklenerek, 11.000 x g'de 30 saniye santrifüj edilmiştir (her santrifüj sonrası 2ml'lik toplama tüpü değiştirilmiştir.)
- Santrifüj sonrasında filtreyi geçen kısım atılarak, filtre üzerine 600 μ L RA3 Buffer eklenmiş ve 11.000 x g'de 30 saniye santrifüj edilmiştir.
- Son aşama tekrarlanarak filtreyi geçen kısım atılmış olup, filtre üzerine 250 μ L RA3 Buffer eklenmiş ve 11.000 x g'de 2 saniye santrifüj edilmiştir.

- Bu santrifüj sonrasında yıkama aşaması tamamlanarak elution kısmına geçilmiştir.
- Santrifüj sonrasında filtreyi geçen kısım atılarak, filtre üzerine 60 µL 60 µL RNase-free H₂O eklenip ve 11.000 x g'de 1 dakika santrifüj edilmiştir (Daha yüksek RNA konsantrasyonları isteniyorsa elution 40 µL ile yapılabilir. Ancak daha küçük hacimler kullanıldığında genel verim azalacaktır.)

NucleoSpin® RNA		
1 Homogenize sample		30 mg
2 Lyse cells		350 µL RA1 3.5 µL β-mercaptoethanol Mix
3 Filtrate lysate	 	11,000 x g, 1 min
4 Adjust RNA binding conditions		350 µL 70 % ethanol Mix
5 Bind RNA	 	Load sample 11,000 x g, 30 s
6 Desalt silica membrane	 	350 µL MD3 11,000 x g, 1 min
7 Digest DNA		95 µL DNase reaction mixture RT, 15 min
8 Wash and dry silica membrane	  	1 st wash 200 µL RAW2 2 nd wash 600 µL RAG 3 rd wash 250 µL RAG 1 st and 2 nd 11,000 x g, 30 s 3 rd 11,000 x g, 2 min
9 Elute highly pure RNA	 	60 µL RNase-free H ₂ O 11,000 x g, 1 min

Şekil 13. NucleoSpin RNA, Mini kit for RNA purification kiti aracılığı ile Total RNA izolasyonu özeti

3.11. İzole Edilen RNA'ların Kalite ve Miktar Tayini

RNA ekstraksiyonu sonrasında elde edilen RNA'ların saflığını ve konsantrasyonunu belirlemek amacı ile UV spektrofotometre ile (NanoDrop ND-1000 UV/VIS, Thermo Scientific) örneklerin ölçümleri gerçekleştirilmiştir.

Buna ek olarak cDNA sentezi öncesinde tüm RNA'ları aynı konsantrasyonda reaksiyona tabi tutmak amacı ile spektrofotometrik ölçümler gerçekleştirilmiştir.

Nükleik asitler ve proteinler sırasıyla 260 ve 280 nm'de maksimum absorbans değerlerine sahiptirler. Bu dalga boylarındaki absorbansların oranı hem nükleik asit hem de protein ekstraksiyonlarında saflığın bir ölçüsü olarak kullanılmaktadır. DNA için ~1.8'lik bir oran genellikle "saf" olarak kabul edilirken; RNA için ~2.0'lık bir oran genellikle "saf" olarak kabul edilmektedir.

Benzer şekilde, 230 nm'deki absorbansın organik kontaminasyonların sonucu olduğu kabul edilmektedir; bu nedenle A260/A230 oranı da sıklıkla hesaplanmaktadır. Nükleik asitin "Saf" olarak değerlendirilebilmesi için 260/230 değerleri genellikle ilgili 260/280 değerlerinden daha yüksektir. Beklenen 260/230 değerleri 2.0-2.2 aralığında olduğunda genellikle "Saf" olarak nitelendirilmektedir.

Ölçülen örneklerimiz RNA olduğu için, OD260 absorbans değerine karşılık gelen değerler dikkate alınarak hesaplamalar yapılmıştır.

cDNA sentez kitinin, RNA template miktarı için bize önerdiği aralık reaksiyon başına 1 ng - 2 µg total RNA'dır. Bu göz önüne alınarak cDNA sentezi öncesinde RNA konsantrasyonları tüm örnekler için 1 µg /µL olarak ayarlanmıştır. Bu oran bilerek yüksek tutulmuştur çünkü RNA izolasyonu sırasında mRNA değil total RNA izolasyonu yapılmıştır. Daha sonra gerçekleştirilecek olan qPCR deneylerinde, bir genin ekspresyon seviyesini mRNA tespit edilmektedir. Diğer bir deyişle, total RNA'nın ~%80 kadarını rRNA'ların oluşturduğunu düşünürsek 1 µg /µL total RNA'dan cDNA sentezi yaptığımızda 1:1 oranında ters transkriptaz olduğunu varsaysak bile mRNA miktarının bunun içinde az olduğu görülmektedir. Bu nedenle cDNA sentez öncesinde RNA konsantrasyonu yüksek seviyelerde eşitlenmiştir.

Bütün bunlara ek olarak cDNA sentezi öncesi RNA'nın degrade olup olmadığını görebilmek için, %1,5 denatüre edici agaroz jel üzerinde yürütülmüştür.

RNA örneklerinde 18S ve 28S ribozomal RNA bantlarının açıkça görülmesinden dolayı RNA'ların denatüre olmadığına karar verilip, cDNA sentez aşamasına geçilmiştir.

3.12. cDNA sentezi

Total RNA’lardan cDNA’lar OneScript® Plus cDNA Synthesis Kit (Cat. No. G236) kullanılarak sentezlenmiştir. OneScript® Plus cDNA Sentez Kiti, termal stabilite elde etmek için RNase H aktivitesini ortadan kaldıran genetik modifikasyonlara sahip bir Moloney-Murine Lösemi Virüsü Ters Transkriptaz enzimi içermektedir. Bu özel mutant enzim daha yüksek cDNA verimi ile 12 kb'ye kadar daha uzun cDNA sunmaktadır. Aynı zamanda GC bakımından zengin RNA template’leri ile ilişkili sekonder yapıların ortadan kaldırılmasını kolaylaştıracak yüksek sıcaklıklarda (50°C - 55°C) çalışabilmektedir. OneScript® Plus, abm'nin yüksek oksidasyona duyarlı insan RNaz inhibitörlerine kıyasla oksidasyona karşı gelişmiş direnç sunan RNaseOFF Ribonükleaz İnhibitörü ile formüle edilmiştir. RNaseOFF çok düşük DTT konsantrasyonlarında (<1 mM) bile kararlıdır, bu da onu nihai RNA koruması için en iyi seçim haline getirmektedir. Total RNA’dan cDNA sentez protokolü;

- RT reaksiyonları RNaz içermeyen bir ortamda birleştirilmelidir.
- Kitin içerisinden çıkan bileşenler kullanmadan önce iyice çözünmelidir ve iyi bir bir pipetajla karıştırılmalıdır. Bütün reaksiyonlar buz üzerinde birleştirilmelidir.
- Tablo 2’ye göre reaksiyon bileşenleri buz üzerinde hazırlanıp, RNA konsantrasyonu 20 µL hacim içerisinde 1 µg olacak şekilde ayarlanmıştır.
- Reaksiyonun sabit bileşenleri eklendikten sonra toplam hacim Nuclease-free H₂O ile 20 µL’ye tamamlanmıştır.

Tablo 3. cDNA sentez bileşenleri (OneScript® Plus cDNA Synthesis Kit)

Bileşenler	Tepkime Hacmi	Konsantrasyon
5X RT Buffer	4 µL	5x
dNTP	1 µl	
Primers	1 µl	
Total RNA or poly(A) + mRNA	Değişken (1 ng - 2 µg/rxn)	
OneScript® Plus RTase	1 µl	
Nuclease-free H ₂ O	20 µl'ye kadar	
Toplam Hacim	20 µl	

- Elde edilen reaksiyon karışımı, Senso Quest Labcycler 96 Thermal Cycler (Germany) cihazı kullanılarak Tablo 3’deki tepkime koşullarına göre revers transkripsiyon tabanlı cDNA sentez işlemi gerçekleştirilmiştir.

Tablo 4. cDNA sentez protokolü

Sıcaklık (°C)	Zaman(dk)
50-55 °C	15 dk
85 °C (Ops)	5 dk

- Elde edilen cNDA’lar daha uzun süreler kullanılması amacı ile -80 °C’de saklanmıştır.

3.13. Primer Tasarımı

Bu çalışmada kullanılan genlerin *Tcf7l2*, *Bdnf*, *Gsk3β*, *Glp1-r*, *Chrna7* rat genomundaki mRNA dizileri NCBI (National Center for Biotechnology Information) nukleotid veri tabını kullanılarak elde edilmiştir. Bu genlerin ekspresyon analizinde ise hücrelerde yapısal olarak ifade edilen ve temel hücresel işlevler için gerekli genler olan, aynı zamanda housekeeping genler olarak da adlandırılan β-actin ve GAPDH seçilmiştir.

Kullanılan primer dizileri ve primerlerin özellikleri ayrıntılı olarak Tablo 4’te gösterilmiştir. İlgilenilen genlerin qPCR amplifikasyonu için kullanılacak olan bu primerler Beacon Designer 8 programı kullanılarak tasarlanmıştır. Program kullanılırken primerler SYBR Green koşullarına göre dizayn edilmiştir ve exon-exon junction olarak tasarlanmıştır. Primerler self-dimer, cross-dimer, hairpin yapılarından kaçınılarak tasarlanmıştır. Primerlerin T_m dereceleri ~60 °C olarak tasarlanmıştır. Tasarlanan primerlerine rat genomundaki homoloji bölgelerinde düşmemesine özen gösterilmiştir, bu şekilde başka bir geni amplifiye etmesi mümkün olmayacaktır.

Tablo 5. Primer Dizileri

Gen Adı	RefSeq Accession No		Oligonükleotid Dizisi
BDNF	NM_12513.4	Forward	5' - CTTTGTGTGGACCCTGAGTTCC -3'
		Reverse	5' - GCCTTCATGCAACCGAAGTATG -3'
TCF7L2	NM_001415805.2	Forward	5' - GTACCACAGCAAGGTCAGCC-3'
		Reverse	5' - GTGTGCAGAGTGTGATGGGG-3'
GSK3 β	NM_032080.1	Forward	5' - GCCACAGCAGCCTCAGATAC-3'
		Reverse	5' - TGGGGCTGTTTCAGGTAGAGT-3'
GLP1R	NM_012728.2	Forward	5' - ACAGGTCTCTTCTGCAACCG -3'
		Reverse	5' - ATGCCCTTGGAGCACACTAC -3'
CHRNA7	NM_012832.4	Forward	5' - CTGGTCAAGAACTACAACCC -3'
		Reverse	5' - GGTTCTTCTCATCCACATCC -3'
ACTB	NM_031144.3	Forward	5' - CAGGTCATCACTATCGGCA-3'
		Reverse	5' - ACAGGATTCCATACCCAGG-3'

3.14. Kantitatif Real Time PCR (qPCR-RT)

qRT-PCR reaksiyonları BlasTaq™ 2X qPCR MasterMix (Cat. No. G891, ABM, CA) kullanılarak 96 kuyucuklu PCR platelerinde total hacim 20 μ l olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. Bütün qPCR çalışmaları LightCycler® 480 (Roche Diagnostics) cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Elde edilecek amplifikasyon sonuçlarındaki varyasyonların oluşabilmesi ihtimaline karşı bütün örnekler tüm genlerde üç tekrar olacak şekilde çalışılmıştır.

BlasTaq™ 2X qPCR MasterMix kiti içerisinde bulunan kullanıma hazır yeni nesil BlasTaq™ DNA Polimerazı içermektedir.

Bu polimeraz, özel reaksiyon koşulları ile daha yüksek işlenebilirlik, verim ve hassasiyet sağlarken, reaksiyon sürelerini wild-type Taq DNA polimeraza kıyasla %70'e kadar kısaltmaktadır.

qPCR çalışmaları üretici firmanın önerdiği protokolde ve reaksiyon koşullarında çalışılmıştır. Bu çalışmaları gerçekleştirmek için kullanılan bileşenlerin reaksiyon bilgileri Tablo 5'de detaylı olarak belirtilmiştir.

Tablo 6. qPCR çalışmaları için kullanılan bileşenlerin hacim ve konsantrasyonları

Bileşenler	Hacim	Konsantrasyon
BlasTaq™ 2X qPCR MM ¹	10 µl	
Forward Primer (10 µM)	0.5 µl	
Reverse Primer (10 µM)	0.5 µl	
Template DNA	Değişken (100 ng genomik DNA)	
Nuclease-free H ₂ O	20 µl'ye kadar	
Toplam hacim	20 µl	

¹ Reaksiyon tamponu 1,5 mM Mg²⁺ içermektedir.

- Kitin içerisinde çıkan bileşenler kullanmadan önce iyice çözünmelidir ve iyi bir bir pipetajla karıştırılmalıdır. Bütün reaksiyonlar buz üzerinde birleştirilmelidir.
- Tablo 5'e göre reaksiyon bileşenleri buz üzerinde hazırlanıp, RNA:cDNA dönüşümünün 1:1 oranında olduğu varsayılarak, cDNA konsantrasyonu 20 µl hacim içerisinde 1µg olacak şekilde ayarlanmıştır. Bu cDNA örneklerinde reaksiyon başına 1 µl kullanılmıştır.
- Reaksiyonun sabit bileşenleri eklendikten sonra toplam hacim Nuclease-free H₂O ile 20 µl'ye tamamlanmıştır.

- Elde edilen reaksiyon karışımı, LightCycler® 480 (Roche Diagnostics) cihazı kullanılarak Tablo 6'daki üretici firmanın önerdiği tepkime koşullarına göre qPCR çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

Tablo 7. qPCR tepkime koşulları BlasTaq™ 2X qPCR MasterMix (Cat. No. G891, ABM, CA)

qPCR Basamağı	Sıcaklık (°C)	Zaman	Döngü
Enzim Aktivasyonu	95 °C	3 dk	} 1 döngü
Denatürasyon	95 °C	15 sn	
Annealing/Extension	60 °C	1 dk	} 40döngü
Melting Curve			

Amplifikasyon sonucu elde edilen Ct (crosses a threshold line) değerleri ve melting curve grafikleri daha sonra analiz edilmek üzere kayıt edilmiştir.

Cihazdan alınan plate'deki ürünler ise %1'lik agoroz jelde yürütülerek ürünlerin uzunlukları ve primer dimeri ya da kontaminasyon durumları kontrol edilmiştir.



Şekil 14. LightCycler® 480 cihazı (Roche Diagnostics, USA)

3.15. İstatistiksel Analiz

qPCR deneyleri sonucunda elde edilen Ct değerlerinin analizinde, bütün gruplar arasında, VTA, NAc, mHb ve pankreas bölgelerindeki ilgili genlerin mRNA ifade farklılıklarını belirlemek amacı ile ilk önce One-way ANOVA sonrasında ise post-hoc Tukey gibi çoklu karşılaştırma testleri kullanılarak veriler analiz edilmiştir. Elde edilen sonuçlardan $p < 0,05$ olanlar anlamlı olarak kabul edilmiştir. Bütün istatistiksel analizler ve grafikler GraphPad Prism 9 programı kullanılarak oluşturulmuştur.

Etik Kurul izni: Bütün deney hayvanı çalışmaları Ege üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun 2022-072R1 sayılı ve 28.12.2022 tarihli etik kurul izni ile gerçekleştirilmiştir. Alınan etik kurul onayı ekte gösterilmiştir.



4. BULGULAR

Yapılan çalışmaların sonucunda, her gruptan 10 deney hayvanı olmak üzere toplam 4 gruptan 40 hayvanın, ağırlık, nikotin tüketim, açlık kan glukozu, hemogram, dolaşımdaki insülin-glukagon verileri toplanmıştır. Bunun yanı sıra diseke edilen NAc, mHb, VTA ve pankreas dokularında *tcf7l2*, *glp1r*, *gsk3b*, *chrna7* ve *bdnf* genlerinin ekspresyonları incelenmiştir. LightCycler® 480 cihazı kullanılarak gerçekleştirilen bu çalışmalar sonucu elde edilen Ct (crosses a threshold line) değerleri analiz için kullanılmıştır.

4.1. Nikotin Tüketim Sonuçları

Tercihe sunulan nikotin uygulama modelinde NTE ve NKE gruplarına 6 hafta boyunca içme sularına karıştırılarak nikotin uygulanmıştır. İlk iki hafta boyunca 10mg/L dozunda nikotine tabi tutulurken, deneyin geri kalan kısmında bu doz iki katına çıkarılıp 20mg/L olarak uygulanmıştır.

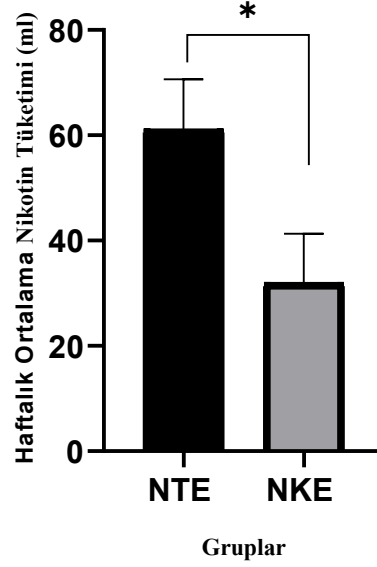
Haftalık olarak her deney hayvanlarının suları tartılıp ne kadar nikotin tükettikleri hesaplanmıştır. Haftalık Ortalama Nikotin Tüketimi Tablo 8’de gösterilmiştir.

Tablo 8. Grupların Haftalık Ortalama Nikotin Tüketimi

Gruplar	HONT (ml)	Gruplar	HONT (ml)
N-KE1	9,2	N-TE1	79
N-KE2	45,8	N-TE2	105,6
N-KE3	6,2	N-TE3	65
N-KE4	15,8	N-TE4	69,4
N-KE5	40,4	N-TE5	94,4
N-KE6	5,2	N-TE6	27,6
N-KE7	96,8	N-TE7	47
N-KE8	43,4	N-TE8	39,6
N-KE9	52	N-TE9	8,8
N-KE10	4,8	N-TE10	74,8

Gruplar arasındaki nikotin tüketme farkını belirlemek amacı ile unpaired student t-test kullanılarak veriler analiz edilmiştir. Elde edilen sonuçlardan $p < 0,05$ olanlar anlamlı olarak kabul edilmiştir. Elde edilen sonuçlar grafik 1’de gösterilmiştir.

Grafik 1. Ortalama Nikotin Tüketim Grafiği (*P<0,05, unpaired student t-test - t, df t=2,180, df=18, F, DF_n, Df_d 1,038, 9, 9)



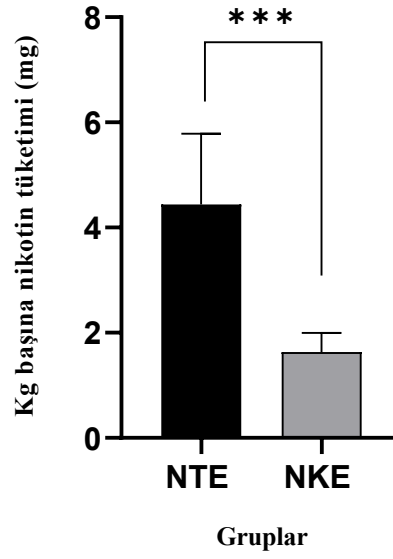
Her deney hayvanının ağırlığı farklı olduğu için, kilogram başına tükettikleri nikotin miktarı mg cinsinden hesaplanarak Tablo 9’da gösterilmiştir.

Tablo 9. Kg başına nikotin tüketimi (mg)

	NTE	NKE
1.hafta	3,316	1,871
2.hafta	2,262	1,495
3.hafta	1,125	0,5188
4.hafta	10,0376	4,2536
5.hafta	8,3326	1,318
6.hafta	1,56	0,3454

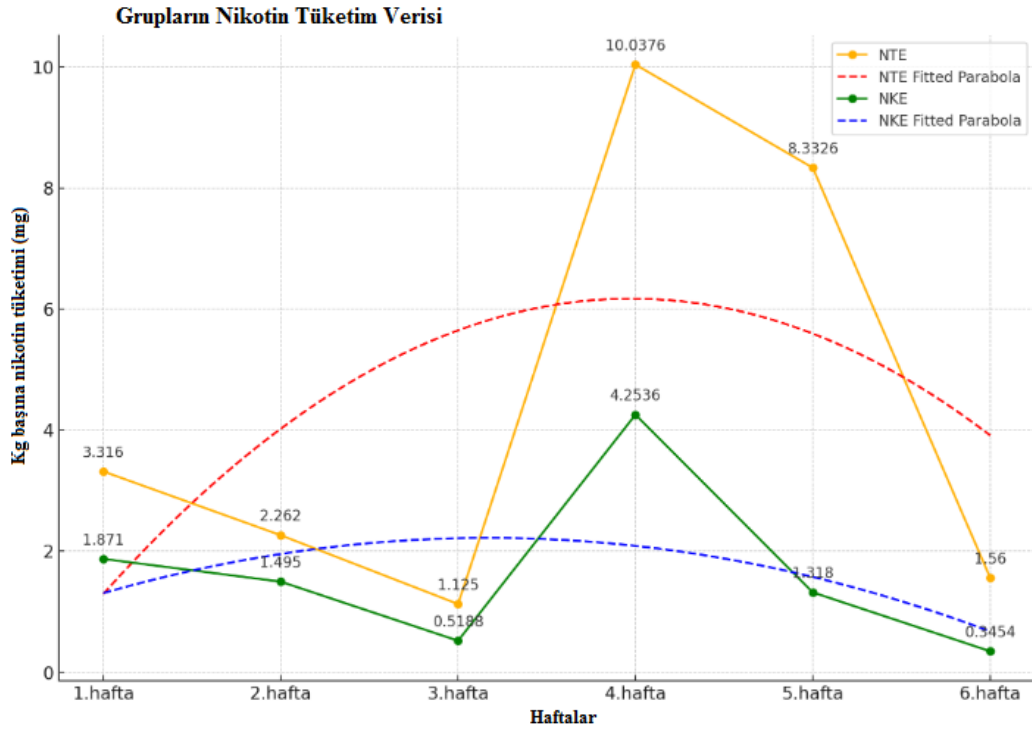
Gruplar arasındaki Kg başına nikotin tüketimi farkını belirlemek amacı ile unpaired student t-test kullanılarak veriler analiz edilmiştir. Elde edilen sonuçlardan $p < 0,05$ olanlar anlamlı olarak kabul edilmiştir. Elde edilen sonuçlar grafik 2’de gösterilmiştir.

Grafik 2. Kg Başına Nikotin Tüketim Grafiği (*P<0,05, unpaired student t-test - t, df t=4,936, df=10, F, DF_n, Dfd 13,78, 5, 5)



Gruplar arasındaki Kg başına nikotin tüketimi farkını daha net bir şekilde görebilmek için Python yazılımı kullanılarak grafik 3 oluşturulmuştur. Burada nikotin bağımlı soydan gelen grup olan NTE'nin naive grubuna göre Kg başına tükettiği nikotin miktarının çok daha yüksek olduğu görülmektedir.

Grafik 3. Kg Başına Nikotin Tüketim Grafiği



4.2. Haftalık Ağırlık Değişim Sonuçları

Çalışmanın sonlandırıldığı 7. haftaya kadar, haftalık olarak her deney hayvanı tartılmış olup elde edilen sonuçlar Tablo 10’da gösterilmiştir.

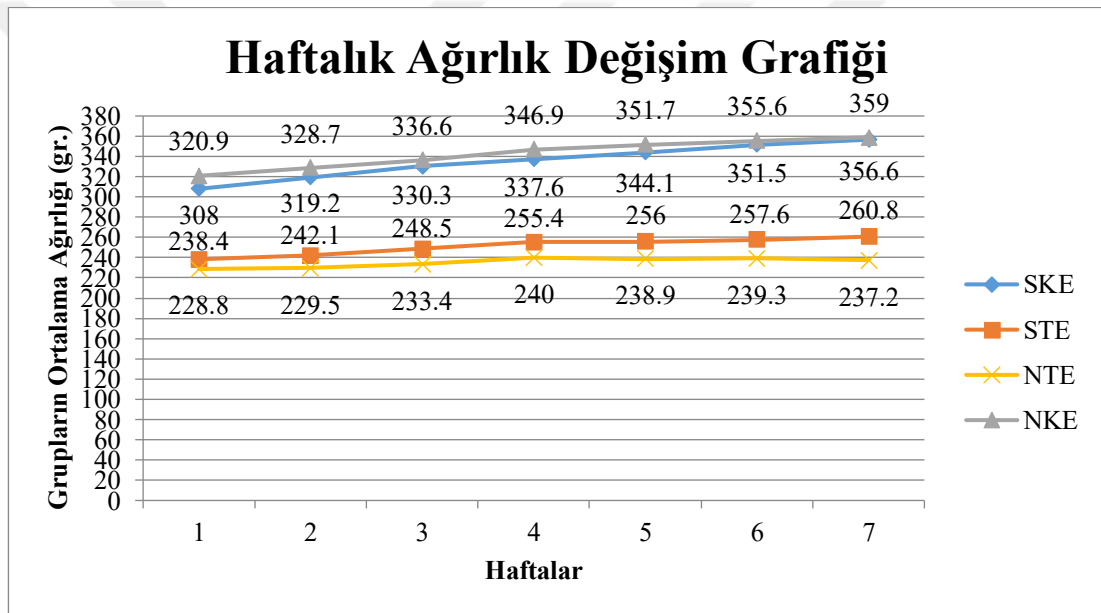
Tablo 10. Grupların Haftalık Ağırlık Değişimi

GRUPLAR	Hafta 1	Hafta 2	Hafta 3	Hafta 4	Hafta 5	Hafta 6	Hafta 7
S-KE1	358	372	386	395	399	420	423
S-KE2	351	370	387	391	398	405	410
S-KE3	300	316	318	316	320	320	324
S-KE4	289	294	300	299	299	301	297
S-KE5	278	296	312	317	321	332	344
S-KE6	266	278	290	300	308	314	320
S-KE7	290	313	325	335	343	354	363
S-KE8	265	259	265	280	290	298	305
S-KE9	311	316	332	347	352	356	360
S-KE10	372	378	388	396	411	415	420
S-TE1	243	249	257	252	252	251	255
S-TE2	260	255	265	268	262	260	263
S-TE3	259	270	279	286	285	288	293
S-TE4	212	215	217	231	228	230	235
S-TE5	247	250	257	266	264	263	263
S-TE6	230	237	238	245	251	254	256
S-TE7	231	232	239	250	251	255	253
S-TE8	233	241	251	270	270	270	280
S-TE9	211	210	224	228	215	226	228
S-TE10	258	262	258	258	282	279	282
N-KE1	395	400	418	426	431	440	447
N-KE2	286	295	293	299	297	298	293
N-KE3	242	252	261	273	281	284	286
N-KE4	300	314	325	343	350	346	358
N-KE5	377	378	369	376	378	390	394
N-KE6	290	312	307	318	321	323	317
N-KE7	375	376	393	404	407	406	416
N-KE8	280	290	299	308	318	324	323
N-KE9	334	338	350	360	364	366	374
N-KE10	330	332	351	362	370	379	382
N-TE1	254	257	245	269	263	266	258
N-TE2	243	246	256	255	256	255	243

N-TE3	207	208	211	216	218	219	227
N-TE4	257	247	261	271	267	275	267
N-TE5	214	215	224	232	233	231	233
N-TE6	212	207	207	208	211	212	213
N-TE7	228	234	241	242	245	244	237
N-TE8	225	224	219	229	216	214	216
N-TE9	224	232	240	248	244	245	244
N-TE10	224	225	230	230	236	232	234

Haftalık ağırlık değişimlerinin daha iyi anlaşılması için her bir gruptaki hayvanların ağırlıklarının ortalaması alınarak Grafik 4’de detaylı bir şekilde gösterilmiştir.

Grafik 4. Haftalık Ağırlık Takibi Grafiği



Gruplardaki deney hayvanlarının hepsi aynı gün doğumludur (± 1 gün) fakat nikotin bağımlı soydan gelen hayvanların ağırlıkları, aynı yaşta olmalarına rağmen daha düşüktür.

Vücut ağırlıklarına bakıldığı zaman, hiç nikotin almamış ve nikotin bağımlı soydan gelmeyen grup olan SKE’deki artış göze çarpmaktadır. Aynı zamanda nikotin almasına rağmen NKE grubunda ağırlık artışı görülmektedir. Nikotin bağımlı soydan gelen gruplara bakıldığı zaman, nikotin almamış STE grubunda ağırlık artışı görülmektedir fakat bu artışın bağımlı soydan gelmeyen gruplara göre nispeten daha az olduğu görülmektedir.

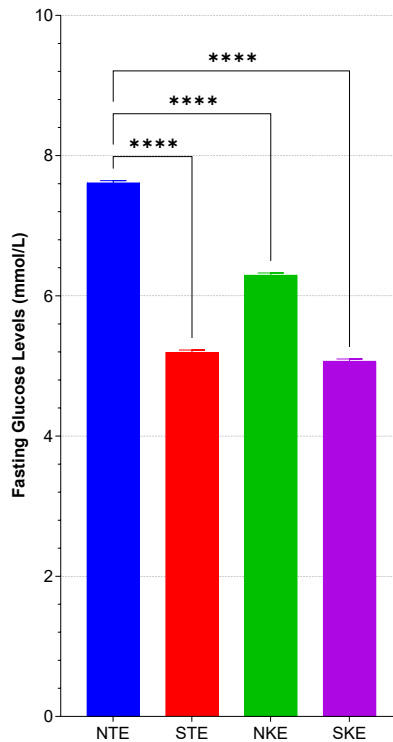
Nikotin uygulaması yapılmış NTE grubuna bakıldığı zaman ise, belli bir noktaya kadar kilo artışı görülmüş olup, 4. haftadan sonra az da olsa ağırlıklarında düşüş gözlemlenmiştir.

Bu sonuçlardan yola çıkarak nikotinin vücut ağırlığı üzerindeki etkisine genel olarak bakıldığı zaman, vücut ağırlığını artırır ya da düşürür gibi bir yorum yapılamamaktadır. Fakat, nikotin bağımlı soydan gelmenin vücut ağırlığı üzerine etkisi açıkça görülmektedir.

4.3. Açık Kan Glukoz Değerleri

Çalışma sonunda deney hayvanları dekapite edilmeden önceki gece yeme erişimleri kısıtlanmıştır ve 12 saat açlık yaratılmıştır. Su ve nikotine erişimleri herhangi bir şekilde kısıtlanmamıştır. Hayvanlar dekapite edilirken mor kapaklı K2 EDTA içeren tüpleri içerisine alınan kanlardan stripler yardımı ile açlık kan glukoz değerleri tespit edilmiştir. Veriler ile ilk önce One-way ANOVA sonrasında ise post-hoc Tukey çoklu karşılaştırma testleri kullanılarak analiz edilmiştir. Bu değerler Grafik 5’de gösterilmiştir. Nikotin bağımlı soydan gelen grup olan NTE’deki açlık kan glukoz değerleri artışı göze çarpmaktadır. Bu artışın diğer gruplarla kıyaslandığında anlamlı olduğu görülmektedir ($p<0,0001$)

Grafik 5. Açık Kan Glukozu Değerleri (**** $P<0,0001$, One-way ANOVA sonrasında ise post-hoc Tukey)



Gruplar arasındaki karşılaştırmalar ve anlamlılık değerleri Tablo 11’de gösterilmiştir.

Tablo 11. Açlık Kan Glukoz Verilerinin One-way ANOVA analizi sonucu

Tukey's çoklu karşılaştırma testi	Anlamlılık?	Özet	Adjusted P Value
NTE vs. STE	Evet	****	<0,0001
NTE vs. NKE	Evet	****	<0,0001
NTE vs. SKE	Evet	****	<0,0001

4.4. Dolaşımdaki Insulin ve Glukagon Değerleri

4.4.1. Insulin Değerleri

Dekapitasyon sonucu, sarı kapaklı tüplere alınıp serum elde edilen kanlardan insulin analizi için, Elabscience® Rat INS(Insulin) ELISA Kiti kullanılmıştır. Deney protokolü uygulandıktan sonra 96’lık plate Thermo Scientific Multiskan Mikroplaka Okuyucu aracılığı ile 450 nm’de okutulup, absorbans değerleri elde edilmiştir. Elde edilen absorbans değerleri kullanarak GraphPad Prism 9 programında her serum örneğine ait insülin değerleri elde edilmiştir. Yine bu program aracılığı ile ilk önce One-way ANOVA sonrasında ise post-hoc Tukey çoklu karşılaştırma testleri kullanılarak veriler analiz edilmiştir. Elisa deneyi sonucunda elde edilen veriler Tablo 12’de gösterilmiştir (pg/mL cinsinden). Bütün örnekler çift tekrarlı çalışılmış olup ortamları alınmıştır.

Tablo 12. pg/mL cinsinden insülin değerleri

NTE	NKE	STE	SKE
168,9052	140,6301	76,6078	74,6870
109,2624	49,7158	41,5521	71,1526
178,3270	81,1257	55,6320	86,7692
148,3328	101,8287	109,3009	56,6924
132,0896	104,4219	73,2079	52,5817
170,5187	92,1514	47,0650	70,0193
155,9662	133,3308	65,2363	90,0346
148,9336	108,7630	140,2651	60,5602
139,4007	134,2486	57,7258	66,2797
181,2947	94,2029	83,4077	95,6435

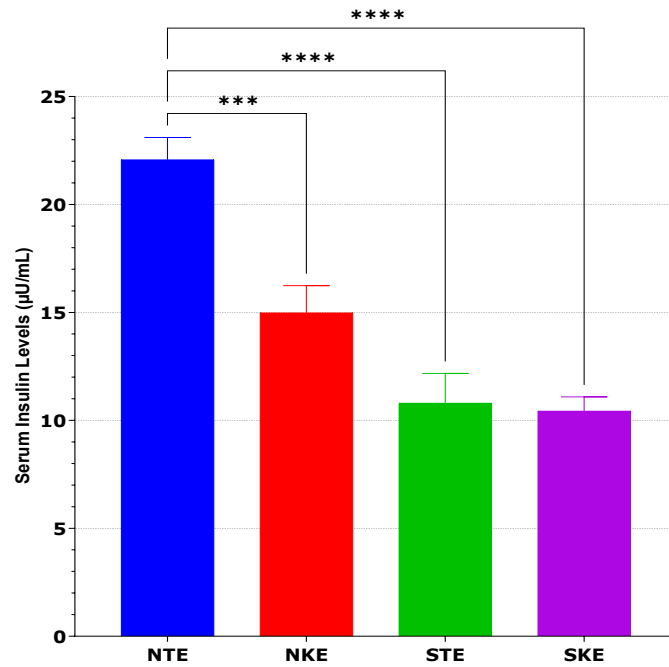
1 pg/mL insülin = 6,945 µU/mL insülin olarak alınarak birim dönüşümü gerçekleştirilmiştir. Bu formül sonucu elde edilen değerler Tablo 13’de gösterilmiştir.

Tablo 13. µU/mL cinsinden insülin değerleri

NTE	NKE	STE	SKE
24,32040042	20,249113	11,030645	10,75406
15,73253359	7,1585013	5,9830291	10,24515
25,6770336	11,681166	8,0103729	12,49376
21,35821054	14,662162	15,738065	8,163047
19,0193763	15,035548	10,541095	7,571157
24,55272904	13,268745	6,7768185	10,08197
22,45734292	19,198102	9,3932813	12,96395
21,44472465	15,660622	20,196562	8,71997
20,07210028	19,330258	8,3118469	9,543519
26,10434689	13,564133	12,009744	13,77157

Elde edilen bu değerler GraphPad Prism 9 programında analiz edilmiş olup, Grafik 6’da gösterilmiştir.

Grafik 6. Dolaşımdaki İnsülin Hormonu Seviyeleri (**P<0,0001, ***P=0,0018, One-way ANOVA sonrasında ise post-hoc Tukey)**



Yapılan analiz sonucu NTE grubundaki deney hayvanlarının insülin seviyesindeki artış göze çarpmaktadır. Diğer tüm gruplar ile kıyaslandığında bu artış anlamlı bir artış olarak görülmektedir ($P<0,0001$). Naive soydan gelen ama nikotin uygulanan grup olan NKE grubundaki hayvanların insülin seviyelerinde de yine artış görülmektedir. NKE grubu gerek STE grubu ile kıyaslandığında ($p=0,0018$), artışın anlamlı olduğu göze çarpmaktadır. STE ve SKE grupları arasında anlamlı bir değişim saptanamamıştır.

Gruplar arasındaki karşılaştırmalar ve anlamlılık değerleri Tablo 14’de gösterilmiştir.

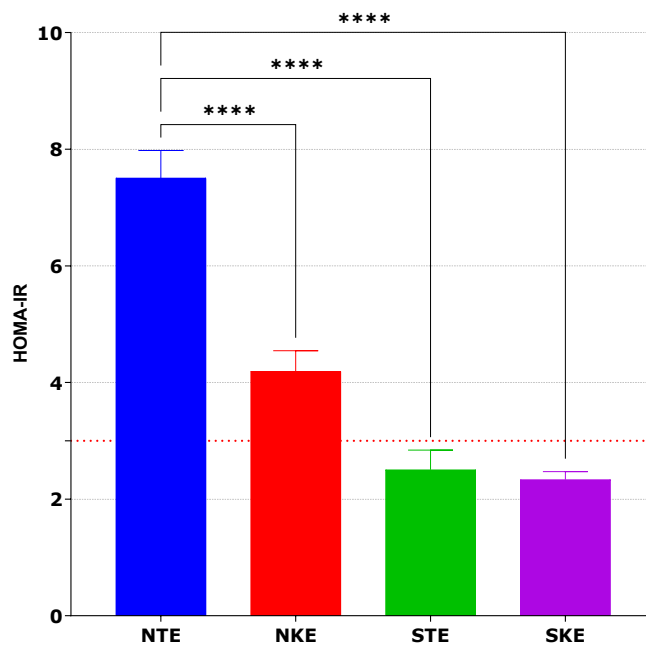
Tablo 14. Elisa İnsulin Verilerinin One-way ANOVA analizi sonucu

Tukey's çoklu karşılaştırma testi	Anlamlılık?	Özet	Adjusted P Value
NTE vs. NKE	Evet	***	0,0018
NTE vs. STE	Evet	****	<0,0001
NTE vs. SKE	Evet	****	<0,0001

İnsulin direnci (IR) hesaplamaları için $\mu\text{U/mL}$ cinsinden insülin değerleri kullanılmıştır.

Elde edilen bu değerler GraphPad Prism 9 programında analiz edilmiş olup, Grafik 7’de gösterilmiştir.

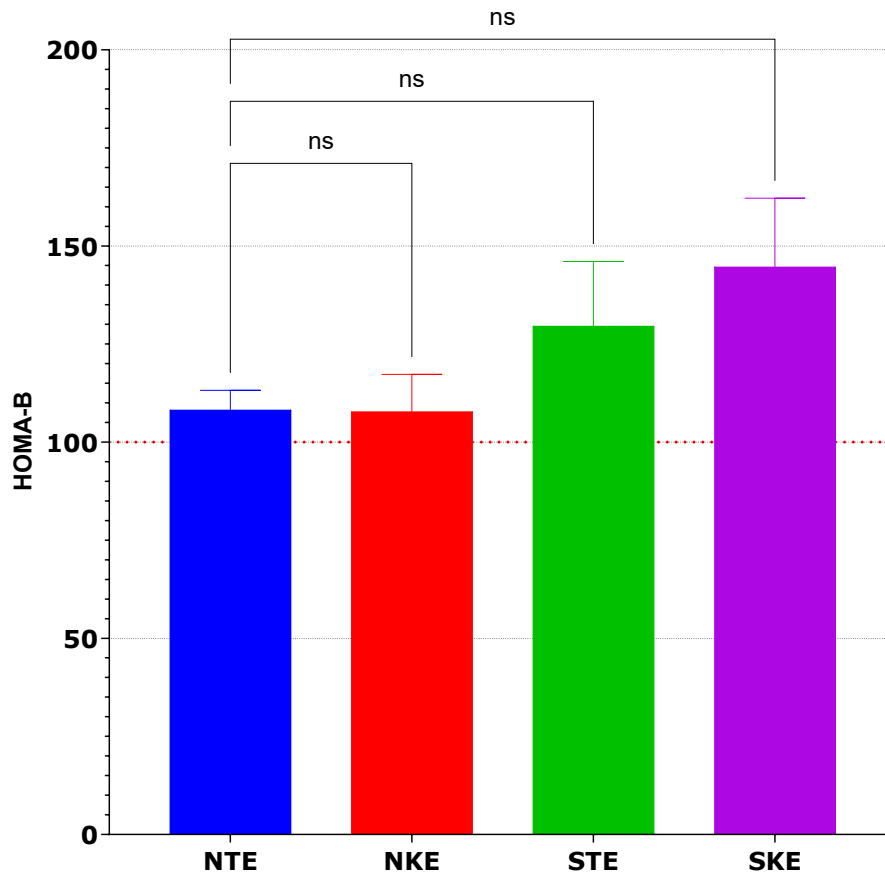
Grafik 7. HOMA-IR Grafiği (** $P<0,0001$ One-way ANOVA sonrasında ise post-hoc Tukey)**



Sonuçlara bakıldığı zaman gruplar arasındaki HOMA-IR farkı anlamlı olarak karşımıza çıkmamaktadır. NTE grubu diğer gruplar ile kıyaslandığında anlamlı artış görülmektedir. NKE ve NTE gruplarının HOMA-IR değerleri normal aralığın üstünde yer almalta olup, insülin direnci oluşumu görülmektedir. Nikotin uygulanmayan SKE ve STE gruplarında bu etki görülmemektedir.

Pankreastaki β -hücre fonksiyonları değerlendirilmiş olup, sonuçlar Grafik 8’de gösterilmiştir. Elde edilen sonuçlarda gruplar arası anlamlı bir değişimin olmadığı tespit edilmiştir.

Grafik 8. HOMA- β Grafiği (NS, Anlamlı Değil)

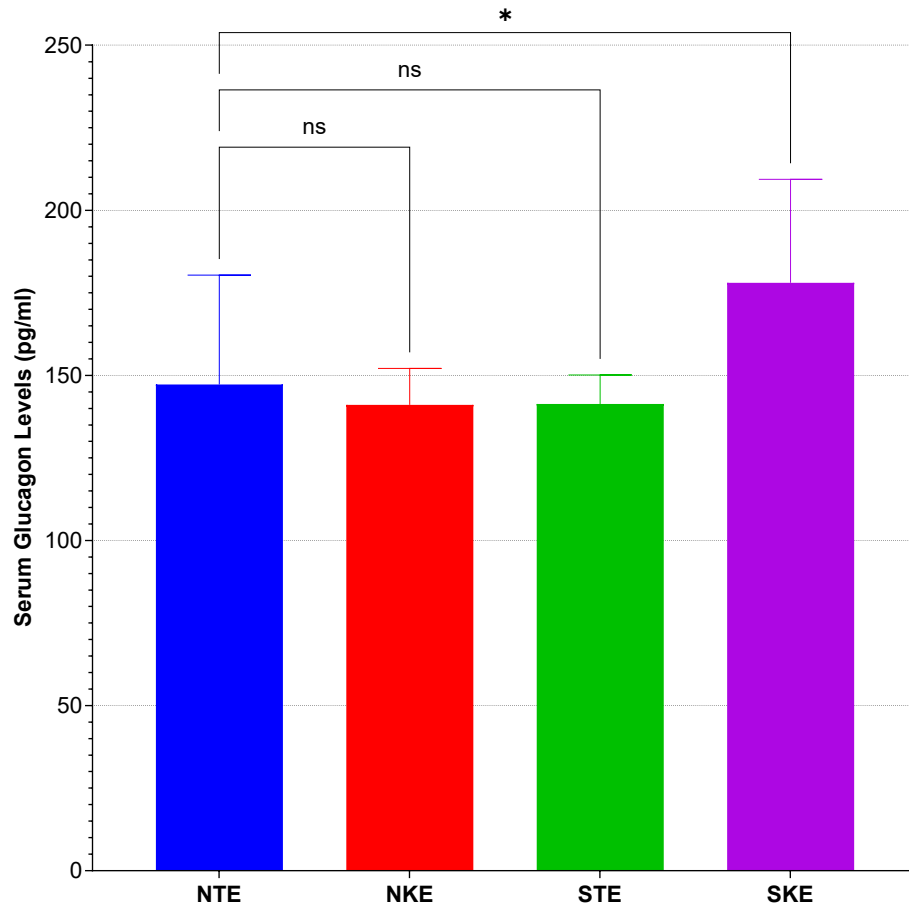


4.4.2. Glukagon Değerleri

Dekapitasyon sonucu, sarı kapaklı tüplere alınıp serum elde edilen kanlardan glukagon analizi için, Elabscience® Rat INS(Glocagon) ELISA Kiti kullanılmıştır. Deney protokolü uygulandıktan sonra 96'lık plate Thermo Scientific Multiskan Mikroplaka Okuyucu aracılığı ile 450 nm'de okutulup, absorbans değerleri elde edilmiştir.

Elde edilen absorbans değerleri kullanarak GraphPad Prism 9 programında her serum örneğine ait glukagon değerleri elde edilmiştir. Yine bu program aracılığı ile ilk önce One-way ANOVA sonrasında ise post-hoc Tukey çoklu karşılaştırma testleri kullanılarak veriler analiz edilmiş olup, Grafik 9’de gösterilmiştir.

Grafik 9. Dolaşımdaki Glukagon Hormonu Seviyeleri *P<0,05 One-way ANOVA sonrasında ise post-hoc Tukey)



Yapılan analiz sonucu NTE grubundaki deney hayvanlarının glukagon seviyesindeki azalış göze çarpmaktadır.

SKE grubu ile kıyaslandığında bu artış anlamlı bir artış olarak görülmektedir (P<0,05). Diğer gruplar karşılaştırıldığında anlamlı bir değişim saptanamamıştır.

4.5. Gen Ekspresyon Analiz Sonuçları

Deney gruplarındaki her bir deney hayvanına ait NAc, mHb, VTA ve pankreas dokularında *Tcf7l2*, *Bdnf*, *Gsk3β*, *Glp1-r*, *Chrna7* mRNA ifade düzeyleri tespit edilmiştir. Bunu tespit etmek için qRT-PCR çalışmalarından elde edilen Ct değerleri kullanılmıştır. Bu değerler kullanılarak gruplar arasındaki kat değişim farkları $2^{-\Delta\Delta Ct}$ formülü kullanılarak hesaplanmıştır.

$$2^{-\Delta\Delta Ct} = 2^{-[\text{örnek } \Delta Ct (\text{Gen- Referans}) - \text{kontrol } \Delta Ct (\text{Gen- Referans})]}$$

$$2^{-\Delta Ct} = 2^{-\Delta(\text{Gen Ct- Referans Ct})}$$

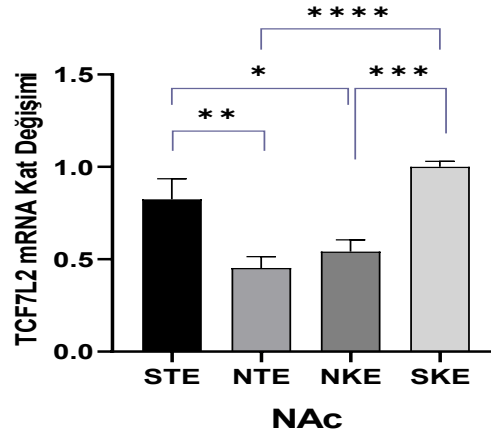
Elde edilen sonuçlar istatistiksel olarak karşılaştırılmıştır. Tüm istatistik işlemleri GraphPad Prism 9 programında gerçekleştirilmiş olup, ilk önce One-way ANOVA sonrasında ise post-hoc Tukey çoklu karşılaştırma testleri kullanılarak veriler analiz edilmiştir. Analiz sonuçlarında $p < 0,05$ olan değerler anlamlı kabul edilmiştir.

4.5.1. Nikotinin TCF7L2 mRNA ifadesi üzerindeki etkisi

TCF7L2'nin NAc bölgesindeki ifade değişimlerine bakıldığı zaman, nikotin tüketimi ile bu genin ifadesi arasında ters orantı olduğu görülmektedir. En fazla kat değişiminin NTE ve SKE grupları arasında olduğu göze çarpmaktadır. NTE'deki TCF7L2'nin ifadesi SKE'ye göre neredeyse %50 oranında düşmektedir, bu iki grup arasındaki kat değişimi anlamlı bir değişim olarak karşımıza çıkmaktadır ($p < 0,0001$). Gruplar arasındaki kat değişim oranı Grafik 9'da gösterilmiştir.

Nikotin grupları ile kontrol grupları karşılaştırıldığında bu genin ifade seviyesi değişirken, nikotin grupları kendi arasında ya da kontrol grupları kendi arasında karşılaştırıldığında bu genin ifadesinin pek değişmediği görülmektedir. NTE-NKE ve STE-SKE grupları arasındaki değişimlerin anlamlı bir değişim olmadığı tespit edilmiştir. Bu da bize, nikotinin bu genin ifadesi üzerine etkisini gösterirken, nikotin bağımlı soydan gelmenin tek başına bir etkisi olmadığını göstermektedir. Gruplar arasındaki analiz sonucu elde edilen değerler Tablo 15'de gösterilmiştir.

Grafik 10. TCF7L2'nin NAc bölgesindeki kat değişim grafiği



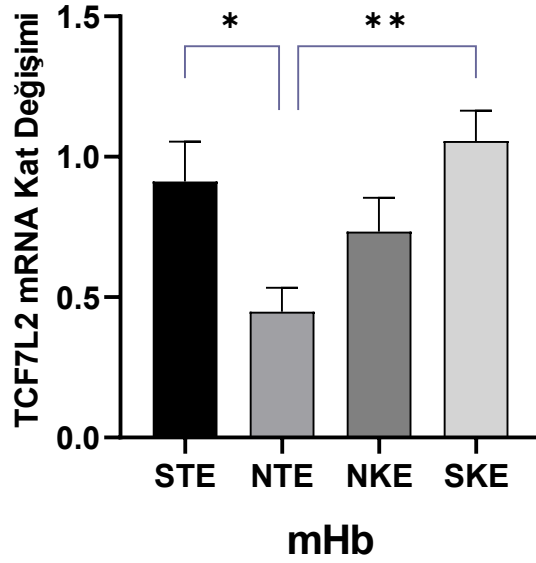
Tablo 15. TCFL2 NAc Verilerinin One-way ANOVA analizi sonucu

Tukey's çoklu karşılaştırma testi	Anlamlılık?	Özet	P Değeri
STE vs. NTE	Evet	**	0,0085
STE vs. NKE	Evet	*	0,0488
STE vs. SKE	Hayır	ns	0,2451
NTE vs. NKE	Hayır	ns	0,8953
NTE vs. SKE	Evet	****	<0,0001
NKE vs. SKE	Evet	***	0,0003

TCF7L2'nin aynı zamanda mHb bölgesindeki ifade değişimleri de incelenmiştir. NAc bölgesinde olduğu gibi nikotin tüketimi ile bu genin ifadesi arasında ters orantı olduğu görülmektedir. En fazla kat değişiminin NTE ve SKE grupları arasında olduğu göze çarpmaktadır ki bu iki grup arasındaki kat değişimi anlamlı bir değişim olarak karşımıza çıkmaktadır ($p=0,0037$). Gruplar arasındaki kat değişim oranı Grafik 10'da gösterilmiştir.

Yapılan analizler sonucu sadece NTE-STE ve NTE-SKE grupları arasında anlamlılık saptanmıştır. Gruplar arasındaki anlamlılık derecesi ve p değerleri tablo 16'da gösterilmiştir.

Grafik 11. TCF7L2'nin mHb bölgesindeki kat değişim grafiği



Tablo 16. TCFL2 mHb Verilerinin One-way ANOVA analizi sonucu

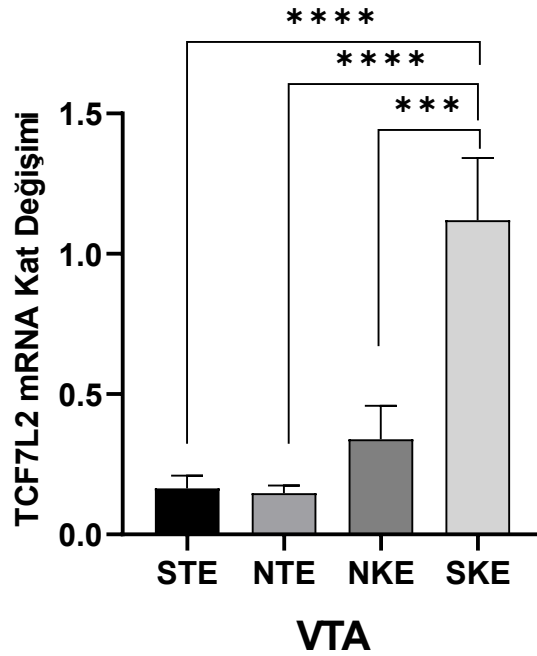
Tukey's çoklu karşılaştırma testi	Anlamlılık?	Özet	P Değeri
STE vs. NTE	Evet	*	0,0362
STE vs. NKE	Hayır	ns	0,6991
STE vs. SKE	Hayır	ns	0,8131
NTE vs. NKE	Hayır	ns	0,3169
NTE vs. SKE	Evet	**	0,0037
NKE vs. SKE	Hayır	ns	0,2175

TCF7L2'nin bir diğer beyin bölgesi olan VTA'daki ifadesi de değerlendirilmiştir. Diğer iki beyin bölgesinde de olduğu gibi nikotin tüketimi ile bu genin ifadesi arasında ters orantı olduğu görülmektedir. Fakat STE grubundaki TCF7L2 ifadesinin azalması dikkat çekici bir şekilde karşımıza çıkmaktadır. Diğer iki beyin bölgesi ile kıyaslandığında bu sonucun farklı olduğu görülmektedir ve diğer iki beyin bölgesinin aksine STE-SKE arasında anlamlı kat değişimine yol açmıştır ($p<0,0001$). VTA bölgesinde nikotinin bu genin ifadesi üzerine etkisi açıkça görülürken, nikotin bağımlı soydan gelmenin nikotin bağımlı soydan gelmenin bu beyin bölgesinde TCF7L2'nin ifadesini değiştirdiği düşünülmektedir.

En fazla kat değişimi yine NTE ve SKE grupları arasında olduğu göze çarpmaktadır ki bu iki grup arasındaki kat değişimi anlamlı bir değişim olarak karşımıza çıkmaktadır ($p<0,0001$). Gruplar arasındaki kat değişim oranı Grafik 11’de gösterilmiştir.

Yapılan analizler sonucu sadece NTE-SKE, NKE-SKE ve STE-SKE grupları arasında anlamlılık saptanmıştır. Gruplar arasındaki anlamlılık derecesi ve p değerleri tablo 17’de gösterilmiştir.

Grafik 12. TCF7L2’nin VTA bölgesindeki kat değişim grafiği



Tablo 17. TCFL2 VTA Verilerinin One-way ANOVA analizi sonucu

Tukey's çoklu karşılaştırma testi	Anlamlılık?	Özet	P Değeri
STE vs. NTE	Hayır	ns	0,9995
STE vs. NKE	Hayır	ns	0,6400
STE vs. SKE	Evet	****	<0,0001
NTE vs. NKE	Hayır	ns	0,5717
NTE vs. SKE	Evet	****	<0,0001
NKE vs. SKE	Evet	***	0,0002

TCF7L2’nin beyin ile pankreas arasındaki bağı daha da aydınlatmak için yaptığımız bu çalışmada pankreastaki bu genin ifadesi de değerlendirilmiştir.

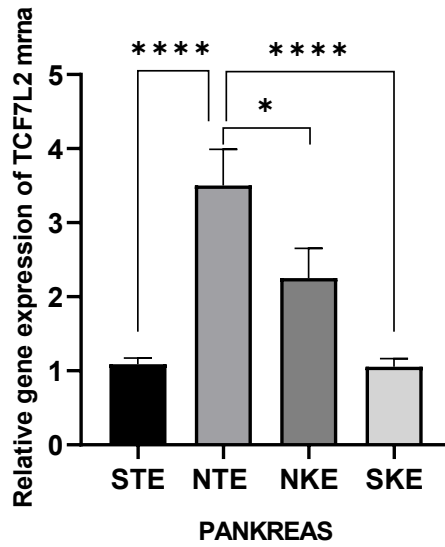
Beyin bölgelerindeki ekspresyonuna kıyasla TCF7L2'nin NTE grubundaki ifade değişimi çarpıcı olarak karşımıza çıkmaktadır.

Bu genin ifadesinin pankreasta ciddi ölçüde arttığı görülmektedir ve bu değişim diğer bütün gruplarla kıyaslandığında anlamlı bir değişim olduğu göze çarpmaktadır($p<0,0001$). Gruplar arasındaki kat değişim oranı Grafik 12'de gösterilmiştir.

Yapılan analizler sonucu gruplar arasında anlamlılık saptanmıştır ve gruplar arasındaki anlamlılık derecesi ve p değerleri tablo 18'de gösterilmiştir.

Tüm bu sonuçlar birlikte yorumlandığında beyin bölgelerinde TCF7L2 ekspresyonunun düştüğü tespit edilirken pankreasta, TCF7L2 ekspresyonunun arttığı tespit edilmiştir. NTE-STE arasındaki oluşan anlamlı fark bağımlı soydan gelmenin ekspresyon seviyesini değiştirdiği ve bunların anlamlı olduğunu göstermektedir.

Grafik 13. TCF7L2'nin Pankreas bölgesindeki kat değişim grafiği



Tablo 18. TCFL2 Pankreas Verilerinin One-way ANOVA analizi sonucu

Tukey's çoklu karşılaştırma testi	Anlamlılık?	Özet	P Değeri
STE vs. NTE	Evet	****	<0,0001
STE vs. NKE	Hayır	ns	0,0698
STE vs. SKE	Hayır	ns	0,9999
NTE vs. NKE	Evet	*	0,0462
NTE vs. SKE	Evet	****	<0,0001
NKE vs. SKE	Evet	ns	0,0592

4.5.2. Nikotin GLP1R mRNA ifadesi üzerindeki etkisi

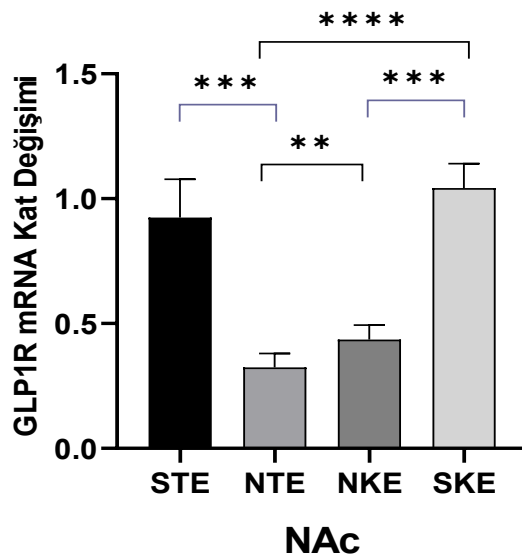
GLP-1 Wnt sinyal yolağının bir parçası olup TCF7L2'nin downstream bölgesinde bulunmaktadır. GLP1R beyinde ve pankreasta yüksek miktarlarda ifade edilmektedir.

Bu gen kan glukoz seviyenin düzenlenmesi, insülin ve glukagon hormonlarının salınımı gibi bir çok metabolik yolda görev almaktadır. TCF7L2 ve GLP1R genlerinin ko-eksprese olduğu bilinmektedir. Yani TCF7L2 ifadesinde artışlar bu genin ifadesini arttırırken, genin ifadesindeki azalışlar GLP1R ifadesinin de azalmasına yol açmaktadır. Nikotin GLP1R geninde de TCF7L2'ye benzer olarak bu genin ifadesinin azalmasını sağlamaktadır.

Grafik 13 incelendiği zaman, GLP1R'nin NTE grubundaki ifadesinin azalışı göze çarpmaktadır. Bu diğer gruplarla kıyaslandığında anlamlı bir azalıştır. Nikotin bu genin ifadesi üzerine etkisi açıktır. NTE-NKE grupları ise STE-SKE grupları karşılaştırıldığında, gruplar arasında GLP1R ifadesinin anlamlı bir şekilde değişmediği görülmektedir. Bu sonuçlardan yola çıkarak nikotin bağımlı soydan gelmenin bu genin ifadesi üzerine etkisi olduğu düşünülmemektedir.

Yapılan analizler sonucu sadece gruplar arasında anlamlılık saptanmıştır. Gruplar arasındaki anlamlılık derecesi ve p değerleri tablo 19'da gösterilmiştir.

Grafik 14. GLP1R'nin NAc bölgesindeki kat değişim grafiği



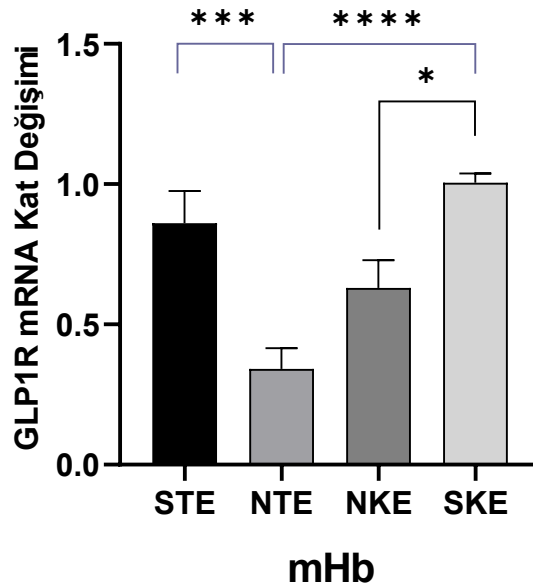
Tablo 19. GLP1R NAc Verilerinin One-way ANOVA analizi sonucu

Tukey's çoklu karşılaştırma testi	Anlamlılık?	Özet	P Değeri
STE vs. NTE	Evet	***	0,0008
STE vs. NKE	Evet	**	0,0072
STE vs. SKE	Hayır	ns	0,8352
NTE vs. NKE	Hayır	ns	0,8574
NTE vs. SKE	Evet	****	<0,0001
NKE vs. SKE	Evet	***	0,0007

GLP1R'nin aynı zamanda mHb bölgesindeki ifade değişimleri de incelenmiştir. NAc bölgesinde olduğu gibi nikotin tüketimi ile bu genin ifadesi arasında ters orantı olduğu görülmektedir. En fazla kat değişiminin NTE ve SKE grupları arasında olduğu göze çarpmaktadır ki bu iki grup arasındaki kat değişimi anlamlı bir değişim olarak karşımıza çıkmaktadır ($p<0,0001$). Gruplar arasındaki kat değişim oranı Grafik 14'de gösterilmiştir.

Yapılan analizler sonucu sadece NTE-STE, NTE-SKE ve NKE-SKE grupları arasında anlamlılık saptanmıştır. Gruplar arasındaki anlamlılık derecesi ve p değerleri tablo 20'de gösterilmiştir.

Grafik 15. GLP1R'nin mHb bölgesindeki kat değişim grafiği



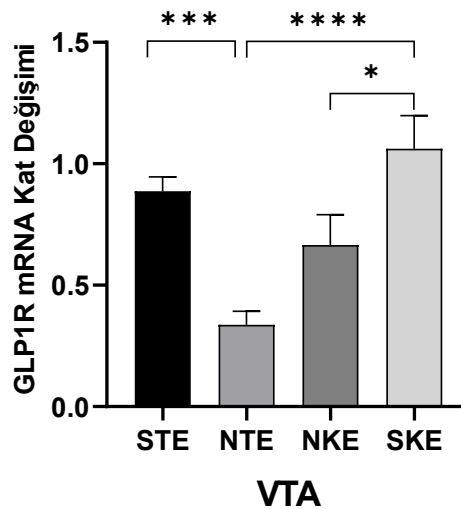
Tablo 20. GLP1R mHb Verilerinin One-way ANOVA analizi sonucu

Tukey's çoklu karşılaştırma testi	Anlamlılık?	Özet	P Değeri
STE vs. NTE	Evet	***	0,0007
STE vs. NKE	Hayır	ns	0,2432
STE vs. SKE	Hayır	ns	0,6364
NTE vs. NKE	Hayır	ns	0,0973
NTE vs. SKE	Evet	****	<0,0001
NKE vs. SKE	Evet	*	0,0189

Diğer bir beyin bölgesi olan VTA'da GLP1R'nin ifadesi incelendiğinde, TCF7L2'nin VTA'daki ifadesinden farklı olduğu görülmektedir. Sonuçlar genel olarak mHb ve NAc bölgesinden elde edilen ifade sonuçları ile paralellik göstermektedir. NTE grubunda GLP1R ifadesinin STE ve SKE gruplarındaki ifadesine göre anlamlı bir şekilde azaldığı görülmektedir ($p=0,0009$; $p<0,0001$). Aynı zamanda NKE-SKE grubu arasında da anlamlı bir değişim olduğu göze çarpmaktadır ($p=0,0419$). Nikotin bağımlı soydan gelmenin bu genin ifadesi üzerine yine etkisi olmadığı görülmektedir. Gruplar arasındaki kat değişim oranı Grafik 15'de gösterilmiştir.

Yapılan analizler sonucu sadece NTE-STE, NTE-SKE ve NKE-SKE grupları arasında anlamlılık saptanmıştır. Gruplar arasındaki anlamlılık derecesi ve p değerleri tablo 21'de gösterilmiştir.

Grafik 16. GLP1R'nin VTA bölgesindeki kat değişim grafiği



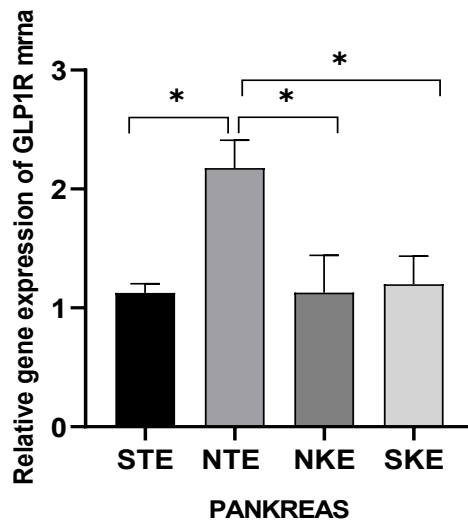
Tablo 21. GLP1R VTA Verilerinin One-way ANOVA analizi sonucu

Tukey's çoklu karşılaştırma testi	Anlamlılık?	Özet	P Değeri
STE vs. NTE	Evet	***	0,0009
STE vs. NKE	Hayır	ns	0,3341
STE vs. SKE	Hayır	ns	0,6133
NTE vs. NKE	Hayır	ns	0,0721
NTE vs. SKE	Evet	****	<0,0001
NKE vs. SKE	Evet	*	0,0419

GLP1R'nin beyin ile pankreas arasındaki bağı daha da aydınlatmak için yaptığımız bu çalışmada pankreastaki bu genin ifadesi de değerlendirilmiştir. GLP1R agonisti olan GLP-1 hormonunun pankreastan insülin salınımını düzenlediği bilinmektedir (Damla Erbil, 2019). İnsulinin artmasından dolayı GLP1R'nin ifadesinin pankreasta ciddi ölçüde arttığı görülmektedir. Gruplar arasındaki kat değişim oranı Grafik 16'da gösterilmiştir.

Yapılan analizler sonucu sadece gruplar arasında anlamlılık saptanmıştır ve gruplar arasındaki anlamlılık derecesi ve p değerleri tablo 22'de gösterilmiştir.

Tüm bu sonuçlar birlikte yorumlandığında nikotinin hem beyin bölgelerinde GLP1R ekspresyonunu düşürdüğü tespit edilmişken, pankreasta arttığı bulunmuştur. Bağımlı soydan gelmenin ekspresyon seviyesini değiştirdiği fakat bunların anlamlı olduğu tespit edilmiştir.

Grafik 17. GLP1R'nin Pankreas bölgesindeki kat değişim grafiği

Tablo 22. GLP1R Pankreas Verilerinin One-way ANOVA analizi sonucu

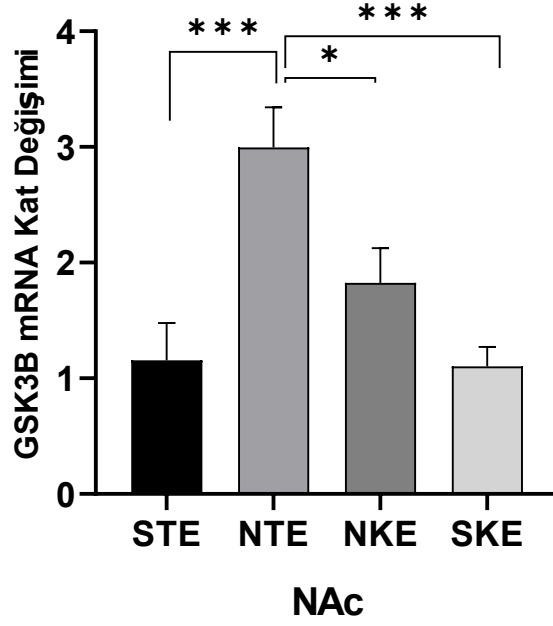
Tukey's çoklu karşılaştırma testi	Anlamlılık?	Özet	P Değeri
STE vs. NTE	Evet	*	0,0142
STE vs. NKE	Hayır	ns	>0,9999
STE vs. SKE	Hayır	ns	0,9959
NTE vs. NKE	Evet	*	0,0143
NTE vs. SKE	Evet	*	0,0249
NKE vs. SKE	Hayır	ns	0,9962

4.5.3. Nikotinin GKS3 β mRNA ifadesi üzerindeki etkisi

GKS3 β , Wnt sinyal yolağında TCF7L2'nin upstream bölgesinde bulunmaktadır ve bu genin ifadesindeki artış TCF7L2 ve dolayısıyla GLP1R genlerinin ifadesinin azalmasına yol açmaktadır. GKS3 β bir çeşit TCF7L2 inhibitörü olarak çalışmaktadır (Przemysław Duda, 2018). Wnt sinyal yolağının bir diğer parçası olan GKS3 β 'nın beyin bölgeleri ve pankreastaki mRNA ifadesi incelenmiştir. Nikotinin bu genin ifadesini NAc bölgesinde arttırdığı net bir şekilde görülmektedir. Grafik 17'de NTE-SKE grupları arasındaki değişime bakıldığında, bu artışın anlamlı olduğu görülmektedir ($p=0,0003$). NTE-STE grupları arasındaki değişime bakıldığında ise yine anlamlı bir artış göze çarpmaktadır ($p=0,0005$). Dikkat çekici bir şekilde nikotin alan iki grup arasındaki değişime bakıldığında ise, NTE grubundaki artışın anlamlı olduğu görülmektedir ($p=0,0369$). Diğer dikkat çekici sonuç ise, NKE-STE ve NKE-SKE grupları arasında ise anlamlı bir değişim saptanmaması diğer dikkat çekici sonuçlar arasında yer almaktadır.

Yapılan analizler sonucu sadece gruplar arasında anlamlılık saptanmıştır. Aynı zamanda NKE-NTE, NTE-STE ve NTE-SKE arasındaki değişimin anlamlı olduğu görülmektedir. Gruplar arasındaki anlamlılık derecesi ve p değerleri tablo 23'de gösterilmiştir.

Grafik 18. GSK3 β 'nın NAc bölgesindeki kat değişim grafiği



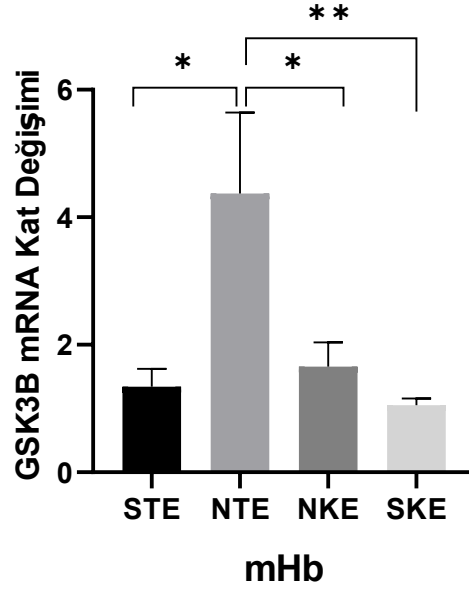
Tablo 23. GSK3 β NAc Verilerinin One-way ANOVA analizi sonucu

Tukey's çoklu karşılaştırma testi	Anlamlılık?	Özet	P Değeri
STE vs. NTE	Evet	***	0,0005
STE vs. NKE	Hayır	ns	0,3841
STE vs. SKE	Hayır	ns	0,9993
NTE vs. NKE	Evet	*	0,0369
NTE vs. SKE	Evet	***	0,0003
NKE vs. SKE	Hayır	ns	0,3196

Grafik 18'e bakıldığında, GSK3 β 'nın mHb bölgesindeki ifade değişimi NAc bölgesine paralellik göstermektedir. NTE grubundaki GSK3 β ifade değişimi diğer üç gruba kıyaslandığında anlamlı olduğu göze çarpmaktadır. Fakat diğer gruplar arasında anlamlı bir değişime saptanmamıştır.

Yapılan analizler sonucu sadece gruplar arasında anlamlılık saptanmış olup, gruplar arasındaki anlamlılık derecesi ve p değerleri tablo 24'de gösterilmiştir.

Grafik 19. GSK3 β 'nın mHb bölgesindeki kat değişim grafiği



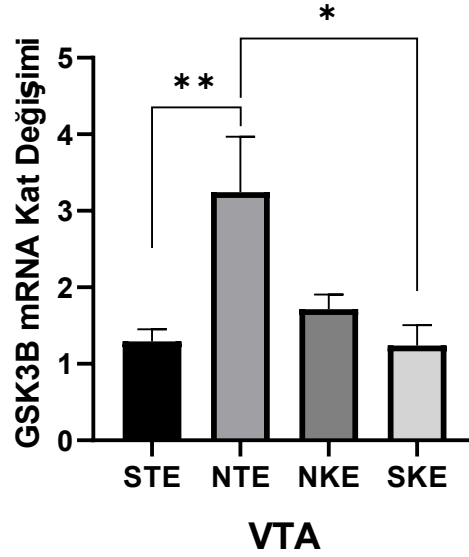
Tablo 24. GSK3 β mHb Verilerinin One-way ANOVA analizi sonucu

Tukey's çoklu karşılaştırma testi	Anlamlılık?	Özet	P Değeri
STE vs. NTE	Evet	*	0,0166
STE vs. NKE	Hayır	ns	0,9880
STE vs. SKE	Hayır	ns	0,9901
NTE vs. NKE	Evet	*	0,0369
NTE vs. SKE	Evet	**	0,0075
NKE vs. SKE	Hayır	ns	0,9221

Grafik 19’da VTA beyin bölgesindeki GSK3 β ’nın gruplar arasındaki kat değişimi görölmektedir. Sonuçlar diğer beyin bölgeleri ile paralellik göstermektedir. NTE grubundaki GSK3 β ifade değişimi diğer SKE ve STE gruplar ile kıyaslandığında anlamlı olduğu göze çarpmaktadır. Fakat diğer gruplar arasında anlamlı bir değişime saptanmamıştır.

Yapılan analizler sonucu sadece gruplar arasında anlamlılık saptanmış olup, gruplar arasındaki anlamlılık derecesi ve p değerleri tablo 25’de gösterilmiştir.

Grafik 20. GSK3 β 'nın VTA bölgesindeki kat değişim grafiği



Tablo 25. GSK3 β VTA Verilerinin One-way ANOVA analizi sonucu

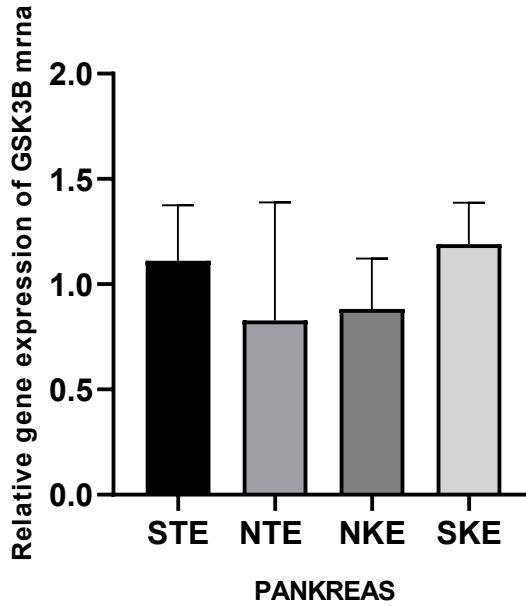
Tukey's çoklu karşılaştırma testi	Anlamlılık?	Özet	P Değeri
STE vs. NTE	Evet	**	0,0070
STE vs. NKE	Hayır	ns	0,8132
STE vs. SKE	Hayır	ns	0,9999
NTE vs. NKE	Hayır	ns	0,0602
NTE vs. SKE	Evet	*	0,0189
NKE vs. SKE	Hayır	ns	0,8819

GKS3 β 'nın beyin ile pankreas arasındaki bağı daha da aydınlatmak için yaptığımız bu çalışmada pankreastaki bu genin ifadesi de değerlendirilmiştir. Alzheimer hastalığı, parkinson hastalığı gibi nörodejeneratif hastalıklarda ve inflamasyon ilişkili hastalıklarda beyinde bu genin ifadesi arttığı bilinmektedir (Mojtaba Golpich, 2015; Przemysław Duda, 2018; Zhou et al., 2020). Bu işlevinden dolayı nikotinin pankreasta bu genin ifadesi üzerine etkisinin fazla olduğu görülmektedir. GKS3 β mRNA ifadesinin pankreasta gruplar arasında anlamlı bir değişime neden olmadığı göze çarpmaktadır. Gruplar arasındaki değişim Grafik 20'de gösterilmiştir.

Yapılan analizler sonucu sadece gruplar arasında anlamlılık saptanmamıştır ve gruplar arasındaki anlamlılık derecesi tablo 26’da gösterilmiştir.

Tüm bu sonuçlar birlikte yorumlandığında nikotinin beyin bölgelerinde GSK3 β ekspresyonunu arttırdığı tespit edilirken pankreasta, GSK3 β ekspresyonu az da olsa azaldığı fakat bunun anlamlı olmadığı tespit edilmiştir.

Grafik 21. GSK3 β ’nın Pankreas bölgesindeki kat değişim grafiği



Tablo 26. GSK3 β Pankreas Verilerinin One-way ANOVA analizi sonucu

Tukey's çoklu karşılaştırma testi	Anlamlılık?	Özet	P Değeri
STE vs. NTE	Hayır	ns	0,9378
STE vs. NKE	Hayır	ns	0,9656
STE vs. SKE	Hayır	ns	0,9985
NTE vs. NKE	Hayır	ns	0,9995
NTE vs. SKE	Hayır	ns	0,8809
NKE vs. SKE	Hayır	ns	0,9225

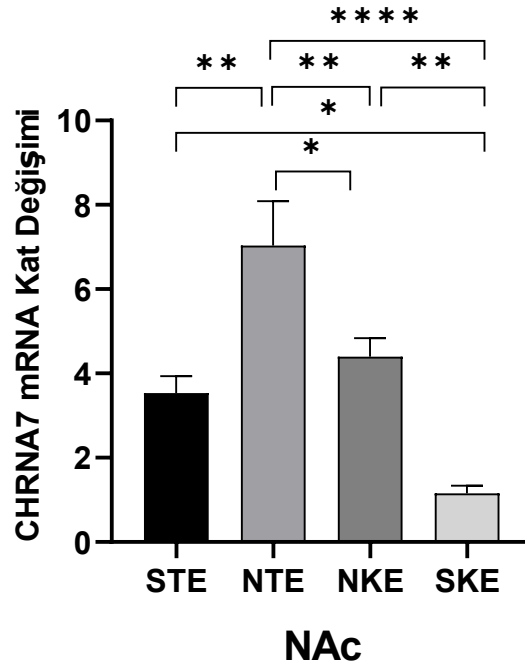
4.5.4. Nikotinin CHRNA7 mRNA ifadesi üzerindeki etkisi

Nikotinik asetil kolin reseptörleri beyinde geniş çaplı ekspresyon göstermektedir. Nikotinin etkisini gösterdiği reseptörlerden biri de $\alpha 7$ nAChR olarak karşımıza çıkmaktadır. Nikotin, β altbirimi içeren reseptörlerine kıyasla, $\alpha 7$ nAChR’ye bağlanma kapasitesi daha düşüktür (Gipson & Fowler, 2020; Le Foll et al., 2022).

Ödül mekanizmasında önemli bir yeri olan CHRNA7'nin beyin bölgeleri ve pankreastaki mRNA ifadesi incelenmiştir. Nikotin bu genin ifadesini NAc bölgesinde arttırdığı net bir şekilde görülmektedir. Grafik 21'de NTE-SKE grupları arasındaki değişime bakıldığında, bu artışın anlamlı olduğu görülmektedir ($p<0,0001$). NTE-STE grupları arasındaki değişime bakıldığında ise yine anlamlı bir artış göze çarpmaktadır ($p=0,0015$). Dikkat çekici bir şekilde nikotin alan iki grup arasındaki değişime bakıldığında ise, NTE grubundaki artışın anlamlı olduğu görülmektedir ($p=0,0219$).

Yapılan analizler sonucu sadece gruplar arasında anlamlılık saptanmıştır. Aynı zamanda, NKE-STE arasındaki değişim hariç diğer grupların arasındaki değişim anlamlı olduğu görülmektedir. Gruplar arasındaki anlamlılık derecesi ve p değerleri tablo 27'de gösterilmiştir.

Grafik 22. CHRNA7'nin NAc bölgesindeki kat değişim grafiği

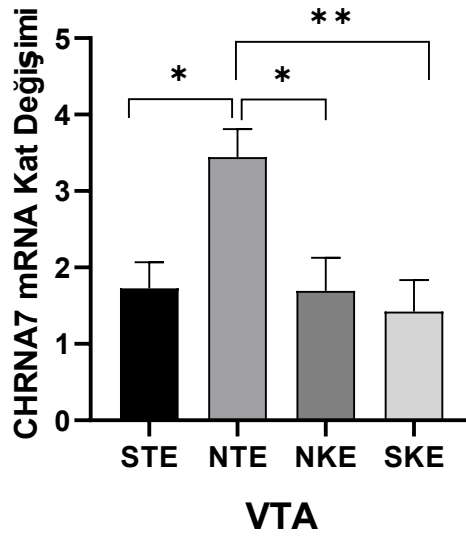


Tablo 27. CHRNA7 NAc Verilerinin One-way ANOVA analizi sonucu

Tukey's çoklu karşılaştırma testi	Anlamlılık?	Özet	P Değeri
STE vs. NTE	Evet	**	0,0015
STE vs. NKE	Hayır	ns	0,7503
STE vs. SKE	Evet	*	0,0468
NTE vs. NKE	Evet	*	0,0217
NTE vs. SKE	Evet	****	<0,0001
NKE vs. SKE	Evet	**	0,0036

Grafik 22'ye bakıldığında, NAc bölgesindeki CHRNA7 mRNA ifade değişimlerinin aksine VTA bölgesinde sadece NTE'deki artış diğer gruplarla kıyaslandığında anlamlılık göstermektedir (p=0,0002). Gruplar arasındaki anlamlılık derecesi ve p değerleri tablo 28'de gösterilmiştir.

Grafik 23. CHRNA7'nin VTA bölgesindeki kat değişim grafiği

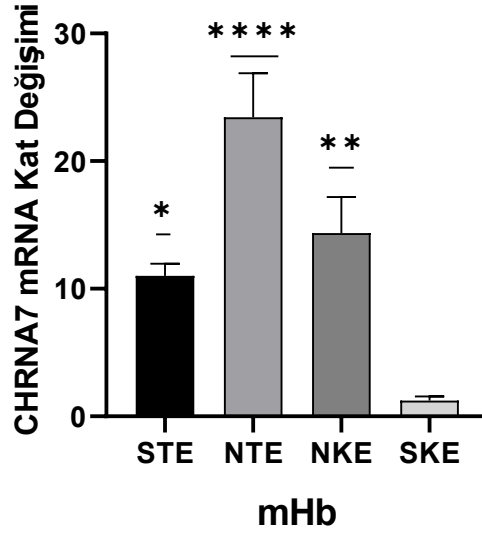


Tablo 28. CHRNA7 VTA Verilerinin One-way ANOVA analizi sonucu

Tukey's çoklu karşılaştırma testi	Anlamlılık?	Özet	P Değeri
STE vs. NTE	Evet	*	0,0148
STE vs. NKE	Hayır	ns	>0,9999
STE vs. SKE	Hayır	ns	0,9548
NTE vs. NKE	Evet	*	0,0127
NTE vs. SKE	Evet	**	0,0085
NKE vs. SKE	Hayır	ns	0,9674

CHRNA7 genini mHb bölgesindeki mRNA ifade değişimlerine bakıldığında zaman, artışlar diğer iki bölge ile paralellik göstermektedir. Grafik 23’de de görüldüğü üzere, en anlamlı artış NTE-SKE grupları arasında görülmektedir ($p<0,0001$). Gruplar arasındaki anlamlılık derecesi ve p değerleri tablo 29’da gösterilmiştir.

Grafik 24. CHRNA7’nin mHb bölgesindeki kat değişim grafiği



Tablo 29. CHRNA7 mHb Verilerinin One-way ANOVA analizi sonucu

Tukey's çoklu karşılaştırma testi	Anlamlılık?	Özet	P Değeri
STE vs. NTE	Evet	**	0,0027
STE vs. NKE	Hayır	ns	0,7314
STE vs. SKE	Evet	*	0,0227
NTE vs. NKE	Evet	*	0,0394
NTE vs. SKE	Evet	****	<0,0001
NKE vs. SKE	Evet	**	0,0014

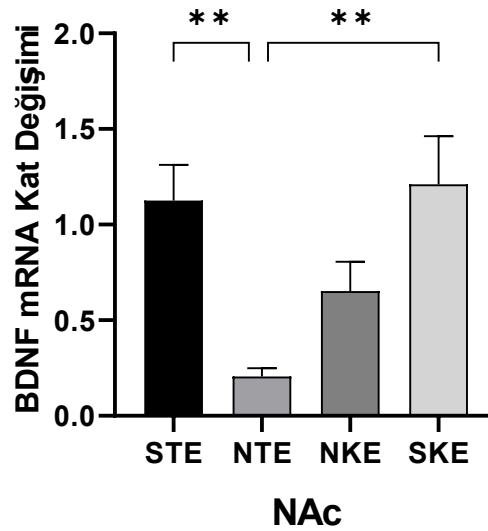
4.5.5. Nikotin BDNF mRNA ifadesi üzerindeki etkisi

BDNF hipokampusta yüksek seviyelerde ifade edilen, bilişsel fonksiyonlar ile ilişkili bir nörotrofik faktördür. Sigara içenlerde BDNF ekspresyonu dokuya spesifik değişirken serum düzeyinde BDNF seviyesinin arttığı görülmektedir. Bu genin ifadesini artması anti-inflamatuvar etki gösterebilirken, bilişsel fonksiyonları iyileştirmektedir (Zeyi Huang 2020).

Bilişsel fonksiyonlar üzerine önemli etkisi olan BDNF'in beyin bölgeleri ve pankreastaki mRNA ifadesi incelenmiştir. Nikotin bu genin ifadesini NAc bölgesinde azalttığı göze çarpmaktadır. Grafik 24'de NTE-SKE grupları arasındaki değişime bakıldığında, bu azalışın anlamlı olduğu görülmektedir ($p=0,0014$). NTE-STE grupları arasındaki değişime bakıldığında ise yine anlamlı bir azalış göze çarpmaktadır ($p=0,0037$).

Yapılan analizler sonucu sadece gruplar arasında anlamlılık saptanmıştır. Aynı zamanda, gruplar arasındaki anlamlılık derecesi ve p değerleri tablo 30'da gösterilmiştir.

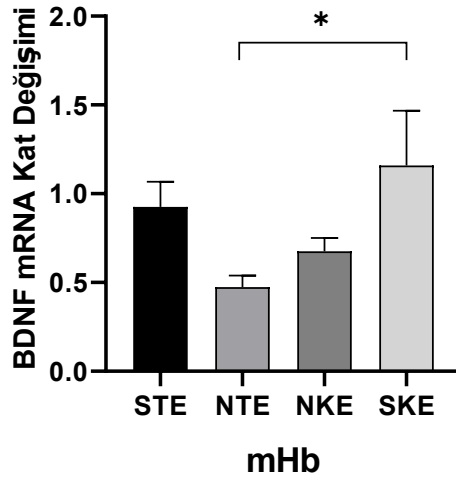
Grafik 25. BDNF'nin NAc bölgesindeki kat değişim grafiği



Tablo 30. BDNF NAc Verilerinin One-way ANOVA analizi sonucu

Tukey's çoklu karşılaştırma testi	Anlamlılık?	Özet	P Değeri
STE vs. NTE	Evet	**	0,0037
STE vs. NKE	Hayır	ns	0,2419
STE vs. SKE	Hayır	ns	0,9858
NTE vs. NKE	Hayır	ns	0,2877
NTE vs. SKE	Evet	**	0,0014
NKE vs. SKE	Hayır	ns	0,1284

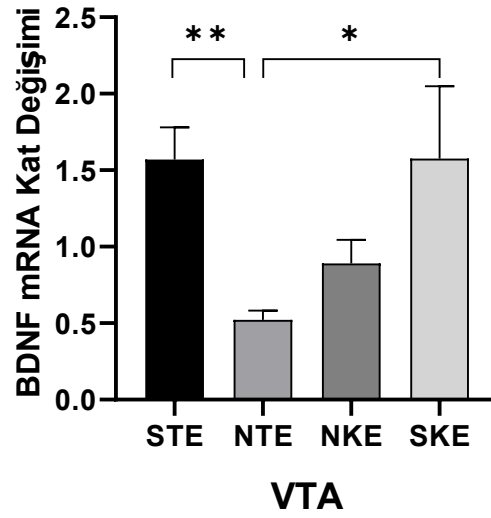
Grafik 25'e bakıldığında, NAc bölgesindeki BDNF mRNA ifade değişimlerinin aksine mHb bölgesinde sadece NTE-SKE grupları arasındaki azalış anlamlılık göstermektedir ($p=0,0458$). Gruplar arasındaki anlamlılık derecesi ve p değerleri tablo 31'de gösterilmiştir.

Grafik 26. BDNF'nin mHb bölgesindeki kat değişim grafiği**Tablo 31. BDNF mHb Verilerinin One-way ANOVA analizi sonucu**

Tukey's çoklu karşılaştırma testi	Anlamlılık?	Özet	P Değeri
STE vs. NTE	Hayır	ns	0,2904
STE vs. NKE	Hayır	ns	0,7545
STE vs. SKE	Hayır	ns	0,7880
NTE vs. NKE	Hayır	ns	0,8510
NTE vs. SKE	Evet	*	0,0458
NKE vs. SKE	Hayır	ns	0,2360

BDNF genini VTA bölgesindeki mRNA ifade değişimlerine bakıldığı zaman, azalışlar diğer iki bölge ile paralellik göstermektedir. Grafik 26’da da görüldüğü üzere, en anlamlı artış NTE ile STE diğer gruplar arasında görülmektedir ($p=0,0095$). Gruplar arasındaki anlamlılık derecesi ve p değerleri tablo 32’de gösterilmiştir.

Grafik 27. BDNF’nin VTA bölgesindeki kat değişim grafiği



Tablo 32. BDNF VTA Verilerinin One-way ANOVA analizi sonucu

Tukey's çoklu karşılaştırma testi	Anlamlılık?	Özet	P Değeri
STE vs. NTE	Evet	**	0,0095
STE vs. NKE	Hayır	ns	0,1452
STE vs. SKE	Hayır	ns	>0,9999
NTE vs. NKE	Hayır	ns	0,6373
NTE vs. SKE	Evet	*	0,0202
NKE vs. SKE	Hayır	ns	0,2057

TARTIŞMA

Bu tez çalışmasında tercihe dayalı oral nikotin uygulamasının beyin bölgelerinde ve pankreasta moleküler düzeyde TCF7L2, GLP1R, GSK3 β , CHRNA7, BDNF mRNA ifadelerindeki değişimi göstermek ve serum düzeyinde de insulin-glukagon hormonlarının değişimlerini gözlemlemek amaçlanmıştır.

İnsanlarda yapılan birçok çalışmalar, sigaraya başlama, bağımlılık, sigarayı bırakmada başarısızlık ve nikotin yoksunluğu dahil olmak üzere sigarayla ilgili çeşitli fenotiplerin kalıtsallığına işaret etmektedir (Berger et al., 2010; Nesil, Kanit, Ugur, & Pogun, 2015; Rezvani et al., 2010). Daha önce yapılan birçok çalışma, nikotine verdikleri yanıt açısından bireyler arasında önemli farklılıklar olduğunu ortaya koymuştur (Portugal & Gould, 2008). Hem insanlarda hem de hayvanlarda moleküler mekanizmalar ve genetik farklılıklar üzerine yapılan çalışmalar, nikotine karşı duyarlılığın hem genetik hem de genetik olmayan faktörlerden büyük ölçüde etkilendiğini göstermiştir (Chen, Hiler, Tolley, Matta, & Sharp, 2012; Hall, Markou, Levin, & Uhl, 2012; Nesil, Kanit, Li, & Pogun, 2013). Bununla birlikte, insan popülasyonundaki genetik ve fenotipik heterojenlik nedeniyle nikotin bağımlılığı ile ilgili davranışların kalıtımının genetik mekanizmaları tam olarak aydınlatılamamıştır. Sigaraya başlama ve devam etme, yoksunluk belirtileri ve bırakma başarısındaki değişkenlik kalıtsal faktörlere bağlanmaktadır. Kalıtsal faktörlere ilişkin rapor edilen etki oranları %29 ile %84 arasında değişmektedir (Maisonneuve & Glick, 2003; Nesil et al., 2015). Bunun yanı sıra, aile, ikiz ve evlat edinme çalışmalarından elde edilen önemli miktarda veri, sigaraya başlama, bağımlılık ve bırakma dahil olmak üzere sigarayla ilgili çeşitli fenotiplerin kalıtılabilirliğine ilişkin kanıtlar sağlamıştır (Vink, Willemsen, & Boomsma, 2005). Hayvan modelleri, bağımlılıkla ilgili davranışların gelişiminde rol oynayan genetik faktörlerin etkisini belirleme fırsatı sunmaktadır ve bağımlılıkla ilgili genlerin tanımlanmasına yardımcı olmaktadır.

Kemirgenlerde yapılan çalışmalar, nikotine fiziksel bağımlılığın gelişimi sırasında hem genetik hem de genetik olmayan faktörlerin nikotin kaynaklı fizyolojik ve davranışsal tepkileri etkilediğini göstermiştir (Leao, Cruz, Marin, & Planeta Cda, 2012). Gönüllü oral nikotin kendi kendine uygulama paradigması, nikotin alım davranışındaki bireysel farklılıkları belirlemek için etkili bir model sunmaktadır.

Bu modelle, hayvanlar uzun bir süre boyunca günde 24 saat oral nikotin seçimine maruz bırakılabilir (Collins, Pogun, Nesil, & Kanit, 2012). Sınırsız erişim, serbest seçim ve uzun bir deney süresi, hayvanların sürekli nikotin tüketim oranlarına göre nikotin bağımlılığı aşamalarını deneyimlemelerine olanak tanır. Sıçanlara serbest oral nikotin seçimi verildiğinde, gönüllü tüketim oranlarına bağlı olarak minimum veya maksimum nikotin tercih eden olarak sınıflandırılabilirler (Nesil et al., 2013).

Bununla birlikte, bağımlılığın ilerlemesinde nikotin alım davranışındaki genetik varyasyonlar etkisi hakkında nispeten az şey bilinmektedir. C57BL/6 J x C3H/HeJ F2 çapraz farelerde yapılan bir haritalama çalışması, oral nikotinin serbest seçiminin en az dört quantitative trait loci (QTL) tarafından etkilendiğini göstermiştir. Dahası, oral nikotine maruz kalmanın ödül mekanizması ilgili moleküler sinyal yollarını değiştirdiğini göstermektedir (Brunzell, Russell, & Picciotto, 2003; X. C. Li et al., 2007).

Seçici tohumlama yöntemi ile yetiştirme, karmaşık özelliklerin genetik modellerini oluşturmak için yaygın olarak kullanılmaktadır. Nesil ve ark., 2011 yılında tercihe dayalı oral nikotin alım davranışı için çift yönlü kitle seleksiyonu kullanarak Sprague Dawley sıçanlarından ilk kez nikotin tercih eden soy oluşturmuşlardır. Sonuç olarak ise, yüksek oranda nikotin tercihi için sıçanların seçici olarak yetiştirilmesinin, dokuz nesil seçimden sonra 0.26'lık bir kalıtımsallığa sahip nikotin tüketiminin artmasıyla sonuçlandığı gösterilmiştir (Nesil et al., 2013).

2006 yılında başlanan projede, yüksek oranda nikotin tercih eden soydan 30. nesil bu çalışma için kullanılmıştır. İçme suyunda nikotin uygulamasının normal protokolünde, nikotinin acı tadının baskılanması için sakkarin ile karıştırılarak verilmektedir. Sakkarinin açlık kan glukozu ve insülin-glukagon gibi hormonların seviyelerini etkileyeceğinden, nikotin saf olarak uygulanmıştır.

İlk iki hafta boyunca, deney hayvanlarının nikotine alışma aşasında nikotinin dozu 10mg/L olarak uygulanmış olup, çalışmanın geri kalanında bu doz iki katına çıkarılarak 20mg/L olarak uygulanmıştır (BİRDOĞAN A., 2021).

Elde edilen sonuçlara bakıldığında, naive soydan gelen sıçanlar haftalık ortalama olarak 31,96 ml nikotinli su tüketirken, bağımlı soydan gelen sıçanların haftalık ortalama olarak 61,12 ml nikotinli su tükettiği tespit edilmiştir. Burada nikotin bağımlı soydan gelen sıçanların 2 kat daha fazla nikotinli su tükettiği görülmektedir.

Her hayvanın ne kadar su tükettiğine bağlı olarak, suyun içerdiği nikotin miktarına göre kaç mg nikotin tükettikleri hesaplanmıştır. Tabi bu aşamada her deney hayvanının ağırlığı farklı olduğu için kilogram başına tükettikleri nikotin miktarları göz önüne alınmıştır. Kilogram başına tükettikleri nikotin miktarına bakıldığında ise NTE grubundaki her sıçanın haftalık ortalama 4,44 mg nikotin tükettiği görülmektedir. Diğer taraftan bu miktarın NKE grubunda 1,63 mg olduğu göze çarpmaktadır. Bu sonuçlar ise bize tüketilen nikotin miktarının gruplar arasında yaklaşık 3 kat değiştiğini göstermektedir. Farkın bu kadar artmasının sebebi ise, nikotin bağımlı soydan gelen sıçanların, naive sıçanlara göre daha zayıf olamasıdır. Tüm bu sonuçlar birlikte ele alındığında ise nikotin bağımlı soydan gelmenin, nikotin tüketimini ciddi bir şekilde arttırdığı görülmektedir. Literatürdeki veriler ile bizim elde ettiğimiz sonuçlar benzerlik göstermektedir.

Epidemiyolojik çalışmalar nikotin tüketimi ile T2D riskinin artması arasında açık bir ilişki olduğunu gösterirken, klinik veriler nikotinin vücut kompozisyonu, insülin duyarlılığı ve pankreatik β hücre fonksiyonu üzerinde etkisi olduğunu göstermektedir. İnsan, kemirgen ve in vitro çalışmalar, nikotin ve sigaraya maruz kalmanın glukoz homeostazını etkilediği moleküler mekanizmalar hakkında çalışmalar ortaya çıkmaya başlamaktadır (Maddatu, Anderson-Baucum, & Evans-Molina, 2017).

Klinik öncesi çalışmalar nikotinin ödül mekanizması üzerindeki etkilerinin ve nikotin yoksunluk semptomlarının tip 1 ve tip 2 diyabet rat modellerinde arttığını göstermektedir (Ibias, O'Dell, & Nazarian, 2018; Pipkin et al., 2017).

Bunun yanı sıra, nikotinin beslenme davranışı ve vücut ağırlığı üzerindeki etkileri bir çok çalışmada gösterilmiş olup nikotinin iştahı ve vücut ağırlığını bastırdığı inancı yaygın olarak karşımıza çıkmaktadır (Cepeda-Benito, 2020). Yapılan diğer bir çalışmada, yüksek enerjili diyetle (yağdan %31,8 kcal) beslenen yetişkin erkek sıçanların vücut ağırlığı artışı obeziteye eğilimli (OP), obeziteye dirençli (OR) ve standart kemirgen yemi (Chow) verilen gruplar oluşturulmuştur. Bu sıçanlara cerrahi olarak intravenöz kateterler yerleştirilmiş ve ardışık 20 gün boyunca 1 saatlik seanslar halinde nikotin (0 veya 60 μ g/kg/infüzyon, standart bir kendi kendine uygulama dozu) uygulanması gerçekleştirilmiştir. Kendi kendine nikotin uygulayan OP ve Chow sıçanlarında vücut ağırlığı artışını önemli ölçüde baskılamış olduğunu ancak gıda alımını baskılanmamış olduğu tespit edilmiştir.

OR grubu sıçanlarıda ise nikotinin vücut ağırlığı artışı üzerinde bir etkisi olmadığı gösterilmiştir. Araştırmacılar burdan şu sonuca varmaktadırlar: 1) OR sıçanları da nikotinin vücut ağırlığı artışını baskılamasına dirençlidir; ve 2) nikotin, obeziteye eğilimli sigara içenlerin bir alt kümesinde obezite seviyelerini azaltabilmektedir (Rupprecht, Smith, Donny, & Sved, 2017).

Diyabet, açlık kan şekeri testi veya tokluk kan şekeri testi gibi hiperglisemi biyobelirteçleri ile teşhis edilebilmektedir. Diyabetik hastada kan glukozunu etkileyen birçok faktör olduğu bilinmektedir; bunlar arasında sigara gibi yaşam tarzı faktörleri de yer almaktadır (Ardisson Korat, Willett, & Hu, 2014). Nikotin tüketen kişilerde diabetes mellitus insidansı daha yüksek olarak görülmektedir. Sigaranın neden olduğu oksidatif stresin kan glukozu üzerinde etkisi olabileceği gibi, kan glukozu homeostazını doğrudan değiştirebilir ve insülin direncine neden olabilir. Bu teorinin biyolojik yolu tam olarak aydınlatılamamıştır. Son yıllarda yapılan bir çalışmada sigara içenlerde açlık kan glukoz değerinin anlamlı bir şekilde arttığı gösterilmiştir (Sari, Sari, Darlan, & Prasetya, 2018). Özellikle, sigarada bulunan nikotin kan glukoz seviyelerinde artışa neden olabilmektedir ve tütün içme alışkanlığı tip 2 diyabet riskini belirgin şekilde arttırmaktadır (Collaborators, 2017; Willi C, 2007). Nikotinin kan glikozunu nasıl artırdığı veya bu etkinin sigara alışkanlığının devamlılığı veya sigara içenlerde diyabetin patofizyolojisi ile ilgisi bilinmemektedir.

Bunun yanı sıra son zamanlarda yapılan çalışmalarda, nikotinin dolaşımdaki insülin seviyelerini arttırabileceği ve insülin direncine sebep olabileceği görülmektedir. Son raporlar ayrıca diyabetli kişilerin genel nüfusa kıyasla sigara içme oranlarının (%12,3) diyabetli olmayanlara (%8,6) göre biraz daha yüksek olduğunu göstermektedir. Nispeten benzer sigara içme davranış oranlarına rağmen, nikotinin insülin direncini arttırdığı ve T2D gelişimini kolaylaştırdığı görülmektedir (Brath, Kaser, Tatschl, & Fasching, 2019; Ortegon et al., 2023).

Yapılan son in vitro ve in vivo çalışmalar, nikotin kronik olarak uygulandığında insülin direncini arttırıcı etkilere sahip olabileceğini düşündürmektedir (Michael & Olatunji, 2018). Sonuç olarak nikotinin uzun zamandır insülin direncine neden olduğu düşünülmektedir, ancak şimdiye kadar klinik ve hayvan çalışmalarından elde edilen sonuçların çelişkili olduğu görülmektedir.

Yapılan alışmalar ışığında bu tez çalışmasında elde edilen sonuçlara baktığımızda; nikotin bağımlı soydan gelen sıçanların vut ağırlıklarının, aynı yaşta olmalarına rağımen naıve sıçanlara göre daha düşük görülmektedir. Nikotin bağımlı soydan gelen ve nikotin uygulanan grup olan NTE grubundaki ağırlık değışimi göze çarpmaktadır. Düşük doz nikotin uygulanan haftalar boyunca bu gruptaki kilo artışı diğerk gruplara göre daha az olduğu görülmektedir. Diğerk taraftan uygulanan nikotinin dozu 2 katına çıkarıldığında ise vut ağırlığındaki düşüş göze çarpmaktadır. Buna ek olarak, öteki nikotin uygulanan grup olan NKE de dahil olmak üzere diğerk gruplardaki sıçanların hiçbirinin vut ağırlığında azalma görülmemektedir. Burdan ıkarılacak sonuç ise, nikotin yüksek dozlarda uygulandığında vut ağırlığında düşüşlere sebep olabilmektedir. Aynı zamanda, nikotin bağımlı soydan gelmenin de vut ağırlığı üzerindeki etkisi göze çarpmaktadır. Burdan elde edilen sonuçlar literatürde yapılan diğerk çalışmalar ile paralellik göstermektedir.

Açlık kan glukozu sonuçlarına bakıldığında, nikotin uygulanan gruplardaki kan glukoz seviyelerindeki artışılar göze çarpmaktadır. Nikotin tercih eden soydan gelen ve maksimum oranda nikotin tüketen grup olan NTE grubunun ortalama açlık kan glukoz seviyesinin 137 mg/dL olduğu görülmektedir. Bu değer diğerk gruplarla kıyaslandığında artışı anlamlı olduğu göze çarpmaktadır ($P<0,0001$). Diğerk taraftan nikotin bağımlı bir soydan gelmeyen fakat nikotin uygulanan grup olan NKE grubunun ortalama açlık kan glukoz seviyesinin ise 113.3 mg/dL olduğu görülmektedir. Diğerk gruplar ile kıyaslandığında burdaki artışı da anlamlı olduğu görülmektedir ($P<0,0001$). STE grubunun ortalama açlık kan glukoz değeri SKE'nin ortalama açlık kan glukoz değerine göre az da olsa yüksektir fakat bu artışı anlamlı olmadığı tespit edilmiştir. Buna ek olarak nikotin uygulanan NTE ve NKE grupları arasındaki açlık kan glukoz değeri farkı dikkat çekmektedir. Her iki gruba aynı dozda nikotin uygulansa da NTE grubu yüksek oranda nikotin tüketen bir soydan geldiği için, daha fazla nikotin tüketmiştir. Bu ise iki grup arasındaki açlık kan glukoz değeri farkının oluşmasına yol açmıştır. Her iki grup kıyaslandığı zaman NTE'deki artışı anlamlı olduğu göze çarpmaktadır ($P<0,0001$). Tüm bu sonuçlar birlikte yorumlandığında, literatürdeki sonuçlar ile benzerlik göstermektedir.

Dolaşımdaki insülin sonuçlarına bakıldığında ise açlık kan glukoza ile paralellik gösterdiği görülmektedir. Bu mantıklıdır çünkü açlık kan glukoz seviyesi arttıa, bunu düşürmek için daha fazla insulin salınımı gerçekleşmektedir.

Sonuçlara baktığımızda NTE grubunun ortalama dolaşımdaki insülin seviye 22,074 μ U/ml olarak karşımıza çıkmaktadır. NKE'nin 14,98 μ U/ml, STE'nin 10,799 μ U/ml, SKE'nin ise 10,43 μ U/ml olduğunu görmekteyiz. Burada nikotinin insülin seviyesini önemli bir şekilde arttırdığı görülmektedir. NTE grubundaki bu artış diğer gruplar ile kıyaslandığında anlamlı olarak karşımıza çıkmaktadır ($p < 0,0001$). Her iki nikotin verilen grup arasındaki insülin seviyesinin bu kadar farklı olması, ilk başlarda bağımlı soydan gelmenin de bu hormonun seviyesini yükseltebileceğini düşündürse de SKE-STE grupları arasında fark olamaması bağımlı soydan gelmenin insülin seviyesi üzerine etkisi olmadığını göstermektedir. NKE-NTE grupları arasındaki fark ise bağımlı soydan gelen sıçanların daha fazla nikotin tüketmesi ve bu da dolayısıyla insülin seviyesinin daha olmasına yol açmaktadır.

Açlık kan glukozu verileri ile insülin verileri birlikte ele alılıp her bir grup için HOMA-IR değerleri (insülin direnci) hesaplanmıştır. HOMA-IR değerlerinin 0,5 ile 1,4 arasında olması normal kabul edilmektedir, $\geq 1,9$ olması erken IR, $\geq 2,9$ olması ise IR göstergesidir (Jimenez-Maldonado, Garcia-Suarez, Renteria, Moncada-Jimenez, & Plaisance, 2020; Shanik et al., 2008). NTE grubunun ortalama HOMA-IR değeri 7,50667 olarak bulunmuştur. Bu değer üst sınır olan 2,9'un çok üstündedir, bu yüzden bu grupta insülin direnci gelişmiştir. Diğer nikotin alan grup NKE'de ise bu değer 4,19308 olduğu görülmektedir. Yine bu grupta da insülin direnci gelişmiştir. Kontrol gruplarında ise bu değer STE'de 2,504588 SKE'de 2,335441 olduğu görülmektedir ve bu gruplarda insülin direncinden söz etmek mümkün değildir.

Bütün bu sonuçlar birlikte ele alındığında, nikotinin açlık kan glukoz seviyesini arttırdığı ve dolaşımdaki insülin seviyelerinin artmasına yol açtığı tespit edilmiştir. Nikotin tüketimi ile bu sonuçların yüksekliği arasında doğru orantı olduğu görülmektedir. Sonuç olarak yükselen insülin ve kan glukoz değerleri insülin direncine yol açmıştır. Aynı zaman insülinin panktrestan salındığı hücreler olan β -hücre fonksiyonları incelenmiştir fakat gruplar arasında anlamlı bir değişimin olmadığı tespit edilmiştir. Bu da bize nikotinin β -hücre tahribatı oluşturmadığını göstermektedir. Bu sonuç mantıklıdır, dolaşımdaki insülin seviyesinin yüksek olduğu görülmektedir.

Kronik nikotin kullanımının gıda alımını baskıladığı, vücut ağırlığı artışını azalttığı ve enerji harcamasını artırdığı gösterilmiştir.

Bu nedenle tokluğu artıran dolaşımdaki leptin, insülin, glukagon, GLP-1, PYY gibi hormonlarda bir artış olabilecekken, açlığı ve beslenmeyi teşvik eden ghrelinde bir azalma olacağı varsayılabilir. (Shankar, Ramborger, Bonnet-Zahedi, Carrette, & George, 2024). Kronik nikotin kullanımı tip 2 diyabet gibi metabolik bozukluklara eğilimle ilişkilendirilmiştir ve bu kısmen kronik nikotin kullanımını takiben insülin direncinin indüklenmesinden kaynaklanabilmektedir (Cruz et al., 2019). Son zamanlarda yapılan bir çalışmada, bağımlı sıçanlarda kronik nikotin alımı, GLP-1, glukagon ve PYY seviyeleri ile kısa süreli gıda alımı arasındaki ilişkiyi değiştirmiş ve GLP-1 ve glukagon seviyelerini azaltmıştır (Shankar et al., 2024). Bizim çalışmamızda ise nikotin kullanımının kontrol gruplarına kıyasla dolaşımdaki glukagon seviyelerini azalttığı gösterilmiştir. Fakat bu azalışların anlamlı olmadığı görülmektedir. Ayrıca nikotinin bu beslenme hormonları üzerindeki etkisini ölçen çalışmalar farklı sonuçlar içermektedir, bu yüzden nikotinin glukagon üzerindeki etkisini inceleyen daha fazla çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır.

Nikotin gibi bağımlılık yapıcı maddelerin, doğal ödüllere pahasına uyuşturucu ödülünün aşırı değerlendirilmesine yol açarak pekiştirme öğrenme mekanizmalarını ele geçirdiği varsayılmaktadır. Uyuşturucu kaynaklı pekiştirme öğrenmesi genellikle nucleus accumbens'de (NAc) hücre dışı DA konsantrasyonunda bir artış içermesine rağmen, altta yatan moleküler ve hücresel mekanizmalar uyuşturucuya bağlıdır (Luscher, 2016).

Hücre tipi spesifik optogenetik manipülasyonlar, DA hücre aktivasyonunun bağımlılığa geçişi sağlamak için yeterli olduğunu ve DA nöron aktivasyonu ile uyuşturucuya uyumlu davranışlar arasında nedensel bağlantılar kurduğunu doğrulamıştır (Pascoli, Terrier, Hiver, & Luscher, 2015).

Ancak, böyle bir görüş, orta beyin DA nöronlarının heterojenliğini ve ventral tegmental alandaki (VTA) DA nöronlarından paralel olarak farklı mesajların iletilme olasılığını dikkate almamaktadır. Gerçekten de, VTA DA nöronları anatomik olarak farklı devrelere aittir, moleküler özelliklerinde farklılık gösterir ve dış uyaranlara çeşitli tepkiler vermektedir (Nguyen et al., 2021).

Nikotin bağımlılığının hayvan modelleri, tekrarlanan nikotin uygulamalarının mezokortikolimbik sistemi aktive ederek NAc, VTA ve PFC'te dopamin salınımında artışa yol açtığını göstermiştir (BİRDOĞAN A., 2021).

NAc, VTA gibi beyin bölgeleri uzun yıllardır araştırılan ve bağımlılık, ödül mekanizmaları ile ilişkilendirilmiş beyin bölgeleridir. Fakat son yıllarda yapılan araştırmalar bağımlılık ve yoksunluk gibi durumlarda orta beyin bölgesinde bulunan dorsal diensefalik iletim sisteminin aktif olduğunu tespit etmişlerdir. Medial Habenula ve IPN bu sistemin iki önemli parçasıdır ve evrimsel olarak yüksek oranda korunmuştur (Aizawa, Kobayashi, Tanaka, Fukai, & Okamoto, 2012; McLaughlin et al., 2017). Epitalamik medial habenula (MHb), üçgen septal çekirdek, septofimbral çekirdek, ventral tegmental alan ve rafe çekirdekleri de dahil olmak üzere çeşitli yapılardan girdiler alır. Araştırmalar ayrıca, MHb'nin nucleus accumbens'ten de girdiler aldığını göstermektedir (McLaughlin et al., 2017). Habenulanın (Hb) işlevlerini anlamaya yönelik artan ilgiyle birlikte, nörobilimciler Hb aktivitesindeki değişikliklerin, ruh hali, bağımlılık, kardiyovasküler bozukluk ve solunum hastalıkları dahil olmak üzere çeşitli hastalıkların patolojilerinde hayati bir rol oynadığı gösterilmiştir (Qu et al., 2020). Daha önce, Paulson ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada streptozotosin (STZ) ile indüklenen hiperglisemik sıçanlarda habenula (Hb) aktivitesinde değişiklikler tespit edilmiştir (Paulson PE, 2007). Yapılan diğer bir çalışmada ise, Hb'deki aşırı nöronal aktivite artışının depresyonu tetikleyen temel bir faktör olduğu belirtilmiştir. Ancak, diyabet patogenezinde Hb'nin mekanizmaları hala tam olarak anlaşılmamıştır (Qu et al., 2020). Bütün bu literatür bilgileri bize habenula bölgesinin bağımlılıkla ve glukoz metabolizması ile ilişkili olabileceğini göstermektedir.

TCF7L2 (eski adıyla TCF4), beyin, bağırsak ve pankreas dahil olmak üzere çeşitli dokularda ifade edilen Wnt sinyali ile ilişkili bir transkripsiyon faktörüdür.

Periferik insülin direnci tip 2 diyabet gelişimine katkıda bulunmaktadır. TCF7L2 bu hastalıkla sıkı bir şekilde ilişkilendirilmiştir, ancak kesin mekanizmanın anlaşılamamıştır. TCF7L2'nin rs7903146 ve rs12255372 gibi yaygın SNP'leri tip 2 diyabet ile ilişkilidir. Gerçekten de, çeşitli çalışmalar bu SNP'leri taşıyan hastaların bu hastalığın gelişimi için artmış riske sahip olabileceğini göstermiştir. Yapılan bir çalışmada, TCF7L2'nin sistemik aşırı ekspresyonu, BAC transgenik modellerinde hiperglisemiye teşvik ettiği gösterilmiştir (Oh et al., 2012).

Yapılan araştırmalar, TCF7L2'nin glikozla uyarılan insülin salgılanmasının düzenlenmesinde önemli bir rolü olabileceğini düşündürmektedir. Bununla birlikte, β -hücrelerinde salgılama üzerindeki etkilerin arkasındaki moleküler mekanizma hala belirsizliğini korumaktadır. Son zamanlarda yapılan bir çalışmada, siRNA ile 48 saat boyunca inkübe edilen olgun fare adacıklarında, TCF7L2'nin ekspresyonu hem mRNA hem de protein düzeyinde etkili bir şekilde azalmış ve glikoz uyarılarına yanıt olarak insülin salgılanması bozulmuştur. İnsülin salgılanmasındaki azalma TCF7L2 mRNA seviyelerindeki düşüşle orantılı olarak tespit edilmiş ve daha yüksek knockdown daha büyük bir salgı inhibisyonuna sebep olmuştur(Loder, da Silva Xavier, McDonald, & Rutter, 2008). Aynı çalışmada, TCF7L2'nin aşırı ekspresyonunun GLP-1'in salgı yanıtını etkilemediği görülmüştür. TCF7L2'nin azaltılması aynı zamanda birkaç β -hücreline özgü genin ifadesini de değiştirmiştir; insülin mRNA seviyelerindeki azalmaya glukagon mRNA seviyelerindeki artış eşlik etmiştir. Dolayısıyla TCF7L2, olgun β -hücrelerinde insülin salgılanmasını doğrudan düzenlemektedir (Loder et al., 2008). TCF7L2 varyantları, bozulmuş insülin salgılanması ve işlenmesi, artmış insülin direnci ve hiperglisemi dahil olmak üzere bozulmuş bir β -hücre fonksiyonu ile ilişkilendirilmiştir. Yapılan çeşitli çalışmalarda, TCF7L2 ekspresyonunun diyabetik deneklerden alınan pankreas adacıklarında upregüle olduğu ve insülin sekresyonu ile negatif korelasyon gösterdiğini öne sürülmüştür (Lee et al., 2008; Lyssenko et al., 2007). Bununla birlikte, TCF7L2'nin insan pankreas adacıklarında β -hücre sağkalımının ve işlevinin düzenlenmesinde gerekli olduğu düşünülmüş ve azalmış bir TCF7L2 protein ekspresyonunun, bozulmuş GLP-1 sinyali yoluyla glikoza yanıt olarak azalmış adacık insülin sekresyonundan sorumlu olduğu öne sürülmüştür (Yang, Li, Lee, & Shu, 2012). Genel olarak, in vivo çalışmaları TCF7L2'nin global olarak aşırı ekspresyonunun tip 2 diyabete karşı artan bir duyarlılığa yol açabileceğini desteklemektedir. Bu hipotezle tutarlı olarak, Savic ve arkadaşları yakın zamanda Tcf7l2 aşırı eksprese eden transgenik farelerin, heterozigot Tcf7l2 null farelere kıyasla karşılıklı fenotipler göstererek, HFD beslenmesinden sonra diyabet ve glukoz intoleransı geliştirme olasılığının yüksek olduğunu bildirmişlerdir (Savic et al., 2011). İlginç bir şekilde, TCF7L2 ifadesinin düzenlenmesi farklı dokularda değişkenlik gösteriyor gibi görünmektedir (Yang et al., 2012). Ayrıca, TCF7L2 geninin birkaç ekzon ve alternatif splicing ile karmaşık bir varyant modeli sergilediği bilinmektedir.

Bu TCF7L2 ek varyantları dokuya özgü bir şekilde dağıtılır ve bu da TCF7L2'nin WNT sinyalinin nükleer bir efektörü olarak dokuya özgü etkilerini güçlü bir şekilde etkileyebilmektedir (Yang et al., 2012).

Tcf7l2'nin susturulmasını takiben yapılan gen ifadesi analizi, fare pankreas adacıklarında GLP-1 reseptörünü kodlayan genin ifadesinde değişiklikler olduğunu ortaya koymuştur (da Silva Xavier et al., 2012).

Ayrıca GLP-1, b-cat Ser675 fosforilasyonunu uyararak ve TCF7L2 seviyelerini artırarak beyin Wnt sinyal yolunu olumlu şekilde düzenler. Bu çapraz konuşmanın periferik insülin duyarlılığını ve glukoz atımını nasıl kontrol ettiği bilinmemektedir ve daha fazla araştırılması gerekmektedir.

β -Hücre apoptozunun diyabette β hücrelerinin kaybının başlıca nedeni olduğu düşünülmektedir. Yapılan bir çalışmada geniposid, oksidatif stres kaynaklı nöron apoptozunu önleyebildiği ve INS-1 hücrelerinde glukagon benzeri peptid 1 reseptörünü (GLP-1R) aktive ederek glukozla uyarılan insülin salgısını iyileştirebilir (L.X. Guo, J.H. Liu, & Yin, 2014). GLP-1 reseptörü knockout edilmiş farelerden alınan adacıkların normal glukozla uyarılmış insülin salgısı sergilediği, ancak GLP-1 ile insülin salgısının artmasının bozulduğu bildirilmiştir (J. Liu et al., 2012).

GLP-1 reseptörleri (GLP-1R) de beyinde yaygın olarak ifade edilir ve nöroproteksiyondaki rolünün yanı sıra ödül yollarını da etkiler. Mevcut kanıtlar GLP-1'in ödül mekanizmasını etkilediğini göstermiştir. GLP-1R'ler, nükleus traktus solitariustan (NTS) doğrudan projeksiyonlar alan mezolimbik ödül yolunun alanlarında yaygın olarak ifade edilmektedir. Yapılan bir çalışmada, GLP-1 antagonistinin, Nucleus accumbens (NAc) fazik dopamin salınımının lityum klorür ile indüklenen baskılanmasını azalttığı gösterilmiştir (Eren-Yazicioglu, Yigit, Dogruoz, & Yapici-Eser, 2020; Fortin, Chartoff, & Roitman, 2016). Mezolimbik ödül sistemindeki GLP-1R özellikle hedonik yemenin kontrolünü etkilemektedir (Hernandez, O'Donovan, Ortinski, & Schmidt, 2019). Exendin-4, 39 amino asitli bir peptit hormondur. Doğal glukagon benzeri peptid 1 (GLP-1) ile amino asit bileşiminde %50 homolojiye sahiptir ve GLP-1 reseptörü için bir agonist olduğu bulunmuştur. Exendin-4 klinik olarak insülinoma ve tip 2 diyabet hastalarının tedavisinde kullanılmaktadır.

Ex-4, bazal lokomotor aktiviteyi etkilemeyen dozlarda, nikotin kaynaklı lokomotor davranışı azaltmış, dopamin salınımını hızlandırmış ve farelerde nikotin kaynaklı CPP (koşullu yer tercihi) 'yi bloke etmiştir (Egecioglu et al., 2013). Ex-4 ayrıca nikotin kaynaklı lokomotor duyarlılığını da ortadan kaldırmıştır. Yapılan bir çalışmada, Ex-4 (10 µg/kg) ve sitagliptin nikotin alımını azaltırken, GLP-1R KO fareleri nikotin alımını artırmış, ancak hiçbir gıda tepkilerini değiştirmemiştir. NTS GLP-1 nöronlarının kemogenetik aktivasyonu da nikotin alımını azaltmıştır. NTS GLP-1 nöronları interpedunküler çekirdeğe (IPN) medial habenula (MHb) projeksiyonları aktive etmiş ve IPN'ye GLP-1 uygulaması nikotin alımını azaltmış ve halsizliğe neden olmadan nikotin ödülünü zayıflatmıştır (Eren-Yazicioglu et al., 2020; Tuesta et al., 2017). Mevcut çalışmalar, GLP-1R stimülasyonunun Alzheimer, Parkinson, damar tıkanıklığı, travma, metabolik dejenerasyon, nöbet ve hatta Huntington hastalığı gibi çoklu hastalıklar üzerindeki faydalarını göstermektedir. GLP-1, Alzheimer hastalığında gözlenen nörobiyolojik değişikliklere karşı koruma sağlayan önemli bir moleküldür. AD'nin erken evrelerinde bile glikoz kullanımı ve enerji metabolizmasındaki eksiklikler yaygın olarak görülür ve GLP-1'in beyindeki etkileri, periferdeki pankreatik beta hücrelerinin korunması, çoğalması ve farklılaşmasındaki rolüne benzer. GLP-1 hayvanların vücut ağırlığını, kan glikozunu veya insülin seviyelerini değiştirmeyebilir; ancak beyindeki insülin direncini azaltır ve derin bir nöroprotektif etkiye sahiptir. GLP-1 ile yapılan çalışmalar, beyin insülin direncinin azaltılmasının tau fosforilasyonuna karşı da koruma sağlayabileceğini göstermektedir (Damla Erbil, 2019; Xu et al., 2015).

Sinaptik plastisite açısından, kemirgen çalışmaları GLP-1R stimülasyonunun ve GLP-1R agonist uygulamasının LTP'yi desteklediğini ve hipokampusa bağlı ilişkisel ve uzamsal öğrenmeyi geliştirdiğini göstermektedir. GLP-1R antagonisti ile birlikte tedavi bu etkileri tersine çevirerek, iyileşmelere GLP-1 sinyalinin aracılık ettiğini düşündürmektedir. Öte yandan, GLP-1R nakavtları LTP bozuklukları sergiler ve nesne tanıma, Morris Su Labirenti ve bağlamsal korku öğrenme performansı dahil olmak üzere çeşitli görevlerde bellek oluşumunda eksikliklere sahiptir. Dolayısıyla, GLP-1'in sinaptik güç, yeni sinaps oluşumu ve nörogenez için de önemli olduğu görülmektedir (Damla Erbil, 2019).

Nikotinin direkt olarak GSK3- β ekspresyonunu etkileyip etkilemediğine dair bir çalışma bulunmamaktadır. Fakat AD, PD gibi birçok nörodejeneratif hastalıklarla ilişkisi olduğu bilinmektedir.

Postmortem PD beyinlerinde nigral pigmentli nöronlarda GSK-3 β ekspresyonunun arttığı bulunmuştur (Nagao & Hayashi, 2009). Aynı zamanda, PD hastalarında periferik kan lenfositlerinde de artmış GSK-3 β protein seviyeleri bildirilmiştir (Armentero et al., 2011). Son yıllarda yapılan önemli bir çalışmada, ilk kez, GSK-3 β 'nin farmakolojik inhibisyonunun bir parkinson modelinde nöroprotektif etkiler ortaya çıkardığını göstermektedir (J. Li et al., 2020). Bunlara ek olarak, GSK-3 β aktivasyonu, iskeminin neden olduğu hücre ölümünün temel katkıları olan inflamasyon ve apoptozu indüklemektedir. CNS'de, GSK3- β daha çok bulunmaktadır ve ekspresyon düzeylerinin yaşla birlikte arttığı bilinmektedir.

Tiadiazolidinon ailesinden bir GSK-3 β inhibitörü olan Tideglusib, çeşitli nörolojik bozukluklarda klinik olarak test edilmiştir ve mikromolar aralıkta GSK-3 β 'yı inhibe ettiği gösterilmiştir (Mathuram, Reece, & Cherian, 2018). Tideglusib tedavisi ayrıca Alzheimer hastalarının beyin omurilik sıvısındaki beta-sekretaz 1 (BACE-1) ve fosfo-tau düzeylerini de azaltmıştır (Baird, Westwood, & Lovestone, 2015). GSK3- β sinyalinin AD'nın patofizyolojisi ile ilgisi göz önüne alındığında, inhibisyonunun terapötik potansiyeli, klinik öncesi ve klinik çalışmalarda geniş çapta araştırılmıştır.

Bunlara ek olarak, GSK-3 β 'nin yüksek ekspresyonu, insülin duyarlılığının azalması, kan glukozunun regülasyonu, insülin eksikliği ve insülin direnci ile ilişkilidir. Bu nedenle, GSK-3 β ile diyabet oluşumu arasındaki ilişkinin araştırılmasına giderek daha fazla ilgi gösterilmiştir. GSK-3 β 'nin DM'de önemli bir rol oynadığını, kan glukozunun dinamik düzenlenmesinin anahtarı olduğunu ve ayrıca insülin eksikliğine ve insülin direncine yol açan kilit faktörlerden biri olduğu bilinmektedir (Beurel et al., 2015).

Literatür ışığında bu çalışmadan elde ettiğimiz qPCR sonuçları kıyaslandığından, benzerlikler ve farklılıklar görülmektedir. Öncelikle nikotinin beyinde TCF7L2, GLP1R ve GSK3 β ekspresyonlarını inceleyen çalışma bulunmamaktadır. Bunun yanı sıra bu genler Tip 2 diyabet ile ilişkilendirildiği için, daha çok glukoz metabolizması üzerine etkileri inceleyen çalışmalar mevcuttur.

Fakat TCF7L2 ve GLP1R genlerinin knockout edilmesi ya da siRNA aracılığı ile susturulmasının nikotin alımını arttırdığı gösterilmiştir. Bizim çalışmamızda ise bu iki genin çalışılan bütün beyin bölgelerinde ekspresyonunun azaldığı tespit edilmiştir. TCF7L2'nin NAc'taki ekspresyonunu bakıldığında, nikotin alan grupta bu genin ifadesinin düştüğü tespit edilmiştir. NTE grubunda, NKE'ye göre fazla düşüş olmasının sebebi NTE grubunun daha fazla nikotin tüketmesi olarak yorumlanmaktadır. Nikotin alan iki grup arasında ve kontrol iki grup arasında anlamlı değişimler görülmemektedir. Bu ise bize nikotin bağımlı soydan gelmenin bu gen üzerine etkisi olmadığını göstermektedir. Bunun yanı sıra, gen ekspresyonundaki bu değişimin nikotin kaynaklı mı yoksa kan glukoz seviyesinin yükselmesinden dolayı salınan insülin kaynaklı mı olup olmadığı bilinmemektedir.

Aynı genin mHb bölgesindeki ekspresyonuna bakıldığında ise, gruplar arası anlamlılık farkı sadece NTE-STE ve NTE-SKE arasında görülmektedir. Bu genin mHb bölgesinde yüksek seviyelerde eksprese edilmesi ve nikotin alan gruplardaki ekspresyon seviyelerindeki düşüş, değişimlerin nikotin kaynaklı olduğunu düşündürmektedir. Diğer nikotin alan grup olan NKE'nin kontrol grupları ile arasında anlamlı bir değişim görülmemektedir. Sebebinin ise yine bu iki grup arasında tüketilen nikotin farkından kaynaklanmakta olduğu düşünülmektedir.

Bu genin VTA'daki ifadesinde ise SKE ile karşılaştırıldığında bütün gruplarda anlamlı düşüş görülmektedir. STE grubunun VTA bölgesindeki bu değişimin sebebi tam olarak bilinmemektedir.

Pankreasta ise bu genin ekspresyonunun beyindeki tersine arttığı görülmektedir. Burdaki artışın daha çok artan açlık kan glukoz seviyesinin yol açtığı insülin olduğu düşünülmektedir. Yani diğer bir deyişle, nikotinin pankreasta direkt olarak bu genin ekspresyonunu etkilemediği, bunu açlık kan glukoz seviyesinin yol açtığı insülin aracılığı ile yaptığı düşünülmektedir.

Bilindiği üzere GLP-1, TCF7L2'nin downstream bölgesinde bulunmaktadır ve TCF7L2'deki herhangi bir değişim GLP-1 salınımını GLP1R aracılığı ile değiştirmektedir. GLP1R ve TCF7L2'nin ko-eksprese olduğu düşünüldüğünde, TCF7L2'deki azalışlar GLP1R geninin ekspresyonlarının azalmasına sebep olmaktadır. GLP1R'nin beyin bölgelerindeki ekspresyonu TCF7L2 ile paralellik göstermektedir.

Aynı şekilde bu genin ekspresyonundaki düşüşlerin nikotin kaynaklı mı yoksa artan açlık kan glukoz seviyesinin yol açtığı insülin aracılığı ile mi olduğu bilinmemektedir.

GLP1R'nin ekspresyonu pankreasta insülin salınımı ile doğrudan ilişlidir. Bu genin artan ekspresyonları pankreatik β hücrelerinden insülin salınımını gerçekleştirmektedir. Biz ise bu çalışmada, GLP1R gen ifadesinin pankreasta arttığını tespit ettik. Bu artışların insülin seviyesindeki artışlara sebep olduğu düşünülmektedir. Sonuç olarak elde ettiğimiz veriler literatür bilgileri ile benzerlik göstermektedir. Bunun tam tersinin gösterildiği çalışmalar da mevcuttur.

GSK3 β ise TCF7L2'nin upstream bölgesinde bulunmaktadır. Bu genin ifadesinin artması TCF7L2'nin ifadesini azaltmaktadır. Beyin bölgelerinde bu genin ifadesinin arttığını tespit ederken, pankreasta anlamlı bir değişikliğe uğramadığı tespit edilmiştir.

Nikotin etkisini gösterdiği reseptörlerden biri olan $\alpha 7$ nAChR, CHRNA7 geni tarafından kodlanmaktadır. Beyinde $\alpha 7$ alt birimi, özellikle hipokampus ve serebral korteks olmak üzere öğrenme ve hafızayla ilgili bölgeler de dahil olmak üzere yüksek seviyelerde ifade edilmektedir. Son zamanlarda yapılan gen nakli ve antisens çalışmaları, $\alpha 7$ nAChR'lerin belirli bilişsel ve dikkat gerektiren görevlerde önemli roller oynadığını göstermiştir. Bu reseptörün geninden yoksun fareler, dikkat ve çalışma/epizodik hafıza alanları da dahil olmak üzere bilişte eksiklikler göstermektedir(Waring et al., 2008). Birçok nikotin bağımlılığı çalışmasında, farklı beyin bölgelerinde bu genin ekspresyonu incelenmiştir. Genel olarak kronik nikotin tedavisini takiben, $\alpha 7$ alt birimi mRNA seviyeleri SNpc, SNpr, VTA ve NAc gibi bölgelerde önemli ölçüde arttığı tespit edilmiştir (Gozen, Nesil, Kanit, Koylu, & Pogun, 2016; R. H. Liu, Mizuta, & Matsukura, 2004; Waring et al., 2008; Zhang et al., 2020).

Bizim çalışmamızda ise NAc, VTA ve mHb bölgelerinde nikotine bağlı olarak bu genin ekspresyonunun arttığı tespit edilmiştir. Her beyin bölgesinde gruplar arası anlamlılık değişmekle birlikte, genel olarak fazla nikotin tüketiminin bu genin ekspresyonunu arttırdığı tespit edilmiştir. Pankreasta ise bu genin ifadesi olmadığı tespit edilmiştir.

Yapılan alışmalar BDNF seviyelerinin nikotin maruziyeti ile değiştiğini göstermektedir. Bu alışmalar nikotinin yetişkin sıçanların hipokampus, frontal korteks ve striatumunda BDNF, sinir büyüme faktörü (NGF) ve fibroblast büyüme faktörü-2 (FGF-2) dahil olmak üzere birkaç farklı nörotrofin konsantrasyonunu artırdığını bildirmiştir. Deney hayvanı çalışmalarında, yeni doğan sıçan yavrularında kronik nikotin uygulaması, doğum sonrası gelişim sırasında BDNF, nörotrofin-3 (NT-3), FGF-2 ve insülin benzeri büyüme faktörü-1'in (IGF-1) mRNA ifadesini artırmıştır, ancak NGF mRNA ifadesini değiştirmemiştir. Kronik nikotin sıçanların hipokampusnda BDNF mRNA seviyelerini artırırken, akut nikotin uygulaması 2 ve 24 saatlik uygulamadan sonra hipokampusteki BDNF seviyelerini azaltmıştır. Kenny ve arkadaşları, tekrarlanan nikotin maruziyetinin ardından sıçan striatumunda BDNF ifadesinin hem protein hem de mRNA seviyelerinde azaldığını bulmuştur. Bununla birlikte, uzun süreli nikotin kullanımından sonra, nikotinin BDNF mRNA ekspresyonu üzerindeki inhibitör etkisi tolere edilebilir hale gelebilir, bu da beyindeki BDNF seviyelerini kademeli olarak artırabilmektedir(Kenny PJ, File SE, & M, **2000**; Romano et al., 2014).

Yapılan farklı çalışmalarda, nikotin uygulamasının beyin korteks ve hipokampus bölgelerinde BDNF gen ekspresyonunu arttırdığı gösterilmiştir (Romano et al., 2014; Romano, Fuso, & Laviola, 2013).

Diğer taraftan yükselmiş insülin seviyesinin ve insülin direncinin hem serum seviyesinde hem de gen ifadesi seviyesinde BDNF seviyelerini düşürdüğü tespit edilmiştir. Aynı zamanda nikotin aracılı salgılanan pro-inflamatuar sitokinler de BDNF ifadesinin azalmasına sebep olabilmektedir (Berbert-Gomes C et al., 2024; Elesawy, Raafat, Muqbalı, Abbas, & Sakr, 2021; Kale M et al., 2020; Price et al., 2021; Sangesa G et al., 2018).

Daha önce mHb bölgesinde BDNF'in ekspresyonunun çalışıldığı bir araştırmaya rastlanmamıştır. Çalışmamızda BDNF'in beyin bölgelerinde genel olarak ekspresyonunun azaldığı görülmektedir. Literatüre bakıldığı zaman nikotinin, farklı beyin bölgelerinde BDNF ekspresyonunu arttırdığı, insülin ve glukozun ise azalttığı görülmektedir.

Aynı zamanda GLP1R direkt olarak beyinde BDNF'in ekspresyonunu düzenlemektedir. GLP1R gen ifadesindeki düşüşler BDNF'in de ekspresyonunun düşmesine yol açabilmektedir(Damla Erbil, 2019; Eren-Yazicioglu et al., 2020).

Bütün bunlar birlikte ele alındığında, bu genin ifadesindeki değişimlere birçok etken sebep olabilmektedir. Çalışmamızda bulduğumuz sonuçları destekleyecek literatür bilgileri mevcutken, tam tersini gösteren çalışmalar da bulunmaktadır. Nörotrofik ailesinin bir parçası olan BDNF 'in ifadesi birçok etken aracılığı ile değişmektedir. Bu yüzden bizim sonuçlarımızda gördüğümüz BDNF 'in ifadesindeki azalma farklı yollar aracılığı ile de gerçekleşmiş olabilmektedir. Bunun için genom çapında daha fazla araştırma yapılması gerekmektedir. Ayrıca BDNF'in pankreasta ekspresyonuna rastlanmamıştır.

SONUÇ VE ÖNERİLER

Sonuç olarak, nikotin tüketiminin kan glukoz seviyelerinde artışa sebep olduğunu tespit ettik. Bu artış pankreatik β hücrelerinden insulin salınımını desteklemektedir. Artan insulin seviyesi ise NTE ve NKE gruplarında insulin direnci oluşturmuştur.

Aynı zamanda nikotin bağımlı soydan gelmenin nikotin tüketimini arttırdığını tespit ettik, fakat nikotin uygulaması yapılmayan soy grubu hayvanlarında gen düzeyinde ve hormon düzeyinde değişiklik tespit edemedik. Buradan, nikotin bağımlı soydan gelmenin tek başına bir etkisi olmamaktadır sonucunu çıkarmak mümkündür. Fakat nikotin bağımlı soya nikotin tercihi sunulduğunda naïve sıçanlara göre daha fazla tüketmektedirler.

Yapılan çalışmalar artan glukoz seviyesinin ve nikotin dolaşımdaki glukagon seviyesini arttıracığına dair kanıtlar sunsa da bizim çalışmamızda, glukagon miktarı azalmıştır. Fakat bu azalmadaki anlamlı farklılık sadece NTE-SKE grupları arasında görülmektedir, diğer gruplar arasında anlamlı bir farklılık yoktur.

Bunun yanı sıra HOMA- β değerleri hesaplanmış olup, herhangi bir pankreatik β hücre tahribati gözlenmemiştir. Bu mantıklıdır çünkü, böyle bir tahribat görülseydi insulin salınımının azalma gerekmekeydi.

Gen seviyesinde ise beyin dokularında TCF7L2, GLP1R, BDNF ekspresyonlarının azaldığını tespit ederken, CHRNA7 ve GSK3 β ifalarını azaldığını tespit ettik. Pankreasta CHRNA7 ve BDNF ekspresyonu saptanmamıştır. Buna ek olarak, pankreasta beyin dokularına ters olarak TCF7L2, GLP1R ifadelerinin arttığını tespit ederken, GSK3 β ifadesinin azaldığını tespit ettik.

Bu sonuçlar birlikte ele alındığında, artan glukoz ve insulin değerleri pankreasta TCF7L2, GLP1R ifadelerinin artmasına sebep olmuştur. BDNF ekspresyonunun azalması dikkat çekmektedir. Bu nikotin etkisi değil artan glukoz ve insulin etkisi olduğu düşünülmektedir.

Özetle, bu çalışma TCF7L2'nin nikotin ve glukoz metabolizmasının düzenlenmesinde önemli bir rol oynadığını ve biyolojik işlev değişikliğinin tip 2 diyabete yatkınlıkta değişikliğe neden olabileceğini göstermiştir. Bulgularımız, tip 2 diyabetin etiyojisine ilişkin içgörüler ve TCF7L2'nin metabolik düzenlemedeki rolünü değerlendirmek için gerekli önemli bilgiler sağlayabilir. Fakat nikotin bağımlılığındaki rolü için daha fazla araştırmaya ihtiyaç duyulmaktadır.

TCF7L2 gibi transkripsiyon faktörleri birçok gen ailesi tarafından düzenlenebilmektedir. O yüzden bu tarz kompleks çalışmalarda sadece gen ekspresyon verileri çok fazla bilgi vermemektedir. Bunun üzerine bu genlerin protein cevaplarına bakılması, konunun daha da aydınlanmasını sağlayabilir.

Ayrıca, nikotinin uygulandığı doza ve etki ettiği dokuya göre pre-inflamatuar ya da pro- inflammatuar etkilere sahip olduğu bilinmektedir. Pankreasta ve beyinde nikotinin inflamasyonu nasıl etkilediğini görmek için TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-10 gibi genlerin protein cevaplarına bakılabilir.

Buna ek olarak nikotin dopamin salımını etkilediği bilinmektedir. Bu yüzden elde edilen verilerin doğruluğunu arttırmak için nörotransmitterler üzerinde araştırma yapılabilir. Ayrıca son yıllarda GABAerjik nöronların da bağımlılıkla ilişkili olduğu düşünülmektedir GABA reseptörlerinin knockout olduğu sıçanlar üzerinde nikotinin etkisi araştırılabilir.

Son olarak ise GLP-1 ve GLP1R'nün uzun yıllardır glukoz ve insulin metabolizması ile ilişkisi bilinmektedir. Son yıllarda artan bir trend olarak GLP1R agonistlerinin bağımlılık üzerindeki etkileri araştırılabilir.

KAYNAKLAR

- Aizawa, H., Kobayashi, M., Tanaka, S., Fukai, T., & Okamoto, H. (2012). Molecular characterization of the subnuclei in rat habenula. *J Comp Neurol*, 520(18), 4051-4066. doi:10.1002/cne.23167
- Ardissone Korat, A. V., Willett, W. C., & Hu, F. B. (2014). Diet, lifestyle, and genetic risk factors for type 2 diabetes: a review from the Nurses' Health Study, Nurses' Health Study 2, and Health Professionals' Follow-up Study. *Curr Nutr Rep*, 3(4), 345-354. doi:10.1007/s13668-014-0103-5
- Armentero, M. T., Sinforiani, E., Ghezzi, C., Bazzini, E., Levandis, G., Ambrosi, G., . . . Blandini, F. (2011). Peripheral expression of key regulatory kinases in Alzheimer's disease and Parkinson's disease. *Neurobiol Aging*, 32(12), 2142-2151. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2010.01.004
- Baird, A. L., Westwood, S., & Lovestone, S. (2015). Blood-Based Proteomic Biomarkers of Alzheimer's Disease Pathology. *Front Neurol*, 6, 236. doi:10.3389/fneur.2015.00236
- Benowitz, N. L. (2009). Pharmacology of nicotine: addiction, smoking-induced disease, and therapeutics. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 49, 57-71. doi:10.1146/annurev.pharmtox.48.113006.094742
- Benowitz, N. L. (2010). Nicotine addiction. *N Engl J Med*, 362(24), 2295-2303. doi:10.1056/NEJMra0809890
- Berbert-Gomes C, Ramos JS, Silveira-Rodrigues JG, Leite DMM, Melo BP, & DD, S. (2024). An acute bout of resistance exercise increases BDNF in hippocampus and restores the long-term memory of insulin-resistant rats. *Experimental Brain Research*, 242.
- Berger, D. F., Lombardo, J. P., Peck, J. A., Faraone, S. V., Middleton, F. A., & Youngsetob, S. L. (2010). The effects of strain and prenatal nicotine exposure on ethanol consumption by adolescent male and female rats. *Behav Brain Res*, 210(2), 147-154. doi:10.1016/j.bbr.2010.01.047
- Beurel, E., Grieco, S. F., & Jope, R. S. (2015). Glycogen synthase kinase-3 (GSK3): regulation, actions, and diseases. *Pharmacol Ther*, 148, 114-131. doi:10.1016/j.pharmthera.2014.11.016
- Bird, A. (2007). Perceptions of epigenetics. *Nature*, 447(7143), 396-398. doi:10.1038/nature05913
- BİRDOĞAN A., S. E., GÜRKAN F.T., GÖKMEN R.C., BİNTEPE M.Ö., AYPAR B., KESER A., BALKAN B., KOYLU E.O., KANIT L., GÖZEN O. (2021). Chronic oral nicotine administration and withdrawal regulate the expression of neuropeptide Y and its receptors in the mesocorticolimbic system. *Neuropeptides*, 90, 10. doi:10.1016/j.npep.2021.102184
- Brath, H., Kaser, S., Tatschl, C., & Fasching, P. (2019). [Smoking, alcohol and diabetes (Update 2019)]. *Wien Klin Wochenschr*, 131(Suppl 1), 67-70. doi:10.1007/s00508-019-1455-z
- Brunzell, D. H., Russell, D. S., & Picciotto, M. R. (2003). In vivo nicotine treatment regulates mesocorticolimbic CREB and ERK signaling in C57Bl/6J mice. *J Neurochem*, 84(6), 1431-1441. doi:10.1046/j.1471-4159.2003.01640.x
- Bruschetta, G., & Diano, S. (2019). Brain-to-pancreas signalling axis links nicotine and diabetes. *Nature*, 574(7778), 336-337. doi:10.1038/d41586-019-02975-w

- Cepeda-Benito, A. (2020). Nicotine Effects, Body Weight Concerns and Smoking: A Literature Review. *Curr Pharm Des.*, 26(20), 2316-2326. doi:10.2174/1381612826666200401083040
- Chang, C. M., Edwards, S. H., Arab, A., Del Valle-Pinero, A. Y., Yang, L., & Hatsukami, D. K. (2017). Biomarkers of Tobacco Exposure: Summary of an FDA-Sponsored Public Workshop. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 26(3), 291-302. doi:10.1158/1055-9965.EPI-16-0675
- Changeux, J. P. (2010). Nicotine addiction and nicotinic receptors: lessons from genetically modified mice. *Nat Rev Neurosci*, 11(6), 389-401. doi:10.1038/nrn2849
- Chen, H., Hiler, K. A., Tolley, E. A., Matta, S. G., & Sharp, B. M. (2012). Genetic factors control nicotine self-administration in isogenic adolescent rat strains. *PLoS ONE*, 7(8), e44234. doi:10.1371/journal.pone.0044234
- Chiolero, A., Faeh, D., Paccaud, F., & Cornuz, J. (2008). Consequences of smoking for body weight, body fat distribution, and insulin resistance. *Am J Clin Nutr*, 87(4), 801-809. doi:10.1093/ajcn/87.4.801
- Collaborators, G. B. D. T. (2017). Smoking prevalence and attributable disease burden in 195 countries and territories, 1990-2015: a systematic analysis from the Global Burden of Disease Study 2015. *Lancet*, 389(10082), 1885-1906. doi:10.1016/S0140-6736(17)30819-X
- Collins, A. C., Pogun, S., Nesil, T., & Kanit, L. (2012). Oral Nicotine Self-Administration in Rodents. *J Addict Res Ther*, S2. doi:10.4172/2155-6105.S2-004
- Constantin Polychronakos, Q. L. (2011). Understanding type 1 diabetes through genetics: advances and prospects. *Nat Rev Genet.*, 18(12), 11.
- Cruz, B., Flores, R. J., Uribe, K. P., Espinoza, E. J., Spencer, C. T., Serafine, K. M., . . . O'Dell, L. E. (2019). Insulin modulates the strong reinforcing effects of nicotine and changes in insulin biomarkers in a rodent model of diabetes. *Neuropsychopharmacology*, 44(6), 1141-1151. doi:10.1038/s41386-018-0306-3
- da Silva Xavier, G., Mondragon, A., Sun, G., Chen, L., McGinty, J. A., French, P. M., & Rutter, G. A. (2012). Abnormal glucose tolerance and insulin secretion in pancreas-specific Tcf7l2-null mice. *Diabetologia*, 55(10), 2667-2676. doi:10.1007/s00125-012-2600-7
- Damla Erbil, C. Y. E., Çağrı Demirel, Mehmet Utku Küçüker, Ihsan Solaroğlu, Hale Yapıcı Eser. (2019). GLP-1's role in neuroprotection: a systematic review. *Brain Injury*, 33(6), 734-819.
- De Biasi, M., & Dani, J. A. (2011). Reward, addiction, withdrawal to nicotine. *Annu Rev Neurosci*, 34, 105-130. doi:10.1146/annurev-neuro-061010-113734
- dos Santos Coura, R., & Granon, S. (2012). Prefrontal neuromodulation by nicotinic receptors for cognitive processes. *Psychopharmacology (Berl)*, 221(1), 1-18. doi:10.1007/s00213-011-2596-6
- Duncan, A., Heyer, M. P., Ishikawa, M., Caligiuri, S. P. B., Liu, X. A., Chen, Z., . . . Kenny, P. J. (2019). Habenular TCF7L2 links nicotine addiction to diabetes. *Nature*, 574(7778), 372-377. doi:10.1038/s41586-019-1653-x
- Egecioglu, E., Steensland, P., Fredriksson, I., Feltmann, K., Engel, J. A., & Jerlhag, E. (2013). The glucagon-like peptide 1 analogue Exendin-4 attenuates alcohol mediated behaviors in rodents. *Psychoneuroendocrinology*, 38(8), 1259-1270. doi:10.1016/j.psyneuen.2012.11.009

- Egemen KAYA, D. A., Havva AKPINAR. (2019). Bağımlılığın Patofizyolojisi- Pathophysiology of Addiction. *Medical Journal of Mugla Sıtkı Kocman University*, 6(3), 4.
- Elesawy, B. H., Raafat, B. M., Muqbali, A. A., Abbas, A. M., & Sakr, H. F. (2021). The Impact of Intermittent Fasting on Brain-Derived Neurotrophic Factor, Neurotrophin 3, and Rat Behavior in a Rat Model of Type 2 Diabetes Mellitus. *Brain Sci*, 11(2). doi:10.3390/brainsci11020242
- Eren-Yazicioglu, C. Y., Yigit, A., Dogruoz, R. E., & Yapici-Eser, H. (2020). Can GLP-1 Be a Target for Reward System Related Disorders? A Qualitative Synthesis and Systematic Review Analysis of Studies on Palatable Food, Drugs of Abuse, and Alcohol. *Front Behav Neurosci*, 14, 614884. doi:10.3389/fnbeh.2020.614884
- Fang, F., Andersen, A. M., Philibert, R., & Hancock, D. B. (2023). Epigenetic biomarkers for smoking cessation. *Addict Neurosci*, 6. doi:10.1016/j.addicn.2023.100079
- Fortin, S. M., Chartoff, E. H., & Roitman, M. F. (2016). The Aversive Agent Lithium Chloride Suppresses Phasic Dopamine Release Through Central GLP-1 Receptors. *Neuropsychopharmacology*, 41(3), 906-915. doi:10.1038/npp.2015.220
- Fowler, C. D., & Kenny, P. J. (2014). Nicotine aversion: Neurobiological mechanisms and relevance to tobacco dependence vulnerability. *Neuropharmacology*, 76 Pt B(0 0), 533-544. doi:10.1016/j.neuropharm.2013.09.008
- Fowler, C. D., Turner, J. R., & Imad Damaj, M. (2020). Molecular Mechanisms Associated with Nicotine Pharmacology and Dependence. *Handb Exp Pharmacol*, 258, 373-393. doi:10.1007/164_2019_252
- Gipson, C. D., & Fowler, C. D. (2020). Nicotinic Receptors Underlying Nicotine Dependence: Evidence from Transgenic Mouse Models. *Curr Top Behav Neurosci*, 45, 101-121. doi:10.1007/7854_2020_134
- Gozen, O., Nesil, T., Kanit, L., Koylu, E. O., & Pogun, S. (2016). Nicotinic cholinergic and dopaminergic receptor mRNA expression in male and female rats with high or low preference for nicotine. *Am J Drug Alcohol Abuse*, 42(5), 556-566. doi:10.1080/00952990.2016.1198799
- Hall, F. S., Markou, A., Levin, E. D., & Uhl, G. R. (2012). Mouse models for studying genetic influences on factors determining smoking cessation success in humans. *Ann N Y Acad Sci*, 1248, 39-70. doi:10.1111/j.1749-6632.2011.06415.x
- Han, X., Zhou, N., Hu, H., Li, X., & Liu, H. (2020). Nicotine Alleviates Cortical Neuronal Injury by Suppressing Neuroinflammation and Upregulating Neuronal PI3K-AKT Signaling in an Eclampsia-Like Seizure Model. *Neurotox Res*, 38(3), 665-681. doi:10.1007/s12640-020-00265-2
- Hernandez, N. S., O'Donovan, B., Ortinski, P. I., & Schmidt, H. D. (2019). Activation of glucagon-like peptide-1 receptors in the nucleus accumbens attenuates cocaine seeking in rats. *Addict Biol*, 24(2), 170-181. doi:10.1111/adb.12583
- Hitoshi Okamoto, M. A., Hidenori Aizawa. (2012). Genetic dissection of the zebrafish habenula, a possible switching board for selection of behavioral strategy to cope with fear and anxiety. *Dev. Neurobiol*, 72, 386-394.
- Ibias, J., O'Dell, L. E., & Nazarian, A. (2018). Insulin dependent and independent normalization of blood glucose levels reduces the enhanced rewarding effects

- of nicotine in a rodent model of diabetes. *Behav Brain Res*, 351, 75-82. doi:10.1016/j.bbr.2018.05.018
- Jamal, B. A. K., Linda J Neff , Jennifer Whitmill , Stephen D Babb, Corinne M Graffunder (2016). Current Cigarette Smoking Among Adults - United States, 2005-2015. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.*, 11(44), 6. doi:10.15585/mmwr.mm6544a2
- Jasinska, A. J., Zorick, T., Brody, A. L., & Stein, E. A. (2014). Dual role of nicotine in addiction and cognition: a review of neuroimaging studies in humans. *Neuropharmacology*, 84, 111-122. doi:10.1016/j.neuropharm.2013.02.015
- Jimenez-Maldonado, A., Garcia-Suarez, P. C., Renteria, I., Moncada-Jimenez, J., & Plaisance, E. P. (2020). Impact of high-intensity interval training and sprint interval training on peripheral markers of glycemic control in metabolic syndrome and type 2 diabetes. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 1866(8), 165820. doi:10.1016/j.bbadis.2020.165820
- Kale M, Nimje N, Aglawe MM, Umekar M, Taksande B, & N, K. (2020). Agmatine modulates anxiety and depression-like behaviour in diabetic insulin-resistant rats. *Brain Res*. doi:10.1016/j.brainres.2020.147045
- Kenny PJ, File SE, & M, R. (2000). Acute nicotine decreases, and chronic nicotine increases the expression of brain-derived neurotrophic factor mRNA in rat hippocampus *Molecular Brain Research*, 85.
- L.X. Guo, J.H. Liu, & Yin, F. (2014). Regulation of insulin secretion by geniposide: possible involvement of phosphatidylinositol 3-phosphate kinase. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 18(9), 1287-1294.
- Laviolette, S. R., & van der Kooy, D. (2004). The neurobiology of nicotine addiction: Bridging the gap from molecules to behaviour. *Nature Reviews Neuroscience*, 5(1), 55-65.
- Le Foll, B., Piper, M. E., Fowler, C. D., Tonstad, S., Bierut, L., Lu, L., . . . Hall, W. D. (2022). Tobacco and nicotine use. *Nat Rev Dis Primers*, 8(1), 19. doi:10.1038/s41572-022-00346-w
- Leao, R. M., Cruz, F. C., Marin, M. T., & Planeta Cda, S. (2012). Stress induces behavioral sensitization, increases nicotine-seeking behavior and leads to a decrease of CREB in the nucleus accumbens. *Pharmacol Biochem Behav*, 101(3), 434-442. doi:10.1016/j.pbb.2012.01.025
- Lee, S. H., Demeterco, C., Geron, I., Abrahamsson, A., Levine, F., & Itkin-Ansari, P. (2008). Islet specific Wnt activation in human type II diabetes. *Exp Diabetes Res*, 2008, 728763. doi:10.1155/2008/728763
- Li, J., Ma, S., Chen, J., Hu, K., Li, Y., Zhang, Z., . . . Huang, Q. (2020). GSK-3beta Contributes to Parkinsonian Dopaminergic Neuron Death: Evidence From Conditional Knockout Mice and Tideglusib. *Front Mol Neurosci*, 13, 81. doi:10.3389/fnmol.2020.00081
- Li, X. C., Karadsheh, M. S., Jenkins, P. M., Brooks, J. C., Drapeau, J. A., Shah, M. S., . . . Stitzel, J. A. (2007). Chromosomal loci that influence oral nicotine consumption in C57BL/6J x C3H/HeJ F2 intercross mice. *Genes Brain Behav*, 6(5), 401-410. doi:10.1111/j.1601-183X.2006.00266.x
- Liu, J., , Yin, F., , Xiao, H., , . . . Gao, X. (2012). Glucagon-like peptide 1 receptor plays an essential role in geniposide attenuating lipotoxicity-induced β -cell apoptosis. 26(7), 1093-1097. doi:<https://doi.org/10.1016/j.tiv.2012.07.004>

- Liu, R. H., Mizuta, M., & Matsukura, S. (2004). The expression and functional role of nicotinic acetylcholine receptors in rat adipocytes. *J Pharmacol Exp Ther*, 310(1), 52-58. doi:10.1124/jpet.103.065037
- Liu, Z., & Habener, J. F. (2008). Glucagon-like peptide-1 activation of TCF7L2-dependent Wnt signaling enhances pancreatic beta cell proliferation. *J Biol Chem*, 283(13), 8723-8735. doi:10.1074/jbc.M706105200
- Loder, M. K., da Silva Xavier, G., McDonald, A., & Rutter, G. A. (2008). TCF7L2 controls insulin gene expression and insulin secretion in mature pancreatic beta-cells. *Biochem Soc Trans*, 36(Pt 3), 357-359. doi:10.1042/BST0360357
- Loukas, A., Marti, C. N., & Perry, C. L. (2019). Trajectories of Tobacco and Nicotine Use Across Young Adulthood, Texas, 2014-2017. *Am J Public Health*, 109(3), 465-471. doi:10.2105/AJPH.2018.304850
- Luscher, C. (2016). The Emergence of a Circuit Model for Addiction. *Annu Rev Neurosci*, 39, 257-276. doi:10.1146/annurev-neuro-070815-013920
- Lyssenko, V., Lupi, R., Marchetti, P., Del Guerra, S., Orho-Melander, M., Almgren, P., . . . Groop, L. (2007). Mechanisms by which common variants in the TCF7L2 gene increase risk of type 2 diabetes. *Journal of Clinical Investigation*, 117(8), 2155-2163. doi:10.1172/jci30706
- Maddatu, J., Anderson-Baucum, E., & Evans-Molina, C. (2017). Smoking and the risk of type 2 diabetes. *Transl Res*, 184, 101-107. doi:10.1016/j.trsl.2017.02.004
- Maisonneuve, I. M., & Glick, S. D. (2003). Anti-addictive actions of an iboga alkaloid congener: a novel mechanism for a novel treatment. *Pharmacol Biochem Behav*, 75(3), 607-618. doi:10.1016/s0091-3057(03)00119-9
- Mathuram, T. L., Reece, L. M., & Cherian, K. M. (2018). GSK-3 Inhibitors: A Double-Edged Sword? - An Update on Tideglusib. *Drug Res (Stuttg)*, 68(8), 436-443. doi:10.1055/s-0044-100186
- McLaughlin, I., Dani, J. A., & De Biasi, M. (2015). Nicotine withdrawal. *Curr Top Behav Neurosci*, 24, 99-123. doi:10.1007/978-3-319-13482-6_4
- McLaughlin, I., Dani, J. A., & De Biasi, M. (2017). The medial habenula and interpeduncular nucleus circuitry is critical in addiction, anxiety, and mood regulation. *J Neurochem*, 142 Suppl 2(Suppl 2), 130-143. doi:10.1111/jnc.14008
- Mette Kruse Klausen, M. T., Gitta Wortwein, Anders Fink-Jensen. (2022). The role of glucagon-like peptide 1 (GLP-1) in addictive disorders. *Br J Pharmacol*, 179(4), 16. doi:10.1111/bph.v179.4/issuetoc
- Michael, O. S., & Olatunji, L. A. (2018). Ameliorative effect of nicotine exposure on insulin resistance is accompanied by decreased cardiac glycogen synthase kinase-3 and plasminogen activator inhibitor-1 during oral oestrogen-progestin therapy. *Arch Physiol Biochem*, 124(2), 139-148. doi:10.1080/13813455.2017.1369549
- Mojtaba Golpich, E. A., Fatemeh Hemmati, Norlinah Mohamed Ibrahim, Behrouz Rahmani, Zahurin Mohamed, Azman Ali Raymond, Leila Dargahi, Rasoul Ghasemi, Abolhassan Ahmadiani. (2015). Glycogen synthase kinase-3 beta (GSK-3 β) signaling: Implications for Parkinson's disease. *Pharmacol Res.*, 97, 10.
- Nagao, M., & Hayashi, H. (2009). Glycogen synthase kinase-3 β is associated with Parkinson's disease. *Neurosci Lett*, 449(2), 103-107. doi:10.1016/j.neulet.2008.10.104

- Nesil, T., Kanit, L., Li, M. D., & Pogun, S. (2013). Nine generations of selection for high and low nicotine intake in outbred Sprague-Dawley rats. *Behav Genet*, 43(5), 436-444. doi:10.1007/s10519-013-9605-y
- Nesil, T., Kanit, L., Ugur, M., & Pogun, S. (2015). Nicotine withdrawal in selectively bred high and low nicotine preferring rat lines. *Pharmacol Biochem Behav*, 131, 91-97. doi:10.1016/j.pbb.2015.02.009
- Nguyen, C., Mondoloni, S., Le Borgne, T., Centeno, I., Come, M., Jehl, J., . . . Faure, P. (2021). Nicotine inhibits the VTA-to-amygdala dopamine pathway to promote anxiety. *Neuron*, 109(16), 2604-2615 e2609. doi:10.1016/j.neuron.2021.06.013
- Nizri, E., Irony-Tur-Sinai, M., Lory, O., Orr-Urtreger, A., Lavi, E., & Brenner, T. (2009). Activation of the cholinergic anti-inflammatory system by nicotine attenuates neuroinflammation via suppression of Th1 and Th17 responses. *J Immunol*, 183(10), 6681-6688. doi:10.4049/jimmunol.0902212
- Oh, K. J., Park, J., Kim, S. S., Oh, H., Choi, C. S., & Koo, S. H. (2012). TCF7L2 modulates glucose homeostasis by regulating CREB- and FoxO1-dependent transcriptional pathway in the liver. *PLoS Genet*, 8(9), e1002986. doi:10.1371/journal.pgen.1002986
- Olivier George, S. G., Marc R. Azar, Pietro Cottone, Eric P. Zorrilla, Loren H. Parsons, Laura E. O'Dell, Heather N. Richardson, and George F. Koob. (2007). CRF–CRF1 system activation mediates withdrawal-induced increases in nicotine self-administration in nicotine-dependent rats. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(43), 17198–17203.
- Ortegon, S., Giner, P., Cruz, B., Carcoba, L. M., Clapp, B., Clegg, D. J., & O'Dell, L. E. (2023). Effectiveness of pharmacotherapies for diabetes on nicotine, food, and water intake in insulin-resistant rats. *Adv Drug Alcohol Res*, 3, 11812. doi:10.3389/adar.2023.11812
- Pascoli, V., Terrier, J., Hiver, A., & Luscher, C. (2015). Sufficiency of Mesolimbic Dopamine Neuron Stimulation for the Progression to Addiction. *Neuron*, 88(5), 1054-1066. doi:10.1016/j.neuron.2015.10.017
- Paulson PE, W. J. a. M. T. (2007). Concurrent Activation of the Somatosensory Forebrain and Deactivation of Periaqueductal Grey Associated With Diabetes-Induced Neuropathic Pain. *Exp Neurol*, 208(2), 305–313. doi:10.1016/j.expneurol.2007.09.001
- Paxinos G, W. C. (2006). The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates: Hard Cover Edition. *Elsevier*.
- Picciotto, M. R., & Kenny, P. J. (2013). Molecular mechanisms underlying behaviors related to nicotine addiction. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 3(1), a012112. doi:10.1101/cshperspect.a012112
- Pipkin, J. A., Cruz, B., Flores, R. J., Hinojosa, C. A., Carcoba, L. M., Ibarra, M., . . . O'Dell, L. E. (2017). Both nicotine reward and withdrawal are enhanced in a rodent model of diabetes. *Psychopharmacology (Berl)*, 234(9-10), 1615-1622. doi:10.1007/s00213-017-4592-y
- Portugal, G. S., & Gould, T. J. (2008). Genetic variability in nicotinic acetylcholine receptors and nicotine addiction: converging evidence from human and animal research. *Behav Brain Res*, 193(1), 1-16. doi:10.1016/j.bbr.2008.05.006
- Price, J. B., Yates, C. G., Morath, B. A., Van De Wakker, S. K., Yates, N. J., Butters, K., . . . Tye, S. J. (2021). Lithium augmentation of ketamine increases insulin

- signaling and antidepressant-like active stress coping in a rodent model of treatment-resistant depression. *Transl Psychiatry*, 11(1), 598. doi:10.1038/s41398-021-01716-w
- Przemysław Duda, J. W., Tomasz Wójtowicz, Olga Wójcicka, Michał Jaśkiewicz, Dominika Drulis-Fajdasz, Dariusz Rakus, James A McCubrey, Agnieszka Gizak. (2018). Targeting GSK3 signaling as a potential therapy of neurodegenerative diseases and aging. *Expert Opin Ther Targets.*, 22(10), 833-848.
- Qu, P., Wang, Y., Liu, L., Qi, M., Sun, Y., Zheng, S., . . . Yang, L. (2020). Habenula lesions improve glucose metabolism in rats with type 2 diabetes by increasing insulin sensitivity and inhibiting gluconeogenesis. *BMJ Open Diabetes Res Care*, 8(1). doi:10.1136/bmjdr-2020-001250
- Rezvani, A. H., Slade, S., Wells, C., Petro, A., Lumeng, L., Li, T. K., . . . Levin, E. D. (2010). Effects of sazetidine-A, a selective alpha4beta2 nicotinic acetylcholine receptor desensitizing agent on alcohol and nicotine self-administration in selectively bred alcohol-preferring (P) rats. *Psychopharmacology (Berl)*, 211(2), 161-174. doi:10.1007/s00213-010-1878-8
- Robinson, C. D., Waters, A. J., Kang, N., & Sofuoglu, M. (2017). Neurocognitive Function as a Treatment Target for Tobacco Use Disorder. *Current Behavioral Neuroscience Reports*, 4(1), 10-20. doi:10.1007/s40473-017-0105-x
- Romano, E., De Angelis, F., Ulbrich, L., De Jaco, A., Fusco, A., & Laviola, G. (2014). Nicotine exposure during adolescence: cognitive performance and brain gene expression in adult heterozygous reeler mice. *Psychopharmacology (Berl)*, 231(8), 1775-1787. doi:10.1007/s00213-013-3388-y
- Romano, E., Fusco, A., & Laviola, G. (2013). Nicotine restores Wt-like levels of reelin and GAD67 gene expression in brain of heterozygous reeler mice. *Neurotox Res*, 24(2), 205-215. doi:10.1007/s12640-013-9378-3
- Ruby Klink, A. d. K. d. E., Michele Zoli and Jean-Pierre Changeux. (2001). Molecular and Physiological Diversity of Nicotinic Acetylcholine Receptors in the Midbrain Dopaminergic Nuclei. *The Journal of Neuroscience*, 21(5), 11.
- Rupprecht, L. E., Smith, T. T., Donny, E. C., & Sved, A. F. (2017). Self-administered nicotine differentially impacts body weight gain in obesity-prone and obesity-resistant rats. *Physiol Behav*, 176, 71-75. doi:10.1016/j.physbeh.2017.02.007
- Sangüesa G, Cascales M, Griñán C, Sánchez RM, Roglans N, Pallàs M, . . . M, A. (2018). Impairment of Novel Object Recognition Memory and Brain Insulin Signaling in Fructose- but Not Glucose-Drinking Female Rats. *Mol Neurobiol*, 55(8). doi:10.1007/s12035-017-0863-1
- Sari, M. I., Sari, N., Darlan, D. M., & Prasetya, R. J. (2018). Cigarette Smoking and Hyperglycaemia in Diabetic Patients. *Open Access Maced J Med Sci*, 6(4), 634-637. doi:10.3889/oamjms.2018.140
- Savic, D., Ye, H., Aneas, I., Park, S. Y., Bell, G. I., & Nobrega, M. A. (2011). Alterations in TCF7L2 expression define its role as a key regulator of glucose metabolism. *Genome Res*, 21(9), 1417-1425. doi:10.1101/gr.123745.111
- Schneider, T., Ilott, N., Brolese, G., Bizarro, L., Asherson, P. J., & Stolerman, I. P. (2011). Prenatal exposure to nicotine impairs performance of the 5-choice

- serial reaction time task in adult rats. *Neuropsychopharmacology*, 36(5), 1114-1125. doi:10.1038/npp.2010.249
- Shanik, M. H., Xu, Y., Skrha, J., Dankner, R., Zick, Y., & Roth, J. (2008). Insulin resistance and hyperinsulinemia: is hyperinsulinemia the cart or the horse? *Diabetes Care*, 31 Suppl 2, S262-268. doi:10.2337/dc08-s264
- Shankar, K., Ramborger, J., Bonnet-Zahedi, S., Carrette, L. L. G., & George, O. (2024). Acute nicotine intake increases feeding behavior through decreasing glucagon signaling in dependent male and female rats. *Horm Behav*, 159, 105447. doi:10.1016/j.yhbeh.2023.105447
- Skok, M. V., Grailhe, R., Agenes, F., & Changeux, J. P. (2007). The role of nicotinic receptors in B-lymphocyte development and activation. *Life Sci*, 80(24-25), 2334-2336. doi:10.1016/j.lfs.2007.02.005
- Solberg, L. I., Desai, J. R., O'Connor, P. J., Bishop, D. B., & Devlin, H. M. (2004). Diabetic patients who smoke: are they different? *Ann Fam Med*, 2(1), 26-32. doi:10.1370/afm.36
- Sun, Y., Koyama, Y., & Shimada, S. (2022). Inflammation From Peripheral Organs to the Brain: How Does Systemic Inflammation Cause Neuroinflammation? *Front Aging Neurosci*, 14, 903455. doi:10.3389/fnagi.2022.903455
- Tiwari, R. K., Sharma, V., Pandey, R. K., & Shukla, S. S. (2020). Nicotine Addiction: Neurobiology and Mechanism. *J Pharmacopuncture*, 23(1), 1-7. doi:10.3831/KPI.2020.23.001
- Tuesta, L. M., Chen, Z., Duncan, A., Fowler, C. D., Ishikawa, M., Lee, B. R., . . . Kenny, P. J. (2017). GLP-1 acts on habenular avoidance circuits to control nicotine intake. *Nat Neurosci*, 20(5), 708-716. doi:10.1038/nn.4540
- Turner, J. R., Gold, A., Schnoll, R., & Blendy, J. A. (2013). Translational research in nicotine dependence. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 3(3), a012153. doi:10.1101/cshperspect.a012153
- Valentina Echeverria, J. A. G. a. G. E. B. (2016). Neuroinflammation: A Therapeutic Target of Cotinine for the Treatment of Psychiatric Disorders? *Current Pharmaceutical Design*, 22(10), 10. doi:10.2174/138161282210160304112511
- Valentine, G., & Sofuoglu, M. (2018). Cognitive Effects of Nicotine: Recent Progress. *Curr Neuropsychopharmacol*, 16(4), 403-414. doi:10.2174/1570159X15666171103152136
- Vink, J. M., Willemsen, G., & Boomsma, D. I. (2005). Heritability of smoking initiation and nicotine dependence. *Behav Genet*, 35(4), 397-406. doi:10.1007/s10519-004-1327-8
- Wakschlag, L. S., Benjamin B. Lahey, Rolf Loeber, Stephanie M. Green, Rachel A. Gordon, and Bennett L. Leventhal. (1997). Maternal Smoking during Pregnancy and the Risk of Conduct Disorder in Boys. *Archives of General Psychiatry*, 54(7), 670-676.
- Wang, Q., , Du, W., , Wang, H., , . . . Jin, X. (2023). Nicotine's effect on cognition, a friend or foe? *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 123. doi:<https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2023.110723>
- Waring, J. F., Abel, S., Li, J., Bitner, R. S., Nikkel, A. L., Blomme, E. A., . . . Gopalakrishnan, M. (2008). Analysis of gene expression profiles in rat hippocampus following treatment with nicotine and an alpha7 nAChR selective agonist. *Neurosci Res*, 60(3), 266-274. doi:10.1016/j.neures.2007.11.008

- Willi C, B. P., Ghali WA, Faris PD, Cornuz J. (2007). Active smoking and the risk of type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis. *JAMA*, 298(22). doi:10.1001/jama.298.22.2654
- Winzer-Serhan, U. H. (2008). Long-term consequences of maternal smoking and developmental chronic nicotine exposure. *Frontiers in Bioscience*, 13(2), 3.
- Xu, W., Yang, Y., Yuan, G., Zhu, W., Ma, D., & Hu, S. (2015). Exendin-4, a glucagon-like peptide-1 receptor agonist, reduces Alzheimer disease-associated tau hyperphosphorylation in the hippocampus of rats with type 2 diabetes. *J Invest Med*, 63(2), 267-272. doi:10.1097/JIM.0000000000000129
- Xue, R., Wan, Y., Sun, X., Zhang, X., Gao, W., & Wu, W. (2019). Nicotinic Mitigation of Neuroinflammation and Oxidative Stress After Chronic Sleep Deprivation. *Front Immunol*, 10, 2546. doi:10.3389/fimmu.2019.02546
- Yang, H., Li, Q., Lee, J. H., & Shu, Y. (2012). Reduction in Tcf7l2 expression decreases diabetic susceptibility in mice. *Int J Biol Sci*, 8(6), 791-801. doi:10.7150/ijbs.4568
- Zeyi Huang , D. W., Xilin Qu , Meixiang Li , Ju Zou and Sijie Tan (2020). BDNF and nicotine dependence: associations and potential mechanisms. *Reviews in the Neurosciences*. doi:10.1515/revneuro-2020-0044
- Zhang, W. X., Chen, H. J., Fan, J., Li, G. L., Sun, A., Lan, L. Y., . . . Yan, Y. E. (2020). The association between maternal nicotine exposure and adipose angiogenesis in female rat offspring: A mechanism of adipose tissue function changes. *Toxicol Lett*, 318, 12-21. doi:10.1016/j.toxlet.2019.10.007
- Zhou, Z., Liu, F., Wang, L., Zhu, B., Chen, Y., Yu, Y., & Wang, X. (2020). Inflammation has synergistic effect with nicotine in periodontitis by up-regulating the expression of alpha7 nAChR via phosphorylated GSK-3beta. *J Cell Mol Med*, 24(4), 2663-2676. doi:10.1111/jcmm.14986
- Zhu, J., Nelson, K., Toth, J., & Muscat, J. E. (2019). Nicotine dependence as an independent risk factor for atherosclerosis in the National Lung Screening Trial. *BMC Public Health*, 19(1), 103. doi:10.1186/s12889-019-6419-8

EKLER

EGE ÜNİVERSİTESİ HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU

SAYI: 2022-072R1
KONU: Onay

28.12.2022

Etik kurulumuza yapmış olduğunuz başvuru doğrultusunda “NİKOTİN BAĞIMLI SIÇAN SOYLARINDA TCF7L2’NİN NİKOTİN BAĞIMLILIĞI VE GLUKOZ METABOLİZMASI ÜZERİNE ETKİLERİ” isimli araştırma projeniz değerlendirilmiştir.

Yürütücü: Doç. Dr. Buket Kosova, Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji AD
Doç. Dr. Oğuz Gözen, Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji AD
Dok. Öğr. İbrahim Halil Çitçi, Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji AD

Proje başvuru formunuzda belirtildiği koşullarda 40 adet erişkin erkek Sprague Dawley sıçan deney hayvanı kullanarak araştırmayı gerçekleştirmeniz kurumumuz tarafından uygun bulunmuştur. Saygılarımla bilgilerinizi rica ederim.

Prof. Dr. N. Ülkü KARABAY YAVAŞOĞLU
(E.Ü. Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanı)

Prof. Dr. Altuğ YAVAŞOĞLU

Prof. Dr. Ayül ÖNAL

Prof. Dr. Hüseyin TEZEL

Prof. Dr. Figen KIRKPINAR

Prof. Dr. Haşmet ÇAĞIRGAN

Prof. Dr. Uğur KAYA

Prof. Dr. Okan BİLGE

Doç. Dr. Tayfun YOLDAŞ

Dr. Öğr. Üyesi Sumru SÖZER KARADAĞLI

Uzm.Vet. Hek. F. Emrah SOYLU

Özcan NALBANTOĞLU

Melek Merve AFSAROĞLU

TEŞEKKÜR

İlk olarak doktora eğitimim boyunca beni sürekli destekleyen, her zor anımda yanımda olan danışmanım Prof. Dr. Buket KOSOVA hocama teşekkürlerimi sunarım. Bana tanıdığı sayısız fırsatlar için minnettarım ve ayrıca bana göstermiş olduğu olağanüstü mentorluğu doktora eğitimim boyunca birçok alanda benim gelişmemi sağladı. Kendisinin bu eşsiz desteği olmasa tezin tamamlanması mümkün olmazdı. En zor anlarım da bile yanımda olduğu ve hiçbir zaman beni geri çevirmediği için kendisine minnettarım.

İkinci danışmanım olan ve akademik alanda birçok şey öğrendiğim Fizyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Oğuz GÖZEN'e teşekkürlerimi sunarım. Aynı zamanda deney hayvanı çalışmalarında beni her zaman destekleyen Dr. Ramazan Can GÖKMEN hocama, Prof. Dr. Lutfiye KANIT'a, Prof. Dr. Ersin OĞUZ KOYLU'ya şükranlarımı sunmak isterim.

Her zaman bize kapısı açık olan ve her sorduğumuz sorunun cevabını bulabildiğimiz Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı başkanı Prof. Dr. Cumhuri GÜNDÜZ'e, bana kattığı eşsiz tecrübelerden dolayı Prof. Dr. Vildan BOZOK ÇETİNTAŞ'a ve bana verdiği fırsatlardan dolayı Doç. Dr. Nur SELVİ GÜNEL'e teşekkürlerimi sunarım.

Her anımda yanımda olan, isteklerimi hiçbir zaman geri çevirmeyen, yardımını benden esirgemeyen, zor zamanlarımda destek olan ve bana her zaman mükemmel bir komşu olan Ayşe ÇEKİN'e, gerek bölümde gerekse sosyal hayatta hep yanımda olan ve İzmir'de güzel zamanlar geçirmemi sağlayan Çağla YURT, Kutay BULUT, İrem KARACAN, Zeynep Gaye HAMARAT ve Sude TINAZ'a teşekkürlerimi sunuyorum.

Ege Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projeleri koordinatörlüğüne bu tez çalışmasına destek olduklarından dolayı teşekkür ederim.

Son olarak, maddi manevi her türlü yanımda olan, desteklerini her zaman hissettiğim canım annem Hülya ÇİTÇİ'ye, babam Ömer Faruk ÇİTÇİ'ye, abim Muzaffer ÇİTÇİ'ye ve kardeşim Mustafa ÇİTÇİ'ye bana inandıkları ve bu yolda güvendikleri için sonuz teşekkürlerimi sunuyorum. Onların varlığı bana her zaman güç olmuştur.

İzmir, 29.09.2024

İbrahim Halil ÇİTÇİ