



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

**ANJİYOTENSİN RESEPTÖR BLOKERİ OLAN TELMİSARTANIN  
ALKOL BAĞIMLILIĞI VE NÜKLEUS AKÜMBENS'DE DOPAMİN  
SALINMASI ÜZERİNE ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

**Dr. KUTLUHAN TEZCAN**  
**UZMANLIK TEZİ**

**İSTANBUL 2012**





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

**ANJİYOTENSİN RESEPTÖR BLOKERİ OLAN TELMİSARTANIN  
ALKOL BAĞIMLILIĞI VE NÜKLEUS AKÜMBENS'DE DOPAMİN  
SALINMASI ÜZERİNE ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

**Dr. KUTLUHAN TEZCAN**  
**UZMANLIK TEZİ**

**Danışman: Doç. Dr. REZZAN GÜLHAN**

**İSTANBUL 2012**

## ÖNSÖZ

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

*Prof. Dr. M. Zafer Gören'e,*

Çalışmalarımı yüksek öngörülerıyla şekillendiren, bilimsel yaklaşımları ile daima yol gösteren ve her zaman yanımda olduğunu hissettiğim çok değerli danışman hocam

*Doç. Dr. Rezzan Gülhan'a,*

Benden yardımlarını, desteğini ve bilgisini esirgemeyerek eğitim sürecimde büyük desteği olan çok değerli hocalarım

*Prof. Dr. M. Kemal Berkman ile Prof. Dr. Filiz Onat'a,*

*Sardinian alcohol preferring rats* (sP- Sardinya alkol tercih eden sıçanlar)'ın teminini sağlayan, desteklerini ve bilgi birikimini esirgemeyen

*Prof. Giancarlo Colombo'ya,*

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

*Prof. Dr. Ahmet Akıcı'ya, Prof. Dr. Atila Karaalp'e, Doç. Dr. Hasan Raci*

*Yananlı'ya,*

Tezimin hazırlanmasında başından sonuna kadar bana destek olan ve tamamlanmasında büyük emeği olan sevgili

*Uzm. Dr. Medine Gülçebi İldrisoğlu ve Uzm. Dr. Esra Küçükibrahimoğlu'ya,*

Birlikte olmaktan her zaman mutluluk duyduğum sevgili çalışma arkadaşlarım

*Ece İskender, Sema Ketenci, Eren Sakallı, Özlem Akman, Volkan Aydın, Emine*

*Özdamar, Tuğba Eryiğit, Afsaneh Azhari, Mahluga Jafarova Demirkapu, Melisa*

*Kaleli, Başak Dönertaş, Betilay Topkara, Şule Giray, Nurettin Demirci'ye,*

Çalışmamızı destekleyen *Marmara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu'na*

Ve bugüne kadar benim için göstermiş oldukları özveri, hoşgörü ve desteklerinden ötürü sevgili

*Annem, Babam, ve Eşime*

teşekkür ederim.

Kasım 2012

Dr. Kutluhan Tezcan

## ÖZET

Alkol bağımlılığı ciddi bir sağlık sorunudur ancak altında yatan mekanizmalar tam olarak aydınlatılamamıştır. Renin-anjiyotensin sisteminin (RAS) de bu mekanizmalar arasında yeri olduğunu gösteren çeşitli çalışmalar mevcuttur.

Bu çalışmada bir anjiyotensin reseptör blokleri (ARB) olan telmisartanın intraserebroventriküler (icv) uygulamasının, iki şişe serbest tercihli alkol bağımlılık modelinde *Sardinian alcohol preferring* (sP) sıçanların alkol tüketimine etkisi araştırılmıştır. Ayrıca, Wistar sıçanlarda akut alkol uygulaması ile nükleus akümbensden (NAcc) indüklenen dopamin salınımına etkisi mikrodiyaliz yöntemiyle incelenmiştir.

Bu amaçla sP sıçanlara stereotaksik cerrahi ile intraserebroventriküler (icv) kanül, Wistar sıçanlara ise icv kanül ve NAcc'ye mikrodiyaliz probu yerleştirilmiştir. sP sıçanlara telmisartan (25, 50 ve 100 nmol) ve nalokson (30 µg) icv olarak uygulanmıştır. Mikrodiyaliz deneyinde Wistar sıçanlara telmisartanın (100) nmol dozu ve takiben 1,5 gr/kg intraperitoneal alkol uygulaması, diyalizatlar 20 dk'lık aralıklarla toplanmıştır. Elde edilen diyalizat örnekleri yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) ve elektrokimyasal dedektör ile analiz edilmiştir.

Telmisartan (100 nmol) ve nalokson (30 µg) sP sıçanların alkol tüketimini yem ve su tüketimlerini etkilemeden anlamlı bir şekilde baskılamıştır. Telmisartanın etkisi karanlık periyodun 120. dk'sında başlamış ve 24 saat sonuna kadar devam etmiştir. Nalokson alkol tüketimini sadece ilk 30 dk'da baskılamıştır. Telmisartan NAcc'den akut alkol ile indüklenen dopamin salınımını kontrol grubuna göre [0-20] ve [20-40] dk zaman aralıklarında azaltmış ama bu azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.

Bu çalışmada RAS'ın santral düzeyde farmakolojik olarak telmisartanın icv uygulaması ile baskılanmasının, sP sıçanların alkol tüketimini anlamlı bir şekilde azalttığı gösterilmiştir. Bu sonuçlar RAS'ın alkol bağımlılığının tedavisinde potansiyel bir mekanizma olarak araştırılması gerektiğini göstermektedir.

**Anahtar sözcükler:** alkol bağımlılığı, mikrodiyaliz, Renin-anjiyotensin sistemi, sP sıçan, telmisartan, iki şişe serbest tercih

## ABSTRACT

Alcohol addiction is a serious disorder. However, the underlying mechanism of alcohol addiction is not fully clarified. There are several studies indicating a relationship between renin-angiotensin system (RAS) and alcohol addiction.

The aim of this project was to study the effects of intracerebroventricular (icv) telmisartan, an angiotensin receptor blocker (ARB), on alcohol consumption of *Sardinian alcohol preferring* (sP) rats with two-bottle free choice paradigm. We also aimed to examine the effect of telmisartan on dopamine release from *nucleus accumbens* (NAcc) of Wistar rats after acute application of alcohol in a microdialysis study.

sP rats were stereotaxically implanted with an (icv) cannula and Wistar rats were stereotaxically implanted with an icv cannula and a microdialysis probe to NAcc. Icv injections of telmisartan (25, 50 ve 100 nmol) and naloxon (30 µg) were investigated on sP rats. In microdialysis experiments following 100 nmol telmisartan dose 1,5 g/kg intraperitoneal alcohol was applied to Wistar rats. Samples were collected in 20 min intervals. Dialysate samples were analyzed by using high performance liquid chromatography (HPLC) with electrochemical detector.

Telmisartan (100 nmol) and naloxon (30 µg) significantly suppressed the alcohol consumption of sP rats without affecting their food and water consumption. The suppressive effect of telmisartan on alcohol consumption started at 120. min time point of dark cycle and continued for 24 hour. Naloxone suppressed the alcohol consumption only in the first 30 min. Telmisartan reduced the increase in dopamine release from NAcc induced by acute alcohol administration at [0-20] and [20-40] min time intervals but this reduction was not found to be statistically significant.

In this study pharmacological suppression of central RAS by icv telmisartan significantly decreased alcohol consumption of sP rats. These findings indicates that RAS should be examined as a potential mechanism that can be exploited for the treatment of alcohol addiction.

**Keywords:** alcohol addiction, sP rat, renin-angiotensin system, telmisartan, microdialysis, two bottle free choice

## İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfalar</u>
Önsöz.....	i
Özet.....	ii
İngilizce özet (Abstract).....	iii
Simgeler ve Kısaltmalar.....	vi
1. Giriş ve Amaç .....	1
2. Genel Bilgiler .....	3
2.1. Madde ve alkol bağımlılığı.....	3
2.1.1. Tanım.....	3
2.1.2. Epidemiyoloji.....	6
2.1.3. Patofizyoloji.....	7
2.1.3.1. Sinir yolakları .....	8
2.2. Alkol .....	12
2.2.1. Alkolün farmakokinetik özellikleri.....	13
2.2.2. Alkolün farmakodinamik özellikleri.....	15
2.2.3. Alkolün etki mekanizması.....	16
2.2.4. Alkol bağımlılığındaki sinir yolakları.....	16
2.3. Renin-anjiyotensin sistemi.....	17
2.3.1. Renin.....	17
2.3.2. Anjiyotensinojen.....	19
2.3.3. Anjiyotensinler.....	20
2.3.4. Anjiyotensin dönüştürücü enzim.....	21
2.3.4.1. Anjiyotensin dönüştürücü enzim 2.....	21
2.3.5. Anjiyotensin peptidlerin üretiminde görev alan diğer enzimler.....	21
2.3.6. Anjiyotensin reseptörleri.....	21
2.3.6.1. AT <sub>1</sub> reseptörleri.....	22

2.3.6.2. AT <sub>2</sub> reseptörleri.....	22
2.3.6.3. AT <sub>4</sub> reseptörleri.....	22
2.3.7. Lokal renin-anjiyotensin sistemi.....	23
2.4. Alkol bağımlılık modelleri.....	23
2.4.1. <i>Sardinian alcohol preferring rats</i> (sP) (Sardinya alkol tercih eden sıçan).....	25
3. Gereç ve Yöntem.....	28
3.1. Hayvanların özellikleri.....	28
3.2. İki şişe serbest tercihli alkol bağımlılık modeli.....	28
3.2.1. Deney hayvanlarının gruplara ayrılması.....	29
3.3. Deney protokolü.....	30
3.3.1. İki şişe serbest tercihli alkol tüketim deneyleri.....	30
3.3.2. Mirodializ deneyi.....	31
3.4. Maddeler ve enjeksiyonlar.....	31
3.5. Stereotaksik cerrahi yöntemi.....	32
3.6. Mikrodializ probunun hazırlanması.....	33
3.7. Mikrodializ örneklerinin toplanması.....	33
3.8. Dopamin analizi için yüksek basınçlı sıvı kromatografi (HPLC) metodu.....	33
3.9. Histolojik doğrulama.....	34
3.10. Verilerin analizi.....	35
4. Bulgular.....	36
4.1. Alkol tüketim deneyleri.....	36
4.1.1. İki şişe serbest tercihli alkol tüketim deneyi.....	36
4.1.2. Stereotaksik cerrahinin sP sıçanların alkol tüketimi üzerine etkisi.....	36
4.1.3. Telmisartanın santral uygulamasının sP sıçanların alkol tüketimine etkisi.....	38
4.1.3.1. Farklı telmisartan dozlarının santral uygulamasının sP sıçanların 24 saatlik alkol tüketimine etkisi.....	38
4.1.3.2. İcv telmisartan tedavisinin sP sıçanların farklı zaman aralıklarında alkol tüketimine etkisi.....	41

4.1.3.3. Naloksonun santral uygulamasının iki şişe serbest tercihli alkol bağımlılık modelinde sP sıçanların alkol tüketimine etkisi.....	45
4.2. Mikrodializ deneyleri.....	47
4.3. Bulgular özet.....	49
5. Tartışma ve Sonuçlar.....	51
5.1. Telmisartanın iki şişe serbest tercihli alkol bağımlılık modelinde sP sıçanların alkol tüketimine etkisi.....	51
5.2. Naloksonun iki şişe serbest tercihli alkol bağımlılık modelinde sP sıçanların alkol tüketimin etkisi .....	54
5.3. Telmisartanın akut alkol uygulaması ile Wistar sıçanlarda NAcc bölgesinde indüklenen dopamin salınımındaki artışa olan etkisi.....	55
5.4. Çalışmanın kısıtlılıkları.....	56
5.5. Çalışma sonuçlarının ortaya koyduğu hedefler.....	57
5.6. Sonuçlar özet.....	58
6.Kaynaklar.....	59
7.Ekler.....	69

## SİMGELER VE KISALTMALAR

5-HT	:Serotonin
ACTH	:Adrenokortikotropik hormon
ADE	:Anjiyotensin dönüştürücü enzim
ADE2	:Anjiyotensin dönüştürücü enzim 2
AngI	:Anjiyotensin 1
AngII	:Anjiyotensin 2
ARB	:Anjiyotensin reseptör blokleri
AT <sub>1</sub>	:Anjiyotensin I Reseptörü
AT <sub>2</sub>	:Anjiyotensin II Reseptörü
AT <sub>4</sub>	:Anjiyotensin IV Reseptörü
CB	:Kanabinoid
CB <sub>1</sub>	:Kanabinoid 1 reseptörleri
CRF	:Kortikotropin salıverici faktör
DSÖ	:Dünya Sağlık Örgütü
DSM-IV-TR	:Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders Fourth Edition Text Revision
GABA	:Gamma-aminobutirik asit
Glut4	:Glukoz taşıyıcısı 4
HPLC	:Yüksek performanslı sıvı kromatografi
ICD-10	:International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems 10 <sup>th</sup> Revision
icv	:İntraserebroventriküler
ip	:İntraperitoneal
IRAP	:İnsülin regulated aminopeptidaz
LD50	:Letal doz 50
NAcc	:Nükleus akübens
NAD	:Nikotinamid adenin dinükleotid
NMDA	:N-metil-D-aspartat
RAS	:Renin-anjiyotensin sistemi
sP sıçan	:Sardinian alcohol preferring rats (Sardinya alkol tercih eden sıçan)
sNP sıçan	:Sardinian alcohol non-preferring rats (Sardinya alkol tercih etmeyen sıçan)
VTA	:Ventral tegmental alan
yBOS	:Yapay beyin omurilik sıvısı

## 1. GİRİŞ VE AMAÇ

Dünya Sağlık Örgütü'nün (DSÖ) tanımına göre "Alkol bağımlılığı, tekrarlayıcı alkol kullanımı sonucu oluşan, tipik olarak alkol tüketimi için güçlü bir istek, alkol tüketimindeki kontrolün kaybı, zararlı sonuçlarına rağmen kullanımına devam etme, alkol tüketimine diğer sosyal aktiviteler ve yükümlülükler göre öncelik verme, zamanla tolerans gelişimi ve bazen de fiziksel yoksunluk sendromu belirtileri ile karakterize, davranışsal, bilişsel ve fizyolojik olaylar bütünüdür" (Dünya Sağlık Örgütü, Global Alcohol Report, 2011).

Alkol bağımlılığı ve alkolün kötüye kullanımı dünya çapında yılda yaklaşık olarak 2,5 milyon insanın hayatına mal olan ciddi bir sağlık sorunudur. Dünya çapında tüm erkek ölümlerinin %6,2'si tüm kadın ölümlerinin ise %1,1'i alkol kullanımı ile ilişkilendirilmiştir (Dünya Sağlık Örgütü, Global Alcohol Report, 2011).

Alkol bağımlılığının altında yatan mekanizmaların tam olarak aydınlatılamamış olması ve günümüzde alkol bağımlılığında kullanılan ilaçların sayı ve etkinliklerinin yetersiz olması alkol bağımlılığı için kullanılacak yeni ajanların araştırılmasını gerekli kılmaktadır (Johnson, 2008).

Alkol bağımlılığı ile ilgili yapılan çeşitli klinik ve deneysel çalışmalarda, alkol alımının plazma renin seviyelerini arttırdığı gösterilmiştir (Puddey ve diğ., 1995). Ayrıca, insanlarda yüksek anjiyotensin dönüştürücü enzim (ADE) aktivitesiyle karakterize ADE DD genotipinin alkol bağımlılığına yatkınlık riskini yükselttiği bildirilmiştir (Garibb and Peters, 1998).

Sıçanlarda yapılan çalışmalarda plazma anjiyotensin düzeylerinin alkol tüketimine bağlı olarak arttığı (Wright ve diğ., 1986), anjiyotensin 2 (AngII) nin intraserebroventriküler (icv) uygulamasının farelerde (Fuxe ve diğ., 1980) ve sıçanlarda (Fitts, 1993) alkol tüketimini arttırdığı gösterilmiştir.

Ayrıca, anjiyotensin I (AT<sub>1</sub>) reseptörü ve anjiyotensin II (AT<sub>2</sub>) reseptörünün beyinde bağımlılık ile ilgili yollarda yer alan en önemli yapılardan biri olan nükleus akübens'te (NAcc) eksprese edildiği gösterilmiştir (Weisinger ve diğ., 1999b). Başka bir çalışmada AngII'nin bu yollarda bağımlılık için en önemli

nörotransmitter olan dopamin salınımını stimüle ettiği gösterilmiştir (Mendelsohn, 1993).

Transgenik fare modelinde yapılan bir çalışmada da, anjiyotensin geninin aşırı ekspresyonu olan farelerde alkol tüketiminin arttığı, anjiyotensin geni silinmiş farelerde ise azaldığı gösterilmiştir (Maul ve diğ., 2001). Anjiyotensin reseptörleri silinmiş ( $AT_1$  *knockout* ve  $AT_2$  *knockout*) hayvanlarla yapılan farklı bir çalışma anjiyotensinin alkol tüketimi üzerine olan etkilerini  $AT_1$  reseptörü üzerinden gösterdiğini ortaya koymuştur (Maul ve diğ., 2005). Bu bulgular renin-anjiyotensin sisteminin (RAS) alkol bağımlılığının patofizyolojisinde rolü olabileceğini göstermektedir.

Bu tez çalışmasında, santral anjiyotensin reseptörlerinin alkol bağımlılığındaki rolünün incelenmesi amacı ile bir anjiyotensin reseptör blokörü olan telmisartanın icv uygulamasının, iki şişe serbest tercihli alkol bağımlılık modelinde *Sardinian alcohol preferring* (Sardinya alkol tercih eden; sP) sıçanların alkol tüketim ve alkol tercihlerine etkisi araştırılmıştır. Ayrıca, Wistar sıçanlarda akut alkol uygulaması ile NAcc'den indüklenen dopamin salınımındaki artışa yine santral uygulanan telmisartanın etkisinin mikrodializ yöntemiyle araştırılması hedeflenmiştir.

## **2. GENEL BİLGİLER**

### **2.1. Madde ve Alkol Bağımlılığı**

#### **2.1.1. Tanım**

Madde kullanımı; bireyin, santral sinir sistemi üzerinde hoşnutluk yaratıcı etkisi nedeniyle herhangi bir bağımlılık maddesini kullanmasıdır (Balseven ve diğ., 2002).

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

Birey madde kullanımı üzerindeki kontrolünü kaybetmemişse ve kronik kompulsif madde arama davranışı mevcut değil ise, kısaca DSM-IV-TR (Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders Fourth Edition Text Revision-Ruhsal Bozuklukların Tanısal ve Sayımsal Elkitabı 4. Baskı Metin Revizyonu)'de tanımlanan madde kötüye kullanım kriterlerini sağlamıyorsa kontrollü ya da sosyal kullanıcı olarak sınıflandırılabilir.

Maddenin kötüye kullanımı ise madde kullanımına bağlı belirgin problemlerin ortaya çıkmasına rağmen bireyin madde kullanımına devam etmesidir fakat birey madde bağımlısı olma kriterlerini sağlayamamaktadır. Madde kötüye kullanımının DSM-IV-TR kriterleri Tablo 1'de verilmiştir.

Madde bağımlılığı, maddeyi arama ve kullanma dürtüsü, madde kullanımını sınırlama kontrolünün kaybı ve madde kullanımının engellenmesi sonucu ortaya çıkan disfori, anksiyete ve sinirlilik gibi negatif duygusal durumlar ile karakterize, tekrarlayıcı ve kronik bir hastalıktır (Koob ve Le Moal, 1997). Madde bağımlısı birey, madde kullanımından kaynaklanan belirgin problemlere rağmen madde kullanımına devam etmektedir. Bu süreçteki bilişsel, davranışsal ve fizyolojik semptomlar toplamı, madde bağımlılığının en önemli özelliğini oluşturmaktadır (First, 1994).

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

DSM-IV	ICD-10
<p>A.12 aylık period içerisinde aşağıdakilerden bir veya birden fazlasını içeren, klinik durumda bozulmaya yol açan madde kullanım paterni.</p> <ol style="list-style-type: none"><li>1. İş, okul ve ev hayatındaki yükümlülüklerin yerine getirilmesinin engellemesine yol açan tekrarlayıcı madde kullanımı.</li><li>2. Kullanımının fiziksel zarara sebep olabilecek koşullarda tekrarlayıcı madde kullanımı.</li><li>3. Tekrarlayıcı madde kullanılmasından kaynaklanan yasal sorunlarla karşılaşılması.</li><li>4. Maddenin etkisiyle sosyal ve bireyler arası ilişkilerde kalıcı ya da tekrarlayıcı sorunlar oluşmasına yada var olan sorunları artmasına rağmen madde kullanımına devam edilmesi.</li></ol>	<p>A. Sağlığa zarar veren madde kullanım paterni. Söz konusu zarar fiziksel ya da mental olabilir. Tanıda, kullanıcının sağlığına olan zararın fiziksel ya da mental olduğu belirtilmelidir.</p> <p>B. Semptomlar söz konusu madde grubu için bağımlılık kriterlerini sağlamamalıdır.</p>
<p>B. Semptomlar söz konusu madde grubu için bağımlılık kriterlerini sağlamamalıdır.</p>	

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

Tekrarlayıcı madde kullanımı sonucu bireyde tolerans, yoksunluk ve kompulsif madde arama davranışı ortaya çıkabilmektedir. Sözü geçen bu üç kavramın madde bağımlılığı tanısının konmasındaki yeri oldukça önemlidir. Madde bağımlılığı tanı kriterleri ve açıklamaları Tablo 2’de verilmiştir. Kontrollü madde kullanımından ilaç bağımlılığına geçiş sürecindeki beyin yollarındaki farmakolojik ve nöroadaptif süreçlerin anlaşılması günümüz sinirbiliminin önemli amaçlarındandır.

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

	DSM-IV-TR	ICD-10
Sınıflandırma kriterleri	A. 12 aylık periyod içerisinde aşağıdakilerden üç veya daha fazlasını içeren, klinik durumda bozulmaya yol açan madde kullanım paterni.	A. Geçen yıl içerisinde aşağıdakilerden 3 tanesi yaşanmış ya da gösterilmiş olmalıdır.
Tolerans	İstenilen etkiyi ya da intoksikasyonu elde edebilmek için gittikçe daha fazla maddeye ihtiyaç duyulması; ya da aynı miktarda maddenin kullanılmasıyla gittikçe azalan etkinlik.	Tolerans kanıtı, başlangıçta düşük dozlarda sağlanan etkiyi elde edebilmek için doz yükseltmeye ihtiyaç duyulması.
Yoksunluk (çekilme sendromu)	Madde için karakteristik yoksunluk sendromu ya da yoksunluk sendromunu dindirme ya da bu sendromdan kaçınma için söz konusu maddenin veya benzer maddelerin kullanımı.	Madde kullanımının kesilmesi veya azaltılmasıyla ortaya çıkan, kullanılan maddeye özgü fizyolojik yoksunluk durumu ya da bu sendromdan kaçınma için söz konusu maddenin veya benzer maddelerin kullanımı.
Bozulmuş kontrol	Madde kullanımını bırakma isteği ya da bir veya daha fazla başarısız bırakma girişimi. Maddenin planlanandan daha fazla miktarda ya da daha uzun süre kullanımı.	Maddeye başlangıç, bitiş ve kullanım seviyesinin kontrolündeki zorluklar.
Hayat aktivitelerin ihmali	Önemli sosyal, iş ya da dinlenme aktivitelerinin madde kullanımı sebebiyle azaltılması ya da terk edilmesi.	Alternatif zevklerin veya ilgilerin gittikçe artan bir şekilde ihmali.
Harcanan zaman	Kullanılan maddeyi temin etme, kullanma ve etkisinden arınma için büyük miktarda zaman harcama.	Kullanılan maddeyi temin etme, kullanma ve etkisinden arınma için büyük miktarda zaman harcama
Sorunlara rağmen kullanıma devam edilmesi	Kalıcı ya da tekrarlayıcı fiziksel ya da psikolojik problemler oluşturduğu ya da var olan sorunları arttırdığı bilinmesine rağmen madde kullanımına devam edilmesi.	Madde kullanımının açık bir şekilde fizyolojik ya da psikolojik zararları olmasına rağmen, madde kullanımına devam edilmesi.
Kompulsif kullanım	Yok	Madde kullanımı için güçlü istek veya kompulsif duygunun varlığı.
Bağımlılık alt grubu için kriterler	Fiziksel bağımlılık: Tolerans ve yoksunluk kanıtının varlığı (A-1 ya da A-2'nin varlığı) Fiziksel bağımlılığın olmaması: Tolerans ve yoksunluk kanıtının olmaması (A-1 ve A-2'nin yokluğu).	Yok

### **2.1.2. Epidemiyoloji**

Dünya çapında 2 milyar insanın alkol, 1,3 milyar insanın tütün ürünleri ve 185 milyon insanın ise yasa dışı madde kullanıcısı olduğu tahmin edilmektedir. Bu maddelerin tüketimi ve bu maddelerin tüketimine bağlı ortaya çıkan sağlık sorunları nedeni ile gerçekleşen ölümler dünya üzerindeki tüm ölümlerin %12,4'ünü oluşturmaktadır (Dünya Sağlık Örgütü, Global Alcohol Report, 2011). Dünya Sağlık Örgütü, her 100.000 ölümden 35 tanesinin alkol ve madde bağımlılığı ile ilişkili olduğunu bildirmektedir. Alkol ve yasadışı madde kullanımının 1.000 kişilik popülasyonda maluliyet ve erken ölüm nedeniyle 13 yaşam yılı kaybına neden olduğu hesaplanmaktadır (Dünya Sağlık Örgütü, Global Alcohol Report, 2011).

Yapılan araştırmalara göre Amerikan halkının %15,6'sının hayatında en az bir kez yasadışı bir madde kullanması beklenirken, %3,1'inin madde kötüye kullanımı göstereceği, %2,9'unun ise madde bağımlısı olacağı öngörülmektedir (Grant ve diğ., 2004).

Madde bağımlılığının beraberinde getirdiği sağlık, iş gücü kaybı ve hukuksal sorunların Amerika Birleşik Devletleri'ne (A.B.D.) yıllık maliyetinin 500 milyon dolar civarında olduğu tahmin edilmektedir (Harwood, 2000), Avrupa'da bağımlı bir bireyin ülkesine yıllık maliyetinin 4.000-12.000 Amerikan doları olduğu tahmin edilmektedir (Andlin-Sobocki, 2004).

Dünya üzerindeki bağımlıların kullandıkları maddeler buldukları bölgeye göre değişkenlik gösterebilmektedir. Kişinin bulunduğu bölgede söz konusu maddeye ulaşım kolaylığının, kültürel ve dinsel faktörlerin bu duruma yol açtığı düşünülmektedir.

Bağımlılık yapıcı maddelerin bağımlılık yapıcı etkileri arasında farklılıklar bulunmaktadır. Öyle ki söz konusu maddeye bağımlı olanların, söz konusu maddeyi hayatının herhangi bir döneminde kullananlara oranı azalan sırayla: tütün > eroin > kokain > alkol > marihuana olarak saptanmıştır (Tablo 3) (Anthony ve diğ., 1994).

**Tablo 3.** A.B.D.'de 1990-1992 Yılları Arasında 15-54 Yaş Gurubunda Tahmin Edilen Madde Kullanımı ve Kullanıcılar Arasındaki Bağımlılık Oranları (Anthony ve diğ., 1994).

	Bir kez olsun madde kullanımı (%)	Bağımlılık prevelansı (%)	Kullanıcılar arasında bağımlılık oranı (%)
Tütün	75.6	24.1	31.9
Alkol	91.5	14.1	15.4
Yasadışı maddeler	51.0	7.5	14.7
Esrar	46.3	4.2	9.1
Kokain	16.2	2.7	16.7
Stimülanlar	15.3	1.7	11.2
Anksiyolitikler	12.7	1.2	9.2
Analjezikler	9.7	0.7	7.5
Halüsinojenler	10.6	0.5	4.9
Eroin	1.5	0.4	23.1
Solventler	6.8	0.3	3.7

### **2.1.3. Patofizyoloji**

Psikiyatride dürtüsel kontrol bozuklukları, dürtüsel eylem yapılmadan önce artan heyecan ve uyarılma, eylem sırasında ise memnuniyet, haz ve rahatlama ile karakterizedir. Kompulsif kontrol bozuklukları ise tam tersine tekrarlayıcı kompulsif eylem yapılmadan önce artan endişe ve stres ile karakterizedir. Eylemin gerçekleştirilmesiyle endişe ve stres yok olur. Dürtüsel kontrol bozuklukları pozitif pekiştirici etki ile yakından ilişkilidir. Kompulsif bozukluklar genellikle negatif pekiştirici mekanizmalar ve otomatisme ile ilişkilidir (First, 1994).

Madde bağımlılığı, hem dürtüsel hem de kompulsif unsurlar içeren üç aşamalı bir hastalık olarak kavramsallaştırılmıştır.

Bu basamaklar sırasıyla: kullanılan maddenin pozitif pekiştirici etkisinden kaynaklanan aşırı tüketim/entoksikasyon (*binge/intoxication*) aşaması, madde kullanımının kesilmesi ya da kullanılan miktarın azaltılması sonucu ortaya çıkan semptomlar ve disfori ile karakterize yoksunluk/olumsuz duygulanım (*withdrawal/negatif affect*) aşaması ve son olarak yoksunluk bulguları geçtikten sonra uzun süre madde kullanılmasa dahi, kronik madde kullanımının beyinde yol açtığı nöroadaptif değişikliklerden kaynaklandığı düşünülen ve bağımlılığın nüksüne

neden olan aşırı uğraşı/beklenti (*preoccupation/anticipation*) aşaması olarak sayılabilir (Koob ve Volkow, 2010).

Bağımlılık sürecinin baş kısmına dürtüsellik hâkim iken son kısımlarına kompulsivite hâkimdir. Bunun bir sonucu olarak başlangıçta pozitif pekiştirici etkinin sürmesiyle oluşan motivasyonel hareket bağımlılığın sonraki süreçlerinde negatif pekiştirici etkinin ve otomatizmanın kontrolüne girer

Ara sıra madde kullanımından, madde bağımlılığına olan dönüşüm bu üç aşamada gerçekleşen nöroplastisitenin bir sonucudur ve belki de ilk kez madde kullanımı ile başlamaktadır (Koob ve diğ., 2008).

Hayvan çalışmaları ve insan görüntüleme çalışmaları bağımlılığın bu üç aşamasında farklı sinir yollarının görev aldığını ortaya çıkarmıştır (Koob, 2004).

### **2.1.3.1. Sinir yolları**

#### **Aşırı tüketim/entoksikasyon fazı**

Beyin stimülasyon ödül merkezleri olarak adlandırılan beyinin haz duygusunun oluşmasından sorumlu olduğu düşünülen yapılar, beyinde geniş bir yer kaplasa da, en hassas bölgeler ventral tegmental alanı (VTA) *bazal forebrain*'e bağlayan *medial forebrain bundle*'dir.

*Medial forebrain bundle*'da bulunan asendan monoamin sistemi ilgiyi üstüne ilk çeken sistem olmuştur. Bu sistemde sırasıyla noradrenalin (Stein, 1962) ve dopaminin (Crow, 1973) etkinliği ortaya konmuştur. Günümüzde ise dopamin dışı diğer monoaminlerin de bu mekanizmalar içerisinde işlevi olduğu bilinmektedir (Hernandez ve diğ., 2006). Yakın zamanda yapılan bir çalışmada orta beyinden dopaminin akut salınımının psikostimülan ilaçların da etki gösterdiği ödül ve davranışın sonuçlarının önceden değerlendirilmesinde, buradaki dopamin sisteminin kalıcı aktivasyonu sonucu ortaya çıkan spesifik davranış ile ilgili sistemlerin modülasyonunda rolü olduğunu ortaya konmuştur (Schultz, 2007).

Mezokortikolimbik dopamin sisteminde nörotoksinler ile yapılan lezyon çalışmalarında kokain ve D-amfetamin gibi psikostimülan maddelerin akut pekiştirici etkileri bloke edilmiştir (McGregor ve Roberts, 1993). Öte yandan, aynı bölgede dopaminerjik nöronları selektif olarak etkileyen 6-hidroksidopamin ile yapılan lezyon çalışmalarında eroin ve alkol kendine verme davranışı bloke edilememiştir

(Koob ve Le Moal, 2006). Bu bulgular mesolimbik dopamin sisteminin aktivasyonunun psikostimülan ilaçların ödül etkisi için gerekli olmasına rağmen diğer ilaçların pekiştirici etkisi için gerekli olmadığını ortaya koymuştur (Hnasko ve diğ., 2005).

Kötüye kullanılma potansiyeli bulunan bütün maddeler dopaminerjik mesolimbik sistemi aktive etmektedir fakat noradrenalin seviyesinde de dopaminden bağımsız uyarılmaların olduğunu gösteren kanıtlar, bu beyin bölgesinde bağımlılık döngüsünün oluşmasında çoklu sistemlerin rol oynadığına işaret etmektedir (Nestler, 2005).

İnsanlarda yapılan görüntüleme çalışmalarında madde kullanımıyla beraber NAcc'yi içinde barındıran striatumda izlenen dopamin aktivasyonundaki artış ile eş zamanlı olarak denekler tarafından öfori, haz ve tatmin duyguları tanımlanmıştır (Volkow ve diğ., 2000). Amigdalanın santral nükleusunun ve bu bölgenin çıkışında bulunan ventral pallidumunda ilaçların akut pozitif pekiştirici etkisi için önemli fonksiyonları mevcuttur.

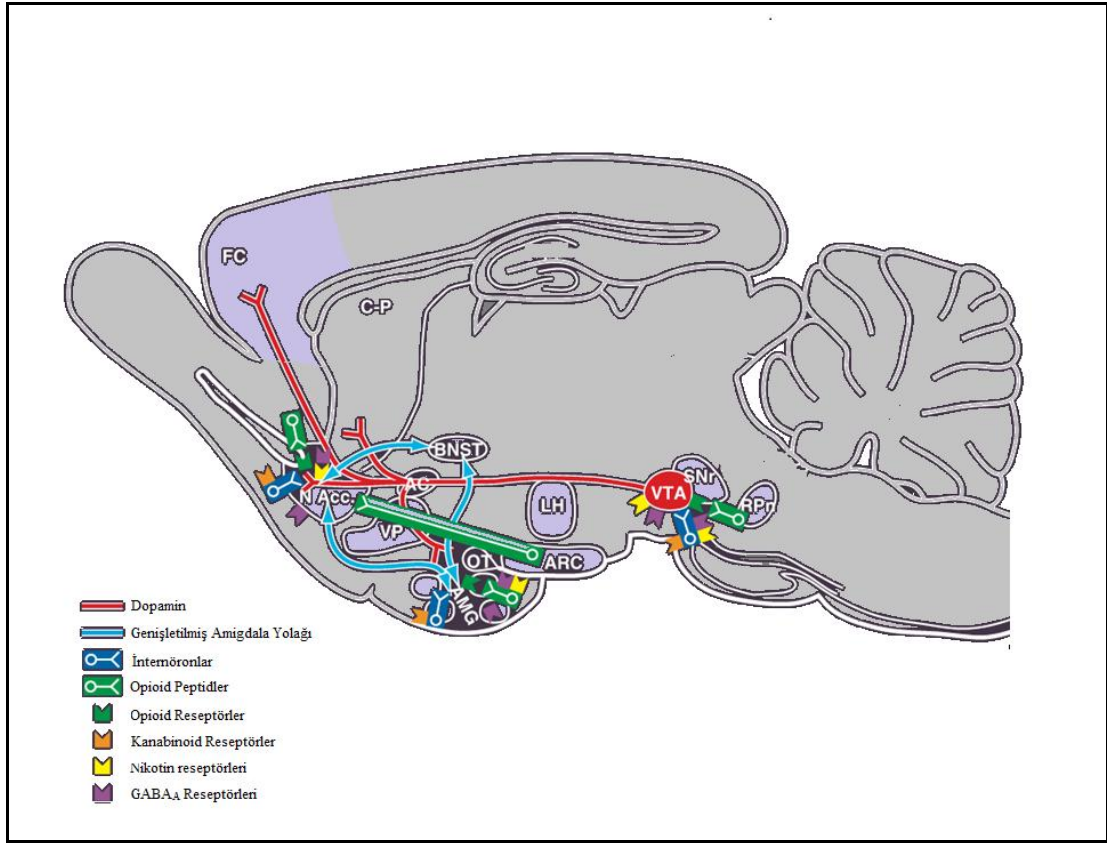
Kokain ve amfetaminler NAcc ile amigdaladaki dopamin terminallerinde direkt etki ile dopamin salınımına yol açabilmektedir (Koob ve Volkow, 2010).

Opioidler VTA, NAcc ve amigdaladaki opioid reseptörlerini direkt olarak ya da internöronlar aracılığıyla dolaylı olarak uyarırlar. Opioidler doğrudan ya da dolaylı olarak VTA üzerinde etki göstererek NAcc'den dopamin salınımına neden olurlar (Koob ve Volkow, 2010).

Alkol VTA, NAcc ve amigdaladaki gama-aminobütirik asit (GABA)-A reseptörlerini direkt olarak aktive ederek ya da dolaylı yoldan GABA salınımına yol açarak etki gösterir. Ayrıca alkolün VTA, NAcc ve amigdalanın santral nükleusunda opioid peptidlerinin salınımını arttırarak da etki gösterdiği düşünülmektedir. Alkol NAcc'den dopamin salınımını direkt olarak NAcc'den ya da dolaylı olarak VTA üzerinden gerçekleştirebilir (Koob ve Volkow, 2010).

Nikotin VTA, NAcc ve amigdaladaki nikotinik asetilkolin reseptörlerini direkt olarak ya da internöronlar aracılığıyla dolaylı olarak uyarır. Kanabinoidler VTA, NAcc ve amigdaladaki kanabinoid (CB) reseptörlerinden CB<sub>1</sub> reseptörlerini aktive ederler ve bilinmeyen bir yolla NAcc'den dopamin salınımına yol açarlar. (Koob ve Volkow, 2010).

Sonuç olarak madde kullanımına bağlı ödül etkisinde kokain, amfetamin ve nikotin için NAcc'den dopamin salınımı; opioidler için NAcc (dopaminden bağımsız) ve VTA'da (dopamin aktivasyonu ile) opioid reseptör aktivasyonu; alkol için NAcc ve amigdala GABA<sub>A</sub> reseptör aktivasyonu rol oynamaktadır. NAcc, amigdala, frontal korteks ve hipokampustan gelen önemli limbik iletilerin toplandığı stratejik bir bölgedir. NAcc'nin ekstrapiramidal motor bağlantıları sayesinde, limbik bölgelerden toplanan iletiler motivasyonel harekete dönüşebilir. İlaçların pozitif pekiştirici etkisinde NAcc en kritik rolü oynarken amigadalanın santral nükleusu ve ventral pallidumun da destekleyici rolleri mevcuttur (Şekil 1).



**Şekil 1.** Maddelerin ödül etkisi mekanizmalarında rolü olan sinir yollarının sıçan sagittal beyin kesiti üzerinde şematik gösterimi. AC, anterior komissür; ARC, arkuat nükleus; BNST, stria terminalisin bed nükleusu; C-P, kaudat putamen; FC, frontal korteks; LH, lateral hipotalamus; NAcc, nükleus akümbens; OT, olfaktör yolak; RPN, retiküler pontin nükleus; SNr, süperior kollikulus; Vp, ventral pallidum; VTA, ventral tegmental alan (Koob, (2006)'dan adapte edilmiştir).

### **Yoksunluk/olumsuz duygulanım fazı**

Genişletilmiş amigdala: amigdalanın santral nükleusu, stria terminalisin bed nükleusu ve NAcc'nin *shell* bölgesinden oluşur. Bazolateral amigdala ve hipokampus gibi limbik yapılardan afferent nöron alır ve efferentlerini ventral pallidumun medial kısmı ile lateral hipotalamusa vererek duygulardan sorumlu limbik bölge ile ekstrapiramidal motor sistem arasında ara yüz görevini üstlenir (Alheid ve diğ., 1995). Beyinin uyarılma-stres sistemlerini, haz sistemleri ile birleştirerek negatif pekiştirme mekanizmalarının oluşumunda görev alır. Genişletilmiş amigdala sisteminin korku koşullandırmasında (Nader ve diğ., 2000) ve acı sürecinin duygusal komponentinde (Neugebauer ve diğ., 2004) görev aldığı düşünülmektedir. Kronik madde kullanımına bağlı nöroadaptasyonlar sonucu sinir döngülerindeki nörotransmitter sistemlerinde fonksiyon kaybı görülmektedir. Bunun sonucu bu nörotransmitterlerin görev aldığı pozitif pekiştirici etkide de azalma ortaya çıkmaktadır. Yoksunluk fazında dopaminerjik etkinliğin bozulması durumunun, ilaç dışı uyarılara zayıf motivasyon gösterilmesi ve madde bağımlılığın duyarlılığın artmasına yol açtığı ileri sürülmüştür (Melis ve diğ., 2005). Uzamış yoksunlukta semptomlar yatıştıktan sonra insanlarda yapılan görüntüleme çalışmalarında, dopaminerjik yollarda, dopaminin D<sub>2</sub> reseptör ekspresyonunda ve dopamin salınımında azalma ile karakterize hipofonksiyon saptanmış, denekler eş zamanlı olarak anhedoni bildirmişlerdir ( Martinez ve diğ., 2005).

Hayvan çalışmalarında her türlü bağımlılık yapıcı ilacın akut yoksunluğu sırasında mesolimbik dopaminerjik sistemde ve NAcc'de serotonerjik sinir iletiminde azalmalar meydana geldiği gösterilmiştir.

Yoksunluk fazının ikinci komponenti, ilacın devamlı varlığının üstesinden gelip normal beyin fonksiyonunu restore etmek için beyin stres ve kaçınma sistemlerinin bağımlılık döngüsüne müdahalesi ile açıklanır. Kortikotropin salıverici faktör (CRF) aracılığı ile sürdürülen hipotalamo-hipofiz-adrenal eksenini ile stres/kaçınma sistemi, bağımlılık potansiyeli olan bütün maddelerin yoksunluğunda aktive olur. Artmış adrenokortikotropik hormon, kortikosteroidler ve amigdalada artmış CRF seviyeleri ile karakterizedir (Koob ve Kreek, 2007). Yoksunluk sırasında CRF'nin yanında adrenerjik olmayan yollarında katıldığı diğer stres ile alakalı sistemlerde devreye girer.

Yoksunluğun mekanizmasında yer alan diğer nörotransmitter sistemleri ise noradrenalin, P maddesi, vazopresin, nöropeptid Y, endokanabinoidler ile nosiseptin olarak sayılabilir (Koob, 2008a).

### **Aşırı uğraşı/Beklenti fazı**

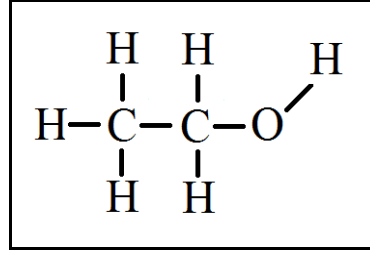
Bu faz madde bağımlılığının nüksünden sorumludur. Bu faz 2 tip hayvan modeli ile incelenebilir. Bunlardan ilki madde ile indüklenmiş ikincisi ise madde alımı sırasında koşullandırılan bir uyarı ile indüklenmiş *cravingtir* (şiddetli istek).

İlaç ile indüklenen madde bağımlılığının tekrar başlanmasında medial prefrontal korteks, NAcc ile ventral pallidumdan oluşan yapı sorumluyken (McFarland ve Kalivas, 2001), koşullandırılmış uyarının indüklemesiyle oluşan madde bağımlılığının tekrar başlanmasında bazolateral amigdala ile prefrontal korteks sorumludur (Everitt ve Wolf, 2002).

Madde bağımlılığındaki *craving* ve nüksün altında prefrontal korteksten, NAcc'nin *core* bölgesine olan glutamaterjik yollar, VTA'dan çıkan dopaminerjik projeksiyonlar ve NAcc'den ventral palliduma giden GABA projeksiyonları sorumludur (Kalivas ve O'Brien, 2008).

## **2.2. Alkol**

Alkol, kimyada fonksiyonel hidroksil grubu karbon atomuna bağlı olan organik bileşiklere verilen genel bir isimdir. Alkoller kimyasal yapılarına göre alifatik ve aromatik olmak üzere başlıca iki gruba ayrılırlar. Doymuş hidrokarbonlardan türemiş alifatik mono alkollerin genel formülü  $C_nH_{2n+1}OH$  şeklindedir. Alkoller içerisinde etanol ( $C_2H_5-OH$ ) içmeye uygun olan tek alkoldür (Şekil 2) (Kayaalp, 2005). Etanol, glukozun maya tarafından karbondioksit ve etanole dönüştürülmesiyle oluşur, glukoz ihtiva eden bütün maddelerde belli oranlarda bulunur. Alkol kullanımı ya da alkol bağımlılığı tanımlarında kast edilen alkol, etanoldür. Bu tez çalışmasında da alkol terimi etanol yerine kullanılmıştır. Alkolün ve alkol kullanımının tarihi insanlık tarihi kadar eskidir.



**Şekil 2.** Etanolün kimyasal yapısı

### **2.2.1. Alkolün farmakokinetik özellikleri**

Oral yoldan alınan alkol hızlı ve tam olarak emilir. Aç karna alındığında, alınan miktarın % 20'si mideden % 80'i ince barsaktan emilir ve normal erişkinlerde 30-60 dk içerisinde % 80-90'a yakını emilir ve bu süre içinde maksimum kan konsantrasyonuna ulaşılır. Gıdalarla beraber alınması emilimini yavaşlatır. İçkideki alkol oranı çok yüksek olursa midede pilorospazm gelişip emilimi ve biyoyararlanımı yavaşlayabilir. Küçük molekülü ve non-iyonize olmasından dolayı hücre membranını kolayca geçebilir. Vücutta bütün sıvı kompartmanlarına geçer. Plazma proteinlerine bağlanmaz. Alkol yağ dokusunda toplanmaz. Bu yüzden vücutları erkeklere göre daha yüksek oranda yağ içeren kadınlardaki sanal dağılım hacmi erkeklere göre daha düşüktür. Aynı zamanda kadınların sindirim sistemindeki alkolü metabolize eden alkol dehidrogenaz (ADH) enzim aktivitesi de erkeklere göre daha düşüktür. Bu farklılıklardan ötürü aynı miktarda alkol tüketen kadın ve erkekten, kadının kanındaki alkol miktarı daha yüksek olarak ölçülür (Kayaalp, 2005).

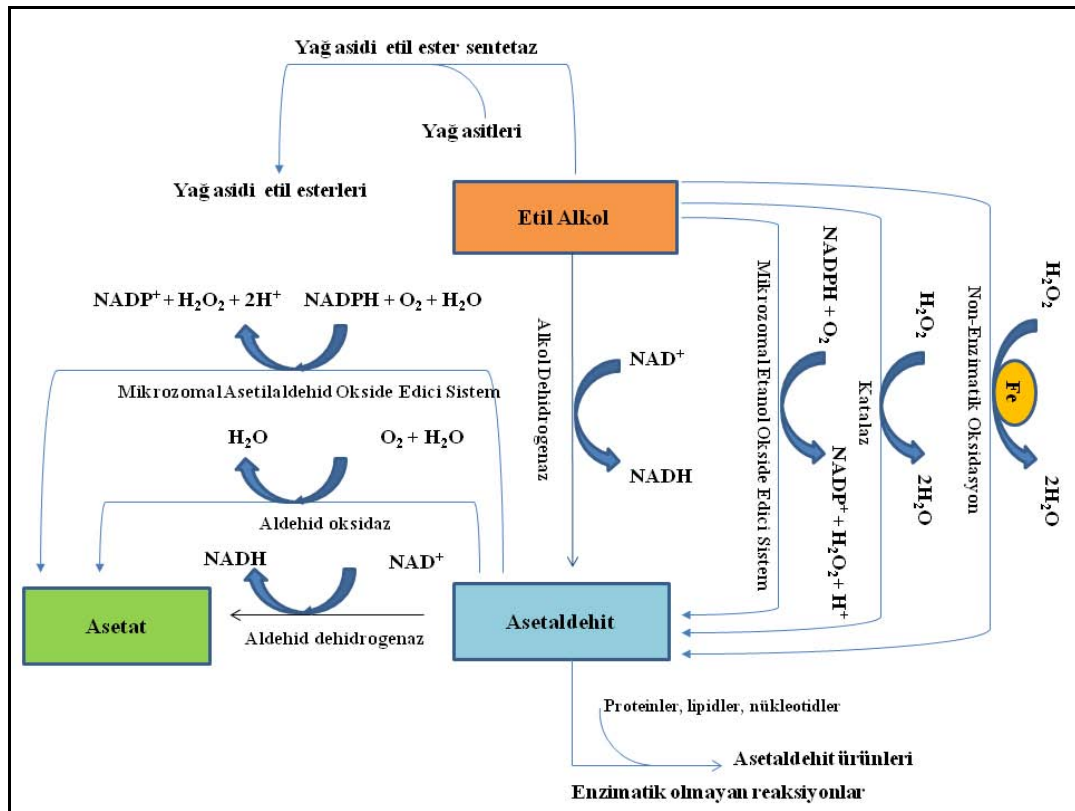
Alkolün büyük bir kısmı (%98) biyotransformasyon suretiyle itrah edilir, geri kalan kısmı akciğer, böbrek ve ter bezleri ile değişmeden atılır. Alkol önce ADH enzimi ile asetaldehide oksitlenir. Bu enzim birçok vücut dokusunda özellikle karaciğerde bulunur, reaksiyonun hız kısıtlayıcı basamağı kofaktör nikotinamid adenin dinükleotid (NAD) seviyeleridir. Asetaldehit ise asetaldehit dehidrogenaz enzimiyle asetata, asetat ise asetik asit, karbon dioksit ve suya dönüşmektedir. Genellikle Uzakdoğu halklarında ADH-2 enziminde yaygın olarak görülen bir mutasyon sonucu, kanda asetaldehit birikimine bağlı, yüzde kızarıklık, taşikardi,

hipotansiyon gibi intoksikasyon bulguları düşük doz alkol tüketiminde bile ortaya çıkabilmektedir.

Alkolün biyotransformasyonundan sorumlu majör ve alternatif yollar ile söz konusu enzimler şekil 3'te gösterilmiştir.

Alkol metabolizmasında rol oynayan 2. ana yolda bir mikrozomal enzim olan CYP2E1 yer alır. Bu yolk metabolik toleransın oluşumundan sorumlu tutulur ve karaciğer için oldukça toksik metabolitler oluşturur (Lieber, 1997). ADH enziminin alternatifi olan mikrozomal CYP2E1 enzimi kronik alkol tüketimiyle indüklenebilir. CYP2E1 enzimi kronik alkol kullanan hastaların biyopsi örneklerinde normalin 4 katı oranında artmış olarak bulunmuştur (Tsutsumi ve diğ., 1989).

Alkol metabolizmasında görev yapan 3. yolda alkol yağ asidi etil esterlerine dönüştürülmektedir ve bu biyotransformasyon non-oksidatif yağ asidi etil ester sentetaz enzimince katalizlenmektedir.



Şekil 3. Alkol metabolizmasında yer alan mekanizmalar (Brunton ve Parker, (2011)'den adapte edilmiştir)

### **2.2.2. Alkolün farmakodinamik özellikleri**

Santral sinir sistemi dışı etkileri: Alkol, solunum sistemini düşük dozda aktive eder, yüksek dozda ise baskılar, mide asit salgısını ve iştahı artırır, yüksek dozda emetik etki gösterir, antidiüretik hormonu inhibe ederek diüretik etkinlik gösterir, oksitosini inhibe ederek uterus kasılmalarını azaltır, adrenal medulladan salınan adrenalin ve noradrenalin miktarını artırır, kronik orta düzey tüketimde yüksek yoğunluklu lipoprotein, kolesterol ve trigliseritleri yükseltirken, düşük yoğunluklu lipoproteini ve kolesterolü düşürür, yüksek dozda adrenokortikotropik hormonu (ACTH) stimüle ederek steroid üretimini artırır. Prolaktin ve östrojen seviyelerini yükseltirken testosteron seviyelerini azaltır. Düşük ve yüksek dozda kalp hızını yavaşlatır, periferik damar direncini azaltır, cilt damar yatağında vazodilatasyona yol açar, hipertansiyon hastalarında günde 20 ml üzerinde tüketilmesi kan basıncını artırır (Kayaalp, 2005).

Alkol santral sinir sisteminde doza bağımlı davranış değişiklikleri oluşturur. Düşük kan alkol seviyelerinde (10-50 mg/dl) sosyal yetilerde artma, konuşkanlıkta artma, daha dışa açık kişilik, orta derecede öfori, duygudurum, özgüven ve girişkenlikte artış oluşturur. Kan alkol seviyesi 80-100 mg/dl seviyelerine ulaştığında öfori ile birlikte duygudurumda dalgalanmalar, duygusal patlamalar ile inhibisyonun kalkması gözlemlenir. 80 mg/dl kan alkol seviyesi, yargı ve motor fonksiyonda belirgin bozulmalar oluşturur. Kan alkol seviyesi 150-200 mg/dl seviyelerine ulaştığında belirgin ataksi ve motor kontrol bozukluğu, konuşmada bozulma, sendeleme, kaslarda koordinasyon bozukluğu, reaksiyon zamanında yavaşlama, vestibüler ve ağrı duyusunda azalmayla beraber hafıza, iç görüde bozulmalar meydana gelebilir. Kişi bu kan konsantrasyonunda *blackout* olarak isimlendirilen, intoksikasyon sırasında yaptıklarını hatırlayamama durumunu yaşayabilir. Kan alkol seviyeleri 300 mg/dl seviyesine ulaştığında, insanlarda bilinç hâlâ korunabilirken stupor oluşumu, dış uyaranlara yanıtta azalma ve iyice bozulmuş motor fonksiyonu ve kusma ile karakterize anestezi seviyelere ulaştığı bildirilmiştir. Alkolün 400-500 mg/dl kan seviyeleri letal doz 50 (LD50) olarak bildirilmiştir (Kayaalp, 2005).

### **2.2.3. Alkolün etki mekanizması**

Hücresele düzeyde alkolün etki mekanizmasını anlamak için yapılan çalışmalar GABA ve glutamat üzerine yoğunlaşmıştır. Nöron kültürleriyle yapılan moleküler çalışmalar alkolün GABA ile indüklenmiş klor akımlarını arttırdığını ortaya koymuştur (Mehta ve Ticku, 1988). Alkolün, glutamatın N-Metil D-Aspartat (NMDA) reseptörleri tarafından indüklenmiş hücre içine kalsiyum akışını bloke ettiği de gösterilmiştir (Hoffman ve diğ., 1989)

Alkolün GABA<sub>A</sub> reseptörleri üzerindeki etkisi özellikle amigdalanın santral nükleusunda gösterilmiştir (Roberto ve diğ., 2003) ve *knock out* hayvanlarla yapılan çalışmalar alkolün GABA<sub>A</sub> reseptörü üzerindeki bu etkisini CRF ve opioid nöronlar üzerinden gösterdiğini ileri sürmüştür (Nie ve diğ., 2004). Ayrıca alkolün GABA<sub>A</sub> reseptörü üzerindeki bu etkisinde presinaptik GABA salınımındaki artışın da rolü olabileceği bildirilmiştir. Alkol düşük dozlarda bile glutamatın N-metil-D-aspartat (NMDA) reseptörlerinin yanıtını bloke eder; benzer bir etki karnat reseptörlerinde de gösterilmiştir (Simson ve diğ., 1991). Bu etki GABA reseptörlerindeki gibi bölge spesifik değildir. Alkol glutamatın NMDA reseptörleri aracılığı ile oluşan hücre içine kalsiyum akımını bloke eder. Kronik alkol kullanımı NMDA reseptörlerinde *up-regülasyona* neden olur.

### **2.2.4. Alkol bağımlılığındaki sinir yolakları**

Alkol bağımlılığında başta, mezokortikolimbik yolda dopaminerjik etkinlik olmak üzere, GABA, opioid peptidleri, serotonin ve glutamatın da rolü oluğu bilinmektedir.

Alkol VTA, NAcc ve amigdalaadaki GABA<sub>A</sub> reseptörlerini direkt olarak aktive ederek ya da dolaylı yoldan GABA salınımına yol açarak etki gösterir. Ayrıca alkolün VTA, NAcc ve amigdalanın santral nükleusunda opioid peptidlerinin salınımını arttırarak da etki gösterdiği düşünülmektedir. Alkol NAcc'den dopamin salınımını direkt olarak ya da dolaylı olarak VTA üzerinden gerçekleştirebilir. Endojen kanabinoidler ile adenosinin, NAcc'deki dopaminerjik ve opioid peptid sistemine ait post-sinaptik elemanlarla etkileşmektedir (Koob ve Volkow, 2010).

### **2.3. Renin Anjiyotensin Sistemi**

Renin terimi tarihte ilk kez 1898 yılında Tiegerstedt ve Bergman tarafından renal korteks ekstraktının içinde buldukları maddeye verdikleri isim olarak geçmektedir. Reninin renal medulla ve idrarda bulunmadığı bildirilmiş ve bu ekstraktın tavşanlara verilmesiyle kalp hızı pek etkilenmeden pressör etki yaptığı bildirilmiştir (Basso ve Terragno, 2001).

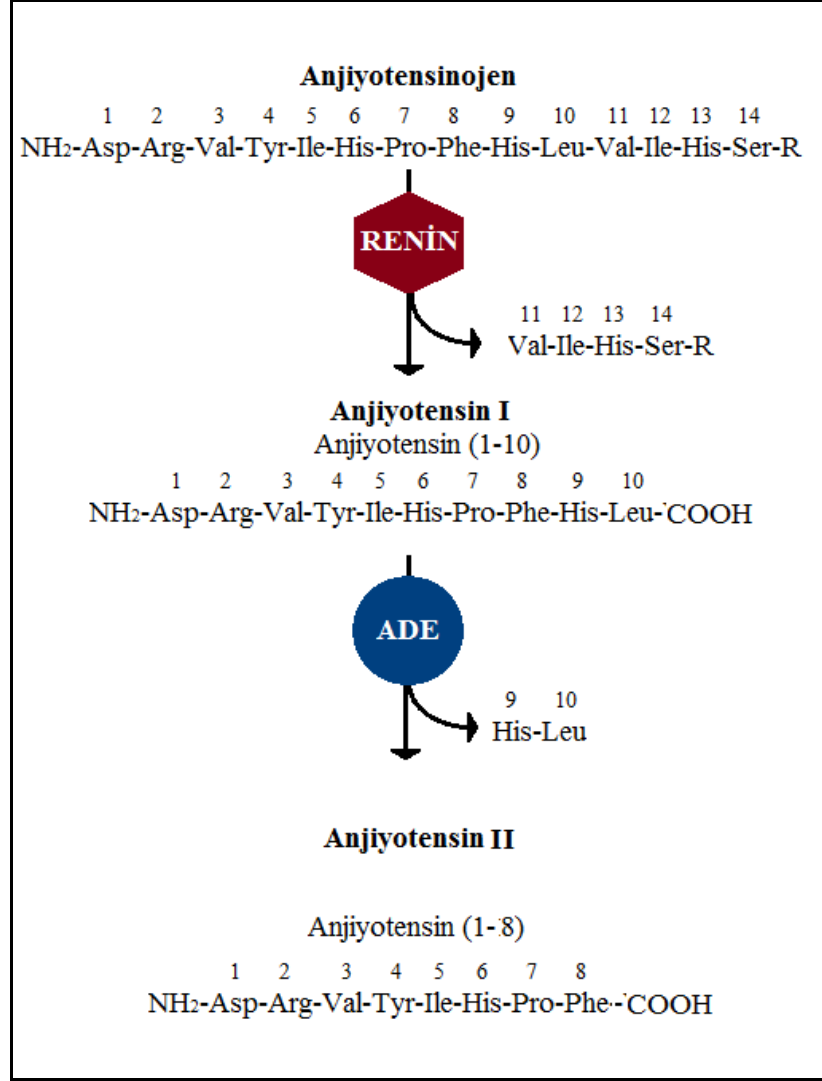
Harry Goldblatt hipertansif hastaların otopsilerinde renal arterlerinde daralma saptanması gözleminden yola çıkarak 1934 yılında köpeklerde yaptığı çalışmalarda renal arterlerin bilateral parsiyel konstriksiyonunun, renal yetmezliğe yol açmadan kalıcı hipertansiyona yol açtığını göstermiştir (Basso ve Terragno, 2001).

1940'lı yıllarda Menendez ve Page eşzamanlı olarak yaptıkları çalışmalarda, renini saflaştırmaya çalışırken, ekstrakt saflaştıkça hipertansif etkinin azaldığını fark etmişlerdir. Buradan yola çıkarak reninin kendisinin hipertansiyondan direkt olarak sorumlu olmadığını, reninin hipertansiyondan sorumlu bir plazma proteininin proteolitik enzimi olduğu sonucuna varmışlardır. Günümüzde anjiyotensin olarak bildiğimiz bu plazma proteinine sırasıyla hipertensin ve anjiyotonin isimlerini vermişlerdir. (Basso ve Terragno, 2001).

1950'li yıllarda anjiyotensinin, dekapeptid (anjiyotensin I (AngI) ve oktapeptid (anjiyotensin II (AngII) iki formu olduğu bulunmuştur. Oktapeptid formu dekapeptid formunun ADE tarafından 8. ve 9. aminoasitlerin terminalleri arasındaki bağı kesilmesiyle oluşan aktif formu olduğu keşfedilmiştir.

#### **2.3.1. Renin**

Böbrekte glomerüllerin afferent arteriollerinin duvarında bulunan jukstaklomerular hücreler tarafından inaktif prekürsör prorenin ve renin olarak salgılanır. Prorenin katepsin B, kalikrein ve plazmin gibi çeşitli proteazlar ve Hageman faktörü gibi prokalikrein aktivatörleri tarafından aktive edilir. Renin biyokimyasal olarak asid proteaz enzimidir ve plazma yarı ömrü 15 dk'dır. Böbreklerden salındıktan sonra anjiyotensinojenin 10 ve 11. amino terminalleri arasındaki bağı keserek AngI (Şekil 4) oluşumuna neden olur (Kayaalp, 2005).

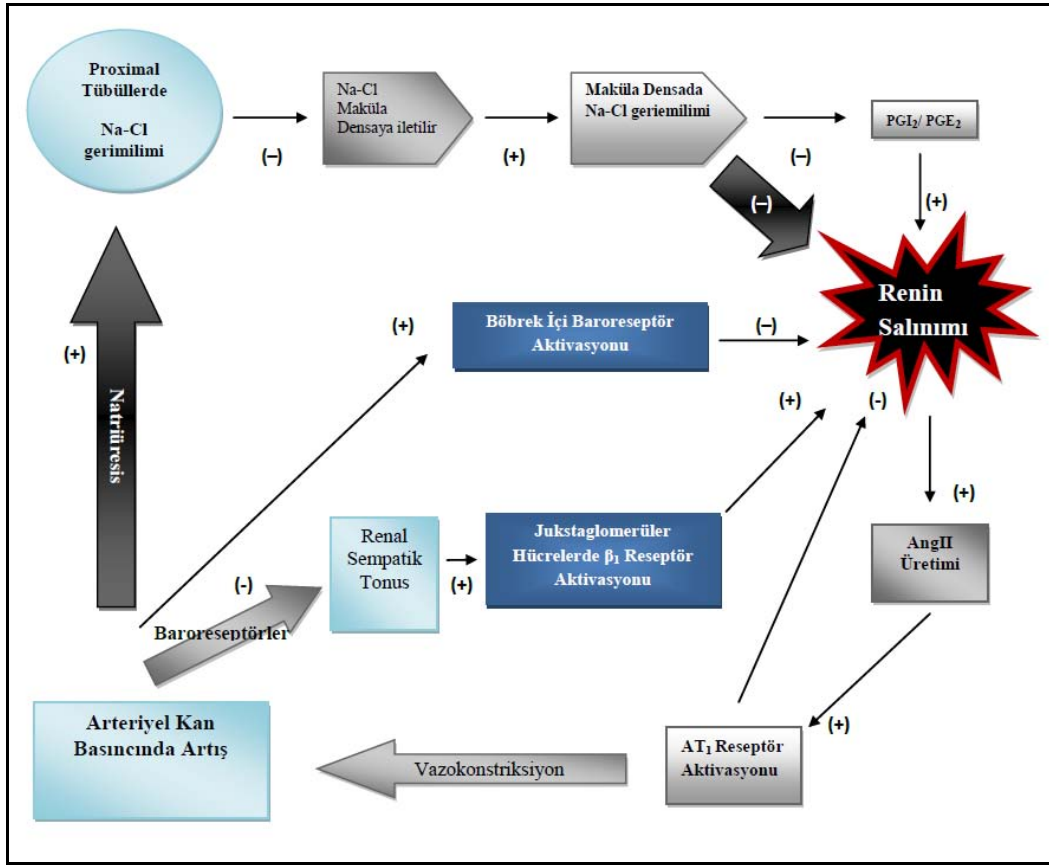


**Şekil 4.** AngI ve AngII'nin oluşumu (Brunton ve Parker ( 2011)'den adapte edilmiştir.)

Renin, AngII üretiminde ana hız belirleyici enzimdir. Vücutta renin salınmasında farklı sistemlerin rolü vardır. Reninin salgılandığı jukstaglomerüler hücrelerin yakınında bulunan özelleşmiş kolumnar epitel hücrelerinden oluşan maküla densa Na<sup>+</sup> ve Cl<sup>-</sup> gerilimindeki değişiklikleri kimyasal sinyaller ile jukstaglomerüler hücrelere bildirerek renin salınmasını kontrol eder. Na<sup>+</sup> ve Cl<sup>-</sup> düzeylerindeki azalma renin salgılanmasını stimüle eder. Bu kontrol mekanizmasında ATP, adenosin ve prostoglandinlerin rol oynadığı gösterilmiştir (Brunton ve Parker, 2011).

İkinci kontrol mekanizmasında böbrek içi baroreseptörler rol oynar. Afferent arteriol duvarındaki gerilimin artıp azalmasının renin salgılanmasını renal prostoglandinlerin salınması veya gerilimle-aktive olan iyon kanalları aracılığıyla olabileceği düşünülmektedir.

Üçüncü kontrol mekanizması adrenerjik sistem aracılığıyla olmaktadır. Postganglionik sempatik sinirlerden salınan nöradrenalinin jukstaglomerüler hücrelerden renin salınımını arttırmaktadır (Brunton ve Parker, 2011).



**Şekil 5.** Renin salınımının regülasyonunun şematik gösterimi. (Brunton ve Parker (2011)' den adapte edilmiştir).

### 2.3.2. Anjiyotensinojen

Anjiyotensinojen reninin substratıdır. Molekül ağırlığı 55.000-60.000 kDa olan serpin protein ailesinden büyük bir glikoproteindir. İnsan anjiyotensinojeni 432 aminoasitten oluşur. Primer olarak karaciğer tarafından sentezlenmekle birlikte, yağ dokusu, beynin bazı bölgeleri ve böbreklerde de önemli miktarlarda sentezlenebilir.

Salınımı inflamasyon, östrojen, insülin, glukokortikoidler, tiroid hormonları ve AngII tarafından stimüle edilir. Serpin protein ailesi ile homolog dizilimleri bulunmaktadır ve bu yüzden anti-anjiyogenez özelliği göstermektedir (Brunton ve Parker, 2011).

### **2.3.3. Anjiyotensinler**

Anjiyotensin 1 (AngI), AngII'nin %1 inden daha az potanttir ve sistemik dolaşıma salındığında ADE tarafından hızlıca AngII'ye dönüştürülür (Brunton ve Parker, 2011).

AngII RAS'ın fizyolojik etkileri en iyi bilinen temel hormonudur. AngII nin etkilerini saymak gerekirse; direnç damarlarında ve venlerde kontraksiyon, sistemik kan basıncında yükselme, böbrek efferent arteriolünde kontraksiyon, böbrek kan akımının düzenlenmesi, merkezi ve periferik sempatik sinir sisteminin uyarılması, vazopressin ve aldosteron sentezinin artması, kalp kası ve düz kas hücrelerinde hipertrofi oluşumu olarak sayılabilir.

Anjiyotensin (2-8) ya da anjiyotensin 3: Etki bakımından AngII'ye benzer, aldosteron saldıracı etkisinin AngII ile aynı iken kan basıncına olan etkisi AngII' nin %20-30 u kadar olduğu bildirilmiştir.

Anjiyotensin (3-8) ya da anjiyotensin 4: Etkileri AT<sub>1</sub> ve AT<sub>2</sub> reseptör blokerleri tarafından bloke edilememektedir. Kendine özgü AT<sub>4</sub> reseptörleri üzerinden etki göstermektedir. Algı ve hafıza üzerinde önemli etkileri olduğu düşünülmektedir.

Anjiyotensin (1-7): Farklı yollar ile AngI ve AngII'den Anjiyo tensin dönüştürücü enzim 2 (ADE2) ya da endopeptidazlar gibi farklı enzimler vasıtasıyla oluşabilmektedir. Anjiyotensin (1-7) diğer anjiyotensinlere zıt etkiler gösterebilmektedir. Vazopressin salınımı, prostoglandin sentezinin stimülasyonu, bazı kan damarlarında gevşeme, böbreklerde natriüretik göstermektedir. Kas hücrelerinde büyümeyi ve proliferasyonu inhibe edebilmektedir (Ekmekçi ve diğ., 2000).

#### **2.3.4. Anjiyotensin dönüştürücü enzim (ADE)**

Kininaz 2, dipeptidil karboksipeptidaz isimleriyle de bilinmektedir. Moleküler ağırlığı 170.000 olan bir glikoproteindir ve insanlarda ADE 1277 amino asit içerir. Herbirinde katalitik ve çinko için bağlanma bölgeleri bulunan iki homolog bölgesi bulunur.

ADE hücreler arası bölgede büyük bir amino-terminali, hücre içi bölgede kısa karboksil terminali ile kendisini hücre zarına bağlayan 17 amino asitten oluşan hidrofobik bölge içermektedir.

AngI'i 8. ve 9. aminoasidleri arasından keserek AngII oluşumunu sağlar.

ADE selektif değildir, tek karboksil grubu içeren ve sondan bir önceki aminoasidi prolin olmayan farklı dizilimlerdeki dipeptid birimlerini ayırabilir (Ekmekçi ve diğ., 2000).

#### **2.3.4.1. Anjiyotensin Dönüştürücü Enzim 2 (ADE2)**

İnsanda ADE2 805 amino asitten oluşmuştur. ADE'den farklı ve tek katalitik bölgesi bulunan bir enzimdir. ADE2 AngI'den anjiyotensin (1-9) ve AngII'den anjiyotensin (1-7) oluşumunu katalizler (Wright ve Harding, 2011).

ADE2 standart ADE inhibitörleri tarafından inhibe edilmez. Hayvanlarda düşük ADE düzeylerinin hipertansiyon ve kardiyak defektlerle ilişkili olabileceğine işaret eden yayınlar mevcuttur (Crackower ve diğ., 2002). Fizyolojik önemi tam olarak belli değildir, ADE etkilerini dengelemek için ters yönde çalışan bir mekanizması olabileceği düşünülmektedir (Lambert ve diğ., 2008).

#### **2.3.5. Anjiyotensin peptidlerinin üretiminde görev alan diğer enzimler**

ADE ve ADE2 dışında katepsin G, kimostatine-duyarlı AT<sub>2</sub>-üreten enzim ve kalp kimazı gibi farklı enzimler bu yolakta görev almaktadır (Kayaalp, 2005).

#### **2.3.6. Anjiyotensin reseptörleri**

RAS'ın AT<sub>1</sub>, AT<sub>2</sub> ve AT<sub>4</sub> olmak üzere tanımlanmış 3 adet reseptörü bulunmaktadır. AT<sub>3</sub> reseptörlerinin varlığı bildirilmiş olsada henüz doğrulanmamıştır (Wright ve Harding, 2011).

### **2.3.6.1. AT<sub>1</sub> reseptörleri**

Membranı yedi kez geçen G proteini ile eşleşmiş 359 amino asitten oluşan 41 kDa molekül ağırlığında bir reseptördür. Bu reseptörlerin aktivasyonunda ikincil ulak olarak fosfolipaz -C, fosfolipaz-A2, adenilat siklaz ve kalsiyum kanalları görev alır. Aynı zamanda hücre büyümesi ve proliferasyonunda görev alan gen ekspresyonunu regüle eden hücre içi sinyal kaskadları ile etkileşime girdiği bilinmektedir (Murphy, 1991).

Vücutta kan damarları, böbrek, böbrek üstü bezi, kalp ve karaciğerde yoğun bir şekilde eksprese edilmektedir. Vazokonstriksiyon, kalp kontraktilitesi, aldosteron salgılanması, glomerül filtrasyonu, böbrek kan akımının kontrolü, sodyum tutulumu ve kalp ve damar hipertrofisine aracılık yaptıkları bilinmektedir. Sartanlar olarak bilinen anjiyotensin reseptör blokerleri AT<sub>1</sub> reseptörlerinin spesifik blokeridir.

AT<sub>1</sub> reseptörlerinin AT<sub>1A</sub> ile AT<sub>1B</sub> olmak üzere iki izoformu saptanmıştır AT<sub>1A</sub>'nın RAS ile ilişkili klasik fonksiyonlardan sorumlu olduğu düşünülmektedir (Wright ve Harding, 2011).

### **2.3.6.2. AT<sub>2</sub> reseptörleri**

Membranı yedi kez geçen G proteini ile eşleşmiş 363 aminoasitten oluşan 40 kDa molekül ağırlığında bir reseptördür. AT<sub>1</sub> reseptörleri ile yalnızca %32-34 ortak amino asit dizilişi gösterir. AngII AT<sub>1</sub> reseptörlerine daha yüksek afinite ile bağlanırken anjiyotensin 3, AT<sub>2</sub> reseptörlerine daha yüksek afinite ile bağlanır. Fetal dokuda yaygın olarak bulunmaktayken erişkinde dağılımı daha sınırlıdır. Erişkinde böbreküstü bezi, beyin ve uterus az miktarda bulunur. AT<sub>2</sub> reseptörlerinin fonksiyonu tam olarak bilinmemekle birlikte antiproliferatif, proapoptatik, vazodilatör etkilerinin olabileceği düşünülmektedir (Jones ve diğ., 2008). Losartan ve diğer sartanlar bu reseptöre bağlanmaz. PD 123177 ve CGP 42112A bu reseptöre spesifik antagonistlerdir.

### **2.3.6.3. AT<sub>4</sub> reseptörleri**

AT<sub>4</sub> reseptörlerinin etkilerini 1025 aminoasitten oluşan insülin ile regüle edilen insülin regulated aminopeptidaz (IRAP) aracılığıyla gerçekleştirdiğine inanılmaktadır. Bu reseptörler aynı zamanda glukoz taşıyıcısı 4 (Glut4) ile beraber

lokalize olduğu saptanmıştır. Kalp, kan damarları, adrenal korteks ve bazı beyin bölgelerinde saptanmışlardır.

IRAP: Gluzinsin aminopeptidaz ailesinden tip 2 transmembran proteindir. Metenkefalin, dinorfin, oksitosin, arjinin-vazopressin, lizin bradikinin, somatostatin, gibi peptidlerin N-terminal aminoasidlerini parçalayabilmektedir. IRAP'ın AT<sub>4</sub> reseptör ligandlarını etkilerine aracılık etmesinde birçok mekanizma ileri sürülmesine rağmen bu reseptörlerin yapı ve fonksiyonları tam olarak aydınlatılamamıştır (Wright ve Harding, 2011).

### **2.3.7. Lokal renin-anjiyotensin sistemi**

Beyin, hipofiz, kan damarları, kalp, böbrek ve adrenal bez gibi birçok doku renin, anjiyotensinojen ve ADE üretimi için gereken mRNAları eksprese etmektedir. Bu dokulardan alınan hücre kültürlerinin ADE, anjiyotensinojen ve anjiyotensin 1-2-3 üretebildikleri gösterilmiştir. Bu RAS renal-hepatik kökenli sistemden bağımsız ve farklı fonksiyonları olabilen bir sistem olduğu düşünülmektedir (Paul ve diğ., 2006).

RAS'in klasik olarak, kardiyovasküler ve vücut su homeostazı üzerinde etkinlik gösterdiği bilinmekten yakın zamanda anjiyotensinojen, peptidazlar, anjiyotensinler ve spesifik reseptörlerden oluşan beyine özgü lokal RAS'in keşfiyle bu sistemin fizyolojik ve farmakolojik fonksiyonu genişlemiştir.

Beyine özgü bu RAS'ın vücut su dengesi, susama hissi, kan basıncının idamesi, vazopressin salınımı ile üreme ve cinsel davranışlar, serebral kan akımı, stres, depresyon, hafıza, alkol tüketimi, ve nöbet oluşumu üzerine etkisi olduğu ayrıca Alzheimer hastalığı, Parkinson hastalığı ve diyabet gibi hastalıkların etiolojisinde rol oynadığı düşünülmektedir (Allen ve diğ., 2000).

### **2.4. Alkol Bağımlılık Modelleri**

Hayvan modeli, insan hastalıklarının altında yatan mekanizmaların aydınlatılması ve bu hastalıklar için geliştirilen yeni tedavilerinin denenmesi için insan dışı canlı varlıklar üzerinde yapılan araştırmalardır. Bu araştırmalar sırasında deneğin genetik alt yapısı, içinde yaşadığı çevresel faktörler ve maruz kaldığı tedaviler araştırmacının kontrolündedir. Bu araştırmalarda, deneğin nörokimyasal ve nörofizyolojik gibi

çeşitli parametrelerinin incelenmesi ve bu parametrelerle deneğin davranışsal, fizyolojik ve nörolojik durumu arasındaki ilişkilerin gösterilmesi, söz konusu hastalık için yeni tedavilerin geliştirilmesini sağlamaktadır (Griffin, 2002).

Yaygın olarak kullanılan heterojen sıçan suşlarının (Wistar, Sprague-Dawley gibi) kendi istekleriyle olan alkol tüketimleri ve bunun sonucunda kandaki izlenen alkol seviyeleri oldukça düşüktür. Bu durum alkol bağımlılık Çalışmaları için geçerli bir deney hayvanı modeli oluşturulabilir mi sorusunu gündeme getirmiştir (Cicero, 1979).

Heterojen sıçan suşlarının kendi istekleriyle olan alkol tüketimlerini arttırabilmek için sıvı kısıtlaması (Sandi ve diğ.,1990), alkolün sadece belli zaman aralıklarında hayvana sunulduğu programlı tüketim yöntemi (Holloway ve diğ.,1984), alkolün tiksindirici etkisi ile baş edebilmek için alkol solüsyonuna katılan sükrozun zamanla azaltılması sonucunda tamamen kaldırıldığı sükroz azaltma yöntemi (Samson, 1986) ve başlangıçta tek sıvı kaynağı olarak alkolün sunulduğu alkol bağımlılığının zorla indüksiyonu (Deutsch ve Eisner, 1977) gibi çeşitli yöntemler geliştirilmiştir. Bu yöntemler, sıçanlarda tat tercihi ve stress oluşumu gibi deney sonuçlarını etkileyebilecek çeşitli sorunları ortaya çıkarmıştır. Bu gibi sorunların önüne geçebilmek için 1940' lardan itibaren hayvanları alkol tercihlerine göre selektif üretime alarak, alkol tercih eden ve alkolden kaçınan sıçan soyları üretilmiştir. Bu sıçan soylarının herhangi bir manipülasyona gerek duymadan alkol tüketmeleri büyük bir avantajdır. Ayrıca, bu soyların davranışsal, fizyolojik ve nörokimyasal özellikleri birbiri ile tutarlıdır (Bell ve diğ., 2012).

Yakın zamanda yayınlanan bir derlemede, geçmişten günümüze gelen süreçte alkol bağımlılık modelinin sahip olması gereken kriterler belirlenmiştir (Bell ve diğ., 2012).

Bu kriterlere göre;

- 1-Hayvan kolayca alkol tüketmelidir.
- 2-Hayvanın tükettiği alkol miktarı kan etanol konsantrasyonunu farmakolojik olarak anlamlı seviyelere ulaştırmalıdır.
- 3-Alkol tadı ya da kalorik değerinden değil de sindirim sonrası etkilerinden dolayı tüketilmelidir.

4-Alkolün pozitif pekiştirici etkileri olmalıdır, hayvan alkol için çalışmaya istek göstermelidir.

5-Kronik alkol tüketimi metabolik ve fonksiyonel toleransa yol açmalıdır.

6-Kronik alkol tüketimi bağımlılığa yol açmalı, hayvanın alkole erişimi kesildiğinde ortaya yoksunluk bulguları çıkmalıdır.

7-Kronik alkol tüketen hayvanda kısa süreli alkole erişim engellenip alkol tüketimi tekrar başladığında alkol mahrumiyet etkisi olarak bilinen alkol tüketiminde bazal seviyelerin üstünde geçici artış gözlemlenmelidir.

Alkol bağımlılığı hayvan modelinin kriterleri ile temsil ettiği insan alkol bağımlılığı kriterlerinden bazıları arasındaki ilişki Tablo 4'te verilmiştir.

#### **2.4.1. Sardinian alcohol preferring (sP) (Sardinya alkol tercih eden) sıçanlar**

sP sıçanlar İtalya'daki Sardinya bölgesinde bulunan Cagliari Üniversitesi'ndeki Wistar kolonisinden alkol tüketimi görece yüksek olan hayvanların seçilerek üretilmesi sonucu oluşturulmuş bir soydur.

sP sıçanlar günde 5 gr/kg ve üzeri seviyelerde alkol tüketebilmektedirler (Colombo ve diğ., 2006). Operant bağımlılık modellerinde alkole ulaşabilmek için istekli bir şekilde çalıştıkları gösterilmiştir (Colombo ve diğ., 2006). Serbest seçimli alkol modelinde sP sıçanların kan alkol seviyeleri 50 mg/dl üzerine ulaşabilmektedir (Colombo ve diğ., 2006). Anksiyete benzeri davranış üzerinde yapılan çalışmalar, sP sıçanların alkol tercih etmeyen sıçanlara (sNP sıçan) göre daha yüksek anksiyete seviyelerine sahip olduklarını ve yüksek alkol tüketimlerinin, alkolün anksiyolitik etkisi ile de ilişkili olabileceğini ortaya koymuştur (Roman ve Colombo, 2009).

sP sıçanların alkol klerensi sNP sıçanlarla benzerlik göstermektedir. (Quertemont ve diğ., 2000). Kronik serbest seçimli alkol tüketim modelinde sP sıçanlarda, alkolün motor yetiler üzerindeki olumsuz etkisine fonksiyonel tolerans olduğu gösterilmiştir (Colombo ve diğ., 2006). Ayrıca iki günde bir kez %20' lik alkole ulaşmaları sağlanan intermittant metotta alkol tüketimlerinin günde 10 gr/kg seviyelerine ulaştığı ve intoksikasyon belirtileri gösterdikleri gösterilmiştir (Loi ve diğ., 2010).

**Tablo 4.** Hayvan Alkol Bağımlılık Modeli ve İnsan Alkol Bağımlılık Kriterleri (Bell ve diğ., 2012)

<b>DSM-IV-TR kriterleri</b>	<b>Hayvan Modeli Kriterleri</b>
İstenilen etkiyi ya da intoksikasyonu elde edebilmek için gittikçe daha fazla maddeye ihtiyaç duyulması; ya da aynı miktarda maddenin kullanılmasıyla gittikçe azalan etkinlik.	Kronik alkol tüketimi toleransa yol açarak tüketilen alkol miktarını zamanla arttırmaktadır.
Madde için karakteristik yoksunluk sendromu ya da yoksunluk sendromunu dindirme ya da bu sendromdan kaçınma için söz konusu maddenin veya benzer maddelerin kullanımı.	Kronik alkol tüketimi sırasında alkole erişimin kesilmesi hayvanda karakteristik yoksunluk bulgularına yol açmaktadır. AME bir yoksunluk modeli olarak da kabul edilebilir.
Maddenin planlanandan daha fazla miktarda ya da daha uzun süre kullanımı.	Kronik alkol tüketimi zamanla hayvanın tükettiği alkol miktarında artışa yol açmaktadır. AME alkol tüketimindeki kontrolün kaybının bir modeli olarak da kabul edilebilir.
Kullanılan maddeyi temin etme, kullanma ve etkisinden arınma için büyük miktarda zaman harcama.	Operant sistemlerde alkol için hayvan yanıtı yüksek iş yüküne rağmen devam etmektedir.
Önemli sosyal, iş yada dinlenme aktivitelerinin madde kullanımı sebebiyle azaltılması ya da terk edilmesi.	İntoksike olmasına rağmen hayvan alkol tüketmeye ya da kendine vermeye devam etmektedir.

Bütün bu bilgiler göz önünde bulundurulduğunda sP sıçanların alkol bağımlılık model kriterlerinin birçoğunu sağladığı görülmüştür. sP sıçanların beyin biyokimyası ve fonksiyonları sNP sıçanlarla karşılaştırıldığında;

1-sP sıçanların tüm beyin serotonin (5-HT) seviyeleri daha yüksek olmasına rağmen (Bano ve diğ., 1998 ) farklı beyin bölgelerinde 5-HT yetmezliği saptanmıştır. sP sıçanlarda akut alkol uygulamasının frontal kortekste 5-HT salınımına yol açtığı gösterilmiştir (Portas ve diğ., 1994).

2-sP sıçanlarının mezolimbik dopamin sisteminin alt bölgelerinde D<sub>2</sub> reseptör dansitesinin daha az olduğu saptanmıştır (Stefanini ve diğ., 1992).

3-Medial prefrontal korteks ve NAcc bölgesindeki bazal dopamin seviyelerinin daha yüksek olduğu gösterilmiştir (Leggio ve diğ., 2003).

4-sP sıçanlarda GABA<sub>A</sub> alfa-6 reseptör alt biriminde bir mutasyon varlığı gösterilmiş (Saba ve diğ., 2001) ve limbik bölgelerde GABA<sub>B</sub> reseptör fonksiyonunun düşük olduğu saptanmıştır (Castelli ve diğ., 2005).

5-sP sıçanların kaudat putamen ve NAcc bölgelerinde opioid reseptörleri daha düşük seviyelerde bulunmuştur (Fadda ve diğ., 1999).

6-sP sıçanların serebral korteks, hipokampus ve striatumunda kanabinoid seviyeleri, CB1 reseptörleri, yine bu reseptörlerin mRNA ve reseptörle eşleşmiş G-proteinleri daha yüksek seviyelerde saptanmıştır (Vinod ve diğ., 2012).

7-sP sıçanların serum kortikosteron ve bu sıçanların amigdalasının santral nükleusunda CRH seviyeleri yüksek saptanmıştır (Richter ve diğ., 2000).

8-sP sıçanların medial ve santral amigdalasında arjinin-vazopressin gen seviyeleri yüksek saptanmıştır (Zhou ve diğ., 2011).

### **3. GEREÇ VE YÖNTEM**

Bu araştırmada uygulanan çalışma protokolü Marmara Üniversitesi Hayvan Deneylei Yerel Etik Kurulu tarafından onaylanmıştır (71.2010.MAR) (Ek-1). Deneylei Marmara Üniversitesi Deney Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde ve Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı'nda gerçekleştirilmiştir.

#### **3.1. Hayvanların Özellikleri**

Tez çalışmasında 3-5 aylık, erkek, 300-450 gram ağırlığında 23 adet Wistar ırkı sıçan ile 4 aylık 400-650 gram ağırlığında alkol tercih eden 48 adet sP sıçan kullanılmıştır. Wistar sıçanlar Marmara Üniversitesi Deney Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezi'nden, sP sıçanlar ise İtalya'nın Sardinya Ada'sında bulunan Cagliari Şehrindeki Consiglio Nazionale delle Ricerche (CNR) Sinirbilim Enstitüsü Laboratuvar'ından sağlanmıştır. Wistar sıçanlar, ışıkların sabah 06.00 da açıldığı 12 saat aydınlık-karanlık dōngüsüne uygun olan ortamda barındırılırken sP sıçanlar ışıkların gece 09.30 da açıldığı 12 saatlik ters siklus ortamında barındırılmıştır. Hayvanların barındırıldıkları ortam sabit ısı ( $21\pm 4^{\circ}\text{C}$ ) ve nem koşullarına sahip olup hayvanların deney süresince standart sıçan yemine ve şebeke suyuna ulaşımları devamlı olarak sağlanmıştır. Tüm hayvanlar deney süresince her kafeste bir hayvan barınacak şekilde tutulmuştur.

#### **3.2. İki Şişe Serbest Tercihli Alkol Bağımlılık Modeli**

Ters siklus (gece-gündüz) ortamında barındırılan sP sıçanların bu laboratuvar ortamına alışmaları için beklenen 1 hafta dinlenme ve alışma süresinin sonrasında deneylei başlanmıştır. Doğası gereği anksiyetesi yüksek olan sP sıçanlarda, ilaç uygulaması sırasında hayvanda oluşacak stresin deney sonuçlarını etkilememesi amacıyla, her gün alıştırma (*handling*) yapılmış ve ilaç verme prosedürü taklit edilmiştir. Bu prosedürde hayvanlar her gün kafeslerinden çıkarılıp bir havlu vasıtasıyla vücudu çevrelenmiş ve standart tutuş pozisyonunda tutularak sıçanın baş

kısmı icv kanül bağlantısı takılıyormuş hissi uyandırmak için okşanmış ve bir süre bu pozisyonda bekletilmiştir.

Bir haftalık alışma süresinden sonra hayvanlara içlerinde sırasıyla musluk suyu ve yine musluk suyu ile hazırlanmış % 10'luk (v/v) alkol solüsyonu bulunduran iki şişe sunulmuştur. Hayvanların gün içerisinde tükettikleri alkol ve su miktarlarını ölçebilmek için her iki şişe hayvanların kafesine konulmadan önce ve konulduktan 24 saat sonra gramın yüzde birini ölçebilen hassasiyette terazi ile tartılmıştır ve değerler kayıt edilmiştir. Her gün deneye başlamadan önce şişeler içindeki sıvı seviyeleri kontrol edilerek eksilen miktar kadar su ve alkol solüsyonu eklenmiştir. Olası yer tercihinin önüne geçilmesi için alkol ve su şişelerinin pozisyonu her gün değiştirilmiştir. Alkol bulunduran şişedeki alkol yüzdesinin buharlaşma sebebiyle azalmasını engellemek için haftalık olarak su ve alkol şişesi boşaltılarak taze solüsyonlar hazırlanmıştır. Su ve alkol şişelerinin tartımı ve yeni solüsyonların hazırlanması hayvanların aktif olduğu karanlık dönemden hemen önce gerçekleştirilerek, şişeler ışıkların kapanmasından 10 dk önce kafeslere yerleştirilmiştir. Ayrıca hayvanların günlük yem tüketimlerini ölçebilmek için hayvanlara şişelerle eş zamanlı olarak her gün 60 gr sıçan yemi verilmiş ve ertesi gün kafes üstünde kalan yem pelletleri toplanarak terazide tartılmıştır. Bu ölçümler sayesinde hayvanın 1 gün içerisinde tükettiği alkol, su ve yem miktarları hesaplanmıştır.

Alkol tüketimlerinin stabil hale gelmesi için 1 ay beklenen hayvanlara santral yoldan ilaç uygulaması yapabilmek için cerrahi bölümünde anlatıldığı gibi icv kanül takılmıştır. Cerrahi sonrası alkol, su ve yem tüketimleri takip edilmeye devam edilmiştir. Cerrahiden iki hafta sonra son 3 günlük tüketim datasına göre alkol tüketimi 6 gr/kg civarında hayvanlar seçilmiş ve alkol, su ve yem tüketimleri birbirine yakın olacak şekilde deney gruplarına ayrılmıştır.

### **3.2.1. Deney hayvanlarının gruplara ayrılması**

Deney hayvanlarının alkol, su ve yem tüketimleri birbirine eşit deney gruplarına ayrılabilmesi için öncelikle deney gününden önceki son 3 günün tüketim verileri hesaplanmış ve hayvanlar alkol tüketimlerine göre sıralanmıştır. Alkol tüketimi

düşük olan hayvanlar ekarte edilmiş ve hayvanlar en çok alkol tüketen hayvandan başlanarak deney gruplarına sırayla dağıtılmıştır.

Deneyden önceki 3. günden başlanarak hergün hayvan grupları arasında tüketimleri farklı olan hayvanlar değiştirilerek grupların alkol, yem ve su tüketimi dengelenmeye çalışılmıştır. Bu şekilde gruplar arasında yapılan hayvan değişimleri ile deneyden önceki son 3 günün her biri için tüketimleri dengeli gruplar oluşturulmuştur.

### **3.3.Deney Protokolü**

#### **3.3.1 İki şişe serbest tercihli alkol tüketim deneyleri**

Telmisartanın alkol tüketimi üzerindeki etkisinin araştırılması ve bu etkinin naloksonun etkisi ile karşılaştırılması amacı ile 3 aşamalı bir deney protokolü uygulanmıştır.

İlk aşamada (1. Deney) farklı telmisartan dozlarının (25, 50 ve 100 nmol) 24 saatlik alkol tüketimi üzerindeki etkisi araştırılmış ve en etkin telmisartan dozu belirlenmiştir. İkinci aşamada (2. Deney) seçilen telmisartan dozunun (100 nmol) 24 saat içerisinde farklı zaman aralıklarındaki etkisinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Üçüncü aşamada (3. Deney) naloksonun 30µg (75 nmol) 24 saat içerisinde farklı zaman aralıklarındaki etkisinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

Birinci deneyde yBOS (kontrol grubu) ve farklı telmisartan dozlarının (25, 50 ve 100 nmol) sP sıçanların alkol tüketimine etkisini belirlemek için her birinde 9 hayvan bulunan 4 deney grubu oluşturulmuştur. Histolojik doğrulama sonrasında yerleşim yeri yanlış olan hayvanlar deney gruplarından çıkarılmış, kontrol grubunda 6, telmisartan 25 nmol grubunda 9, telmisartan 50 nmol grubunda 7 ve telmisartan 100 nmol grubunda ise 8 hayvan kalmıştır. Çalışmanın sonuçlarının değerlendirilmesinde bu hayvanlardan elde edilen veriler kullanılmıştır.

İkinci deneyde sP sıçanların alkol tüketimi üzerinde etkisi olduğu saptanan 100 nmol telmisartan dozunun farklı zaman aralıklarındaki etkisinin değerlendirilmesi için herbirinde 7 hayvan bulunan 2 deney grubu oluşturulmuştur. Histolojik doğrulama sonrasında yerleşim yeri yanlış olan hayvanlar deney gruplarından çıkarılmış, kontrol grubunda 6, telmisartan 100 nmol grubunda ise 6

hayvan kalmıştır. İkinci deneyin sonuçlarının değerlendirilmesinde bu hayvanlardan elde edilen veriler kullanılmıştır.

Üçüncü deneyde 30 µg naloksonun sP sıçanların alkol tüketimleri üzerinde farklı zaman aralıklarındaki etkisinin değerlendirilmesi için herbirinde 7 hayvan bulunan 2 deney grubu (yBOS ve 30 µg nalokson tedavi grupları) oluşturulmuştur. Histolojik doğrulama sonrasında bütün hayvanların yerleşimlerinin doğru olduğu saptanmıştır ve deneyin sonuçlarının değerlendirilmesinde bu gruplarda yer alan tüm hayvanların verileri kullanılmıştır.

### **3.3.2 Mikrodializ deneyi**

Telmisartanın 100 nmol dozunun farklı zaman aralıklarında NAcc'den akut alkol uygulaması ile indüklenen dopamin salınımı üzerine etkisinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Bu nedenle herbirinde 7 hayvan bulunan 2 deney grubu (yBOS ve telmisartan 100 nmol) oluşturulmak istenmiştir. Mikrodializ örneklerinin toplanması sırasında yaşanan problemler ve histolojik doğrulama sonrasında yerleşim yeri yanlış olan hayvanların kaybıyla kontrol grubunda 5, telmisartan 100 nmol grubunda ise 4 hayvandan elde edilen veriler çalışmaya dahil edilmiştir.

### **3.4. Maddeler ve Enjeksiyonlar**

Telmisartan (T8949) ve pozitif kontrol olarak kullanılan nalokson hidroklorür dihidrat (N7758) Sigma'dan temin edilmiştir. Telmisartan yüksek bazik 0,25 N NaOH çözeltisi içerisinde çözülerek yapay beyin omurilik sıvısı (yBOS) [2.5 mM KCl, 125 mM NaCl, 1.26 mM CaCl<sub>2</sub>(2H<sub>2</sub>O), 1.18 mM MgCl<sub>2</sub>(6H<sub>2</sub>O) ve 0.2 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>(2H<sub>2</sub>O); pH: 7,0] ile seyreltilmiş, pH'sı 1 N HCl çözeltisi eklenerek fizyolojik pH seviyelerine getirilmiştir ve daha sonra yBOS kullanılarak daha düşük konsantrasyonlara seyreltilmiştir. Nalokson hidroklorür yBOS içinde çözülmüş ve yine bu sıvı ile enjeksiyon konsantrasyonuna seyreltilmiştir.

Icv enjeksiyonlar kılavuz kanüllerin içerisine deney günü yerleştirilen internal enjeksiyon kanülleri ile yapılmıştır. 5 µl lik Hamilton enjektörü polietilen tüp ile internal kanüle bağlanmış ve 2 µl hacimde yBOs ya da farklı konsantrasyonlardaki telmisartan solüsyonu yavaş olarak 1 dk içerisinde enjekte edilmiştir. Verilen maddenin geri kaçmasını engellemek için internal kanüller 1 dk daha kılavuz kanül

içerisinde bırakılmıştır. Enjeksiyonlar ışıkların kapanmasından 45 dk önce başlanmış ve 10 dk kala bitirilmiştir. Işıkların kapanmasına 10 dk kala alkol ve su şişeleri ile daha önceden hazırlanmış 60 gr lık yemler hayvanlara sunulmuştur. Hayvanların alkol, su ve yem tüketimleri karanlık periyodun 60., 120., 240., 480. ve 1440. dk'larında ölçülerek kaydedilmiştir. Bu ölçümler karanlık fazda hayvanları etkilemeyen kırmızı ışık altında gerçekleştirilmiştir. Deneyler arasında 1 haftalık temizleme süresi bırakılarak farklı telmisartan dozları (25, 50 ve 100 nmol) ve pozitif kontrol nalokson (30 µg) toplamda 4 ayrı deneyde araştırılmıştır.

### **3.5. Stereotaksik Cerrahi Yöntemi**

Stereotaksik cerrahi yöntemi kullanılarak, Wistar ve sP sıçanlara kontrol yBOS ve telmisartan tedavi solüsyonlarını uygulamak amacıyla icv kanül takılmıştır. Wistar sıçanlara ayrıca NAcc'deki dopamin konsantrasyonunu belirlemek amacıyla eş zamanlı mikrodializ probu takılmıştır.

Hayvanlar ketamin (100 mg/kg, ip) ve ksilazin (10 mg/kg, ip) anestezisi altında stereotaksik cerrahi aletine (Stoelting, model 51600, A.B.D) yerleştirilmiştir. Kafa derileri orta hattın bir insizyonla açılıp periost mekanik olarak kaldırılmış, yapısal destek sağlamak amacıyla iki adet sabitleme vidası frontal ve pariyetal kemiklere takılmıştır. Bregma referans alınarak sıçan beyin atlasından (Paxinos ve Watsons, 2006) alınan koordinatlara göre Wistar sıçanların sol lateral ventrikülüne, sP sıçanların ise sağ lateral ventrikülüne kılavuz kanül yerleştirilmiştir (koordinatlar: anteroposterior: -1,0 mm, lateral: 1,7 mm ve ventral: 3,5 mm). Wistar sıçanlarda kılavuz kanül takılıp dental akrilik ile sıçan kafatasının sol tarafına bregma noktasını açıkta bırakacak bir şekilde sabitlendikten sonra sağ NAcc'ye mikrodializ probu yerleştirilmiştir. Icv kanül ile arada mesafe kalması için probunun ucuna mediale doğru 8 derece açı verilmiştir ( koordinatlar: anteroposterior: 1,7 mm, lateral: 2 mm ve ventral: 7,5 mm). Kafaya yerleştirilen kılavuz kanül, mikrodializ probu ve yapısal destek sağlamak amacıyla takılan sabitleme vidaları soğuk dental akrilik ile kafatasına sabitlenmiştir. Kılavuz kanülün tıkanmasını önlemek için muhafaza (*dummy*) takılmıştır.

### **3.6. Mikrodiyaliz Probonun Hazırlanması**

Konsantrik mikrodiyaliz probları 15 mm boyundaki 24 G paslanmaz çelik borulardan yapılmıştır. Giriş ve çıkış tüpleri için kaynaşmış silika (dış boyut:0,17 mm; iç boyut 0,11 mm SGE) kullanılmış ve bu silika tüpler polietilen hortumlara bağlanmıştır. Giriş tüpü mikrodiyaliz probunun ucundan 2 mm dışarda kalacak şekilde ayarlanmış ve diyaliz membranı (Gambro Ltd.) giriş silika tüpün üzerinden geçirilmiştir. Membranın geçirilmesinden sonra bütün bağlantılar epoksi reçine ile kapatılmıştır.

### **3.7. Mikrodiyaliz Örneklerinin Toplanması**

Cerrahiden 24 saat sonra hayvanlar pleksiglas kafeslere (42 × 42 × 20 cm) alınarak mikrodiyaliz problemlerinin giriş kısımları polietilen hortumlar vasıtasıyla infüzyon pompasına (KD Scientific Model 120, A.B.D.) bağlanmıştır. Buzdolabında (+4 °C) muhafaza edilen yBOS'un hayvana vermeye başlanmadan önce oda ısısına gelmesi beklenmiştir. Mikro enjeksiyon pompasının hızı 0,5 µl/dk enjeksiyon yapacak şekilde ayarlanmıştır. İlk 2 saat dengelenme süresi olarak kabul edilmiş ve bu sırada örnek toplanmamıştır. Telmisartan ve kontrol (yBOS) enjeksiyonları, ip alkol enjeksiyonundan 15 dk önce yapılmıştır. Örnekler 20 dk'lık aralıklarla toplanmış ve analiz gününe kadar -80 °C de muhafaza edilmiştir.

### **3.8. Dopamin Analizi İçin Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografi (HPLC) Metodu**

HPLC sistemi bir gradyen pompa (Jasco Pu-980), manuel enjeksiyon valfi (Rheodyne 7725i, 20 µl loop), C18 kolonu (ACE marka 15 cm uzunluğunda, 4,6 µm çap ve 5 µm por büyüklüğü), elektrokimyasal dedektör (GBC LC 1260) ve bir bilgisayardan oluşmaktadır. Sistemde ortaya çıkan pikler Borwin bilgisayar programı yardımı ile değerlendirilmiştir.

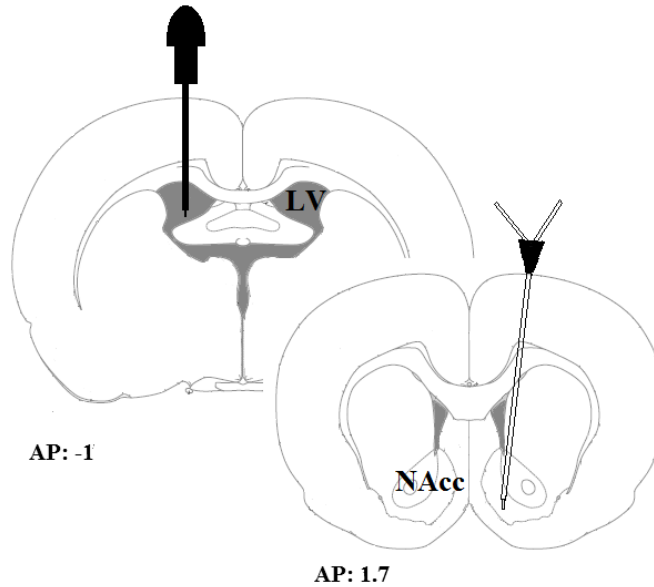
Mobil faz %6 asetonitril, 75 mmol/l sodyum fosfat, 50 mmol/l EDTA, 1 mmol/l oktisodyumsülfat ve %0,1 tetrahidrofuran içerecek şekilde hazırlanarak ve pH 4 olacak şekilde ayarlanmıştır. Mobil faz hazırlanırken kullanılan su HPLC kalitesinde deiyonize su (% 0,5 THF,v/v) olup 0,4 µm naylon membran filtre (Sigma) ile süzülerek, ultrasonik banyoda 15 dk degaze edilmiştir.

Elektrokimyasal dedektörün çalışma potansiyeli 650 mV, range 10  $\mu$ A olarak ayarlanarak mobil faz kolondan 0,9 ml/dk hızında akıtılmıştır. Örnekler sisteme 10  $\mu$ l hacminde, Hamilton enjektörü vasıtasıyla enjekte edilmiştir.

Örneklerin analizine başlanmadan önce kolonun dengelenmesi ve elektrokimyasal dedektörün optimal çalışma ısısına ulaşması için 30 dk beklenmiştir. Dopamin düzeyleri standartlardan elde edilen zirvelerden göreceli olarak hesaplanmıştır. Standartların hazırlanmasında kullanılan dopamin hidroklorür (H8502) Sigma'dan satın alınmış ve yBOS içinde çözülmüştür.

### 3.9. Histolojik Doğrulama

Deney bitiminde mikrodializ problelerinin istenilen beyin bölgesine ulaşip ulaşmadığını doğrulamak amacı ile hayvanlar yüksek doz anestezi altında dekapite edilerek ve beyinleri çıkartılmıştır. Çıkarılan beyinler formalin sukroz karışımında 48 saat beklettikten sonra, kriyostatla 40  $\mu$ m kalınlığında kesitler alınmış ve tiyonin ile boyanmıştır. Çalışmaya kanül ve mikrodializ problemleri doğru yerleşim bölgesinde olan hayvanlar dâhil edilmiştir (Şekil 6).



**Şekil 6.** Kanül ve mikrodializ probunun yerleşimi LV: lateral ventrikül, NAcc: nükleus akübens (Paxinos ve Watson (2007)'den adapte edilmiştir).

### 3.10. Verilerin Analizi

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

Farklı telmisartan dozlarının alkol tüketimi üzerine etkisinin araştırıldığı ilk deneyde grupların dağılımları Kolmogorov-Smirnov testi değerlendirilmiştir. Kontrol grubunun parametrik test için gerekli normal dağılıma uymaması üzerine alkol tüketimindeki değişim non-parametrik Kruskal-Wallis ve post hoc Dunn's testi ile değerlendirilmiştir.

Telmisartan ve naloksonun alkol tüketimi üzerine etkisinin araştırıldığı 2. ve 3. deney sonuçları Kolmogorov-Smirnov testi değerlendirilmiş ve normal dağılım gösteren deney grupları Student's t testi ile karşılaştırılmıştır.

Mikrodiyaliz deneylerinde telmisartan ve kontrol gruplarındaki hayvanların belirli zaman aralıklarındaki dopamin konsantrasyonlarındaki değişimler tekrarlı ölçümlerin iki yönlü varyans analizi (two-way repeated measures ANOVA) testi ile değerlendirilmiştir.

## **4. BULGULAR**

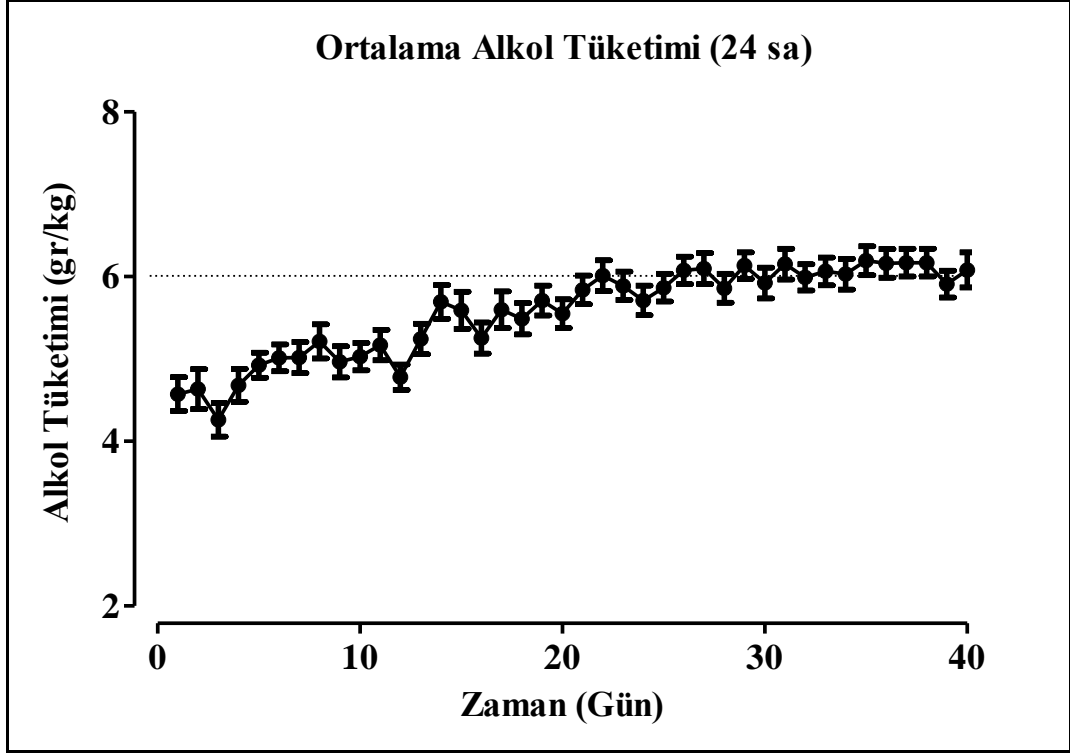
### **4.1. Alkol Tüketim Deneyleri**

#### **4.1.1. İki şişe serbest tercihli alkol tüketim deneyi**

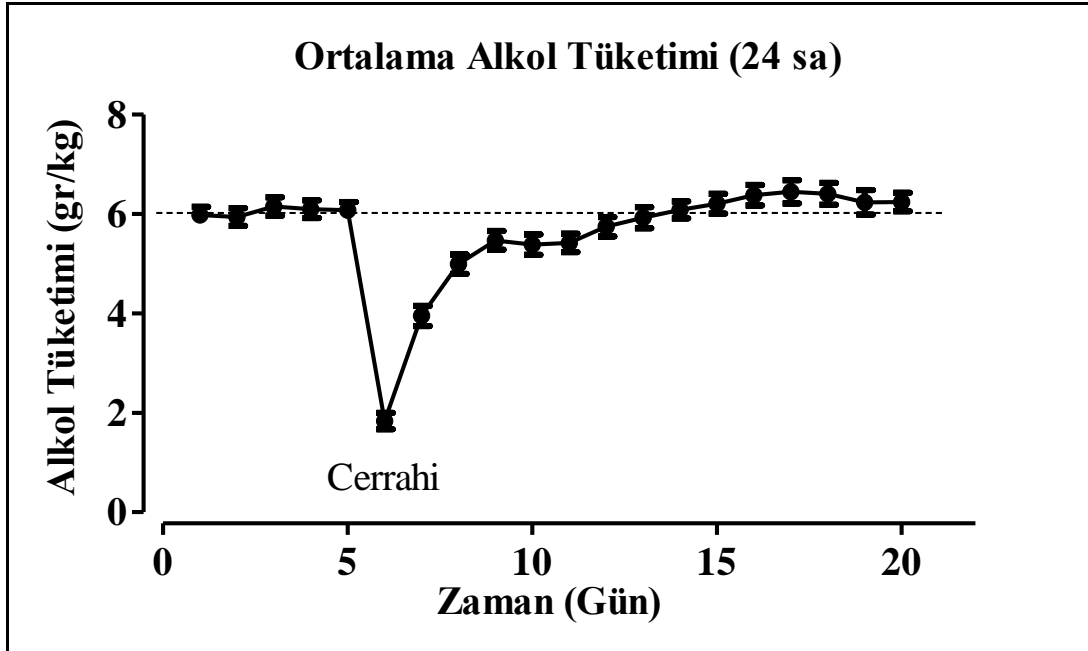
Telmisartanın sP sıçanların alkol tüketimleri üzerine etkisinin incelenmesinden önce hayvanların alkol tüketimleri stabil hale gelene kadar beklenmiştir. Bu süreçte hayvanların ortalama alkol tüketimi giderek yükselmiş ve ortalama olarak 30. gün 6 gr/kg seviyesine ulaşarak stabil bir şekilde devam etmiştir (Şekil 7). Bu süreçte 48 hayvandan 47'si alkol tüketim kriteri olarak kabul edilen 4 gr/kg seviyesinin üstüne çıkmıştır. Deneyler tamamlandıktan sonra düşük ve yüksek alkol tüketimi gösteren 4 hayvandan karanlık periyodun 2. saatinde kan örneği alınmış ve kan alkol düzeyleri gaz kromatografi kütle spektrometresi ile analiz edilmiştir

#### **4.1.2. Stereotaksik cerrahinin sP sıçanların alkol tüketimi üzerine etkisi**

Anestezi altında stereotaksik cerrahi yapılan hayvanların alkol tüketimleri cerrahi sonrası 3. günden itibaren hızlıca toparlayıp 5 gr/kg seviyelere ulaşmıştır. Hayvanların tüketimleri cerrahi sonrası 7. günden itibaren bazal seviyeler ulaşmış ve deneyin geri kalanında stabil ve 6 gr/kg seviyelerinde kalmıştır (Şekil 8).



Şekil 7. İki şişe seçimli alkol tüketim deneyinin ilk 40 gününde sP sıçanların 24 saatlik ortalama alkol tüketimleri.



Şekil 8. sP sıçanların stereotaksik cerrahi öncesi ve sonrası 24 saatlik ortalama alkol tüketimleri

Yüksek alkol tercih eden hayvanlarla yapılan çalışmaların büyük bir kısmında madde uygulama yolu olarak ip enjeksiyon, cilt altına enjeksiyon ve oral gavaj gibi majör cerrahi gerektirmeyen yollar kullanılmaktadır. Bu çalışmada ise telmisartanın santral etkisinin gösterilebilmesi amacı ile icv yoldan uygulanabilmesi için stereotaksik cerrahi yöntemi kullanılmıştır. Bölümümüzde gerçekleştirdiğimiz farklı alanlardaki stereotaksik cerrahinin kullanıldığı çalışmalarda hayvanlara tanınan bir haftalık iyileşme süreci sP sıçanların alkol tüketimlerinin cerrahi öncesi düzeye dönmesi için yeterli olmuştur. Bu dönemde bazı hayvanların alkol tüketiminin belirli bir zaman aralığı için cerrahi öncesi dönemin üzerine çıktığı gözlemlenmiştir. Bu etki hayvanların ortalama tüketiminde belirgin bir artışa neden olmamıştır. Bu bulgu alkol mahrumiyet etkisi olarak bilinen yüksek alkol tercih eden sıçanların kısa bir süre için alkolden mahrum bırakılması ve tekrar alkole ulaşmalarının sağlanmasıyla gözlemlenen alkol tüketimindeki artışa bağlanabilir (Agabio ve diğ., 2000). Bu artış ayrıca cerrahi sonrası sıçanların alkolü antinosiseptif etkisi (Campbell ve diğ., 2006) için kullandıklarının bir göstergesi de olabilir.

#### **4.1.3. Telmisartanın santral uygulamasının sP sıçanların alkol tüketimine etkisi**

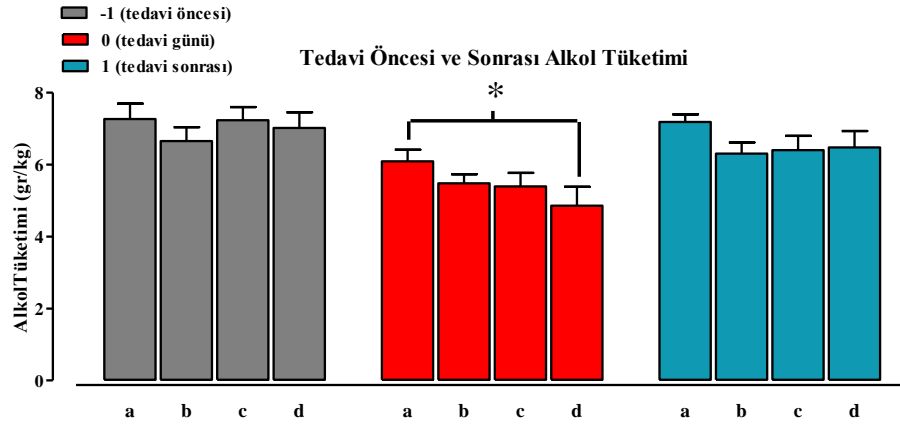
##### **4.1.3.1. Farklı telmisartan dozlarının santral uygulanmasının sP sıçanların 24 saatlik alkol tüketimi üzerine etkisi**

Telmisartanın sP sıçanlarının alkol tüketimine etkisini değerlendirebilmek için hayvanlar tedavi öncesi son 3 günün verileri göz önüne alınarak, alkol su ve yem tüketimleri gruplar arası fark en az olacak şekilde deney gruplarına ayrılmıştır. Tedaviden önceki ve sonrasındaki gün deney gruplarının 24 saatlik alkol, yem ve su tüketimleri arasında anlamlı bir farklılık saptanmamıştır ( $p>0,05$ ) (Şekil 9).

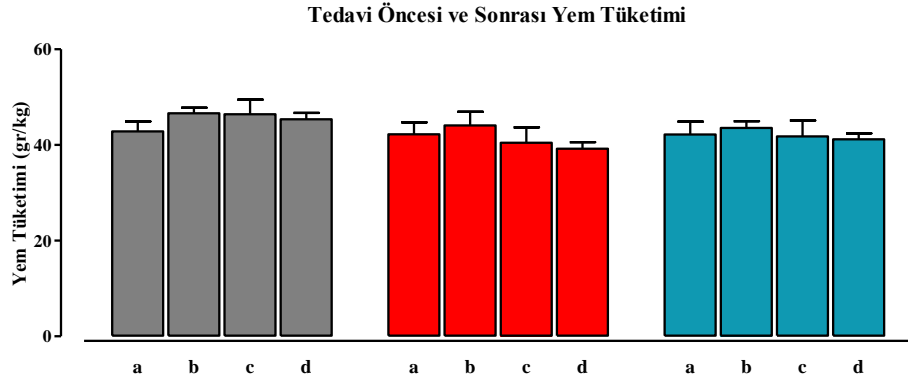
Telmisartanın farklı dozlarının (25, 50, 100 nmol) ve kontrol grubunun akut icv uygulamasından sonra deney gruplarının 24 saatlik ortalama alkol tüketimi kontrol (yBOS) grubu (n=6) için  $6,10\pm 0,32$  gr/kg, telmisartan 25 nmol grubu için (n=9) için  $5,48\pm 0,25$  gr/kg, telmisartan 50 nmol grubu için (n=7) için  $5,39\pm 0,37$  gr/kg ve telmisartan 100 nmol (n=8) grubu için  $4,86\pm 0,52$  gr/kg olarak saptanmıştır. Tedavi günü alkol tüketimleri kontrol yBOS ile 100 nmol telmisartan grupları

arasında istatistiksel olarak anlamlı fark göstermiştir (Kruskal Wallis post hoc Dunn's,  $p < 0,05$ ). Diğer telmisartan dozlarında (25 nmol ve 50 nmol) görülen azalma istatistiksel anlamlılık göstermemiştir. Deney grupları arasında 24 saatlik ortalama yem ve su tüketimleri açısından istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır. Telmisartanın farklı dozlarının 24 saatlik alkol tüketimine etkisinin test edildiği bu deneyin sonucunda en etkili telmisartan dozu 100 nmol olarak belirlenmiş ve sonraki deneylerde bu doz pozitif kontrol nalokson ile karşılaştırılarak kullanılmıştır.

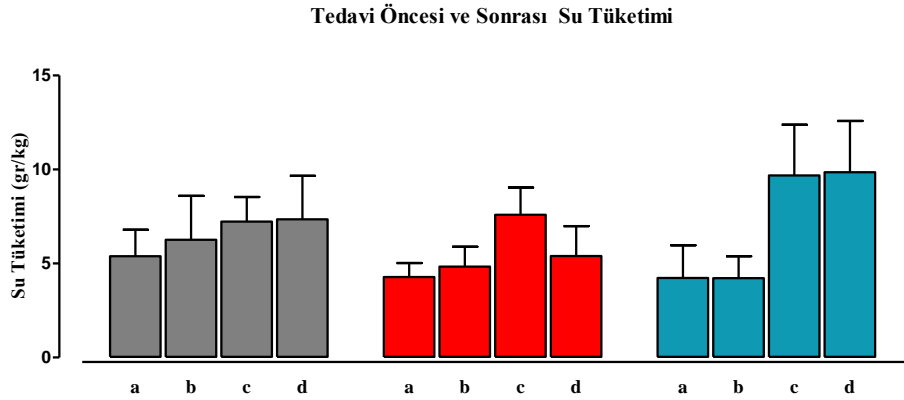
A



B



C



**Şekil 9.** sP sıçanların tedaviden bir gün önce, tedavi günü ve tedaviden bir gün sonraki 24 saatlik ortalama A) alkol, B) yem, C) su tüketimleri. Tedavi günü; a grubuna kontrol (yBos) (n=6), b grubuna telmisartan 25 nmol (n=9), c grubuna telmisartan 50 nmol (n=7) ve d grubuna telmisartan 100 nmol (n=8) icv enjeksiyonları gerçekleştirilmiştir.  $p < 0,05^*$ .

#### 4.1.3.2. icv telmisartan tedavisinin sP sıçanların farklı zaman aralıklarında alkol tüketimine etkisi

Telmisartanın sP sıçanlarının alkol tüketimine etkisini değerlendirebilmek için hayvanlar alkol, su ve yem tüketimleri birbirine yakın olacak şekilde kontrol yBOS (n=6) ve tedavi 100 nmol telmisartan (n=6) deney gruplarına ayrılmıştır. Tedavi öncesi tedavi günü ve tedavi sonrası gün deney grupları Student's t testi ile analiz edilmiş ve anlamlı farklılık 24 saatlik her üç tüketim parametresi için yalnızca tedavi günü ortalama alkol tüketiminde saptanmıştır (Şekil 9). Tedaviden bir gün önce alkol tüketiminde gruplar arasında bir farklılık görülmemesi ve tedavi sonrası günde telmisartanın alkol tüketimini baskılayıcı etkisinin geri dönmesi deney gruplarının dengeli oluşturulduğu ve telmisartanın etkisinin geri dönüşlü olduğunu göstermektedir.

Kontrol yBOS grubunun 24 saatlik ortalama alkol tüketimi  $6,10 \pm 0,80$  gr/kg olarak saptanırken, telmisartan 100 nmol tedavi grubunda ortalama alkol tüketimi  $5,11 \pm 0,31$  gr/kg olarak saptanmış ve alkol tüketimi kontrol gurubuyla karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde baskılanmıştır (Student's t testi,  $p < 0,05$ ). Kontrol grubunun ortalama yem tüketimi  $47,87 \pm 2,46$  gr/kg, tedavi grubunun ise  $44,35 \pm 3,32$  gr/kg olarak saptanmıştır. Kontrol grubunun ortalama su tüketimi  $8,65 \pm 1,55$  gr/kg, tedavi grubunun ise  $7,82 \pm 2,69$  gr/kg olarak saptanmıştır. Kontrol gurubuyla tedavi grubunun 24 saatlik yem ve su tüketimleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır (Şekil 10).

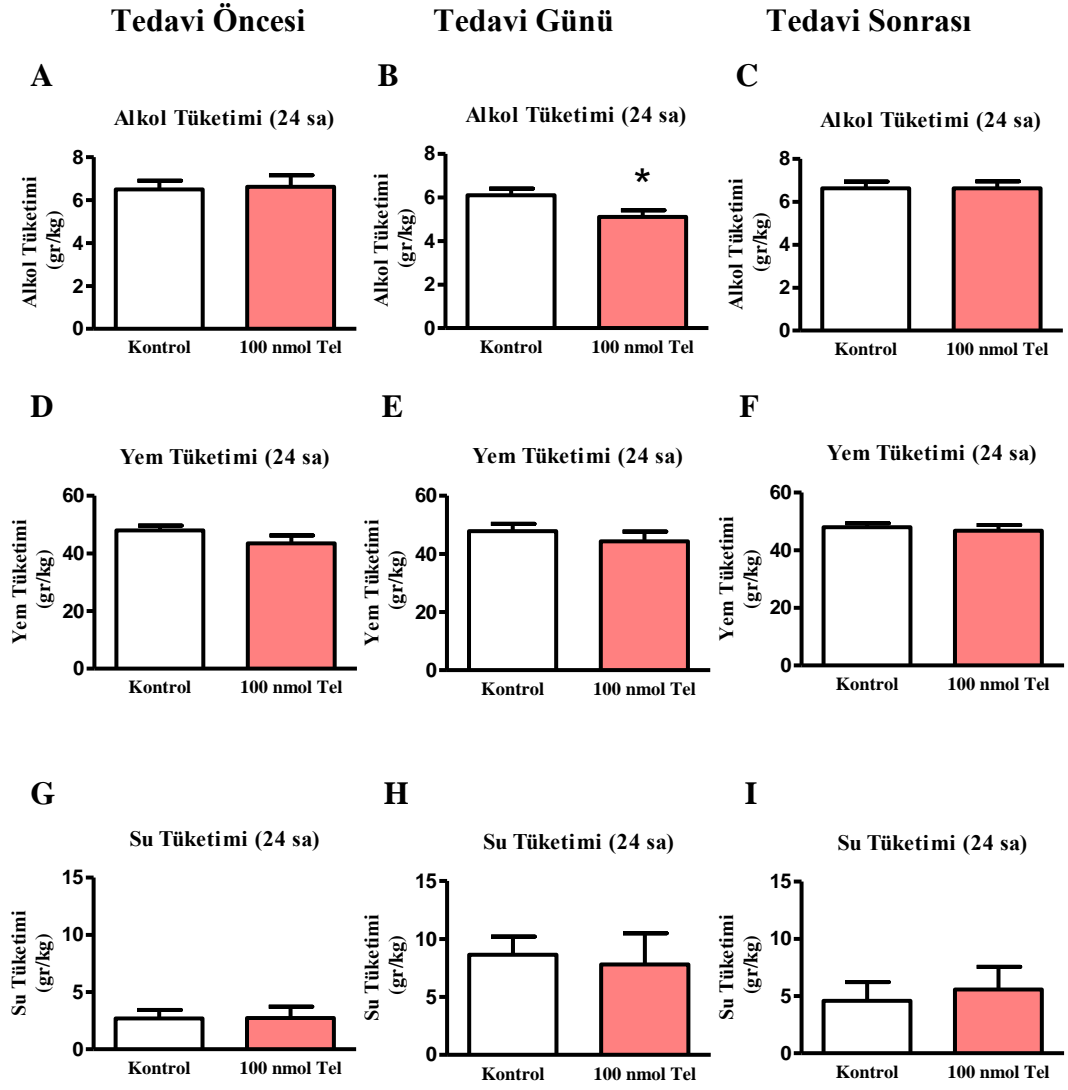
Kontrol yBOS grubunun icv enjeksiyondan sonra karanlık periyodun 60. dk'sında ortalama alkol tüketimi  $0,80 \pm 0,04$  gr/kg olarak saptanırken, telmisartan 100 nmol tedavi grubunda ortalama alkol tüketimi  $0,69 \pm 0,04$  gr/kg olarak saptanmıştır. Telmisartan grubunda gözlenen alkol tüketimindeki azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Kontrol grubunun ortalama yem tüketimi  $3,32 \pm 1,26$  gr/kg, tedavi gurubunun ise  $5,95 \pm 0,87$  gr/kg olarak saptanmıştır. Kontrol grubunun ortalama su tüketimi  $2,55 \pm 0,40$  gr/kg, tedavi gurubunun ise  $2,05 \pm 0,75$  gr/kg olarak saptanmıştır. Kontrol grubuyla tedavi grubunun 60 dk'lık yem ve su tüketimleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır (Student's t testi,  $p > 0,05$ ) (Şekil 11).

Kontrol yBOS grubunun icv enjeksiyondan sonra karanlık periyodun 120. dk'sında ortalama alkol tüketimi  $1,26 \pm 0,08$  gr/kg olarak saptanırken, telmisartan 100 nmol tedavi grubunda ortalama alkol tüketimi  $0,87 \pm 0,08$  gr/kg olarak saptanmış ve kontrol grubuyla karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde baskılanmıştır (Student's t testi,  $p < 0,01$ ). Kontrol grubunun ortalama yem tüketimi  $6,58 \pm 1,91$  gr/kg, tedavi grubunun ise  $6,98 \pm 1,33$  gr/kg olarak saptanmıştır. Kontrol grubunun ortalama su tüketimi  $3,30 \pm 0,46$  gr/kg, tedavi grubunun ise  $2,95 \pm 0,89$  gr/kg olarak saptanmıştır. Kontrol gurubuyla tedavi grubunun 120 dk'lık tüketimleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır (Şekil 11).

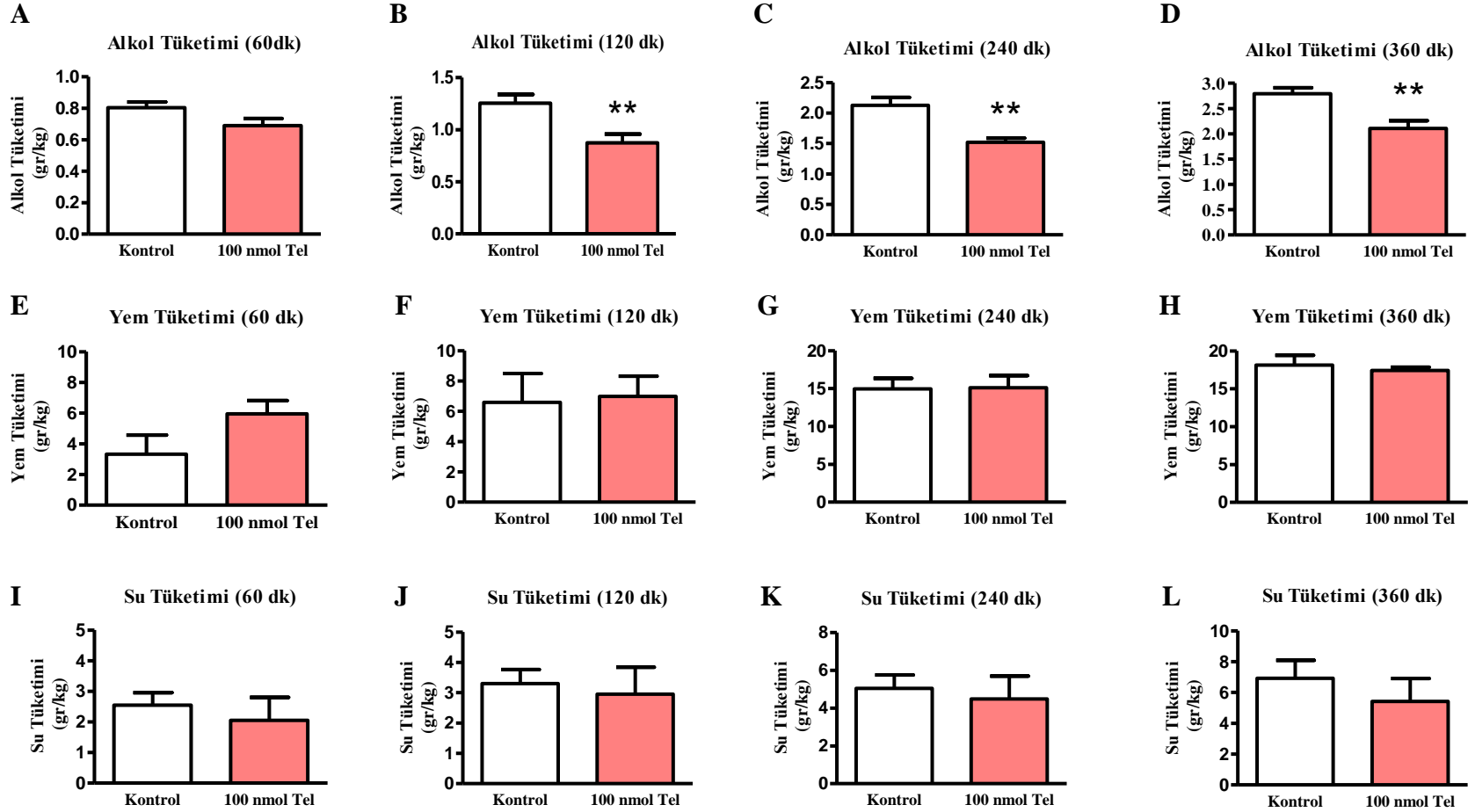
Kontrol yBOS grubunun karanlık periyodun 240. dk'sında ortalama alkol tüketimi  $2,13 \pm 0,13$  gr/kg olarak saptanırken, tedavi grubunda ortalama alkol tüketimi  $1,52 \pm 0,07$  gr/kg olarak saptanmış ve kontrol grubuyla karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde baskılanmıştır (Student's t testi,  $p < 0,01$ ). Kontrol grubunun ortalama yem tüketimi  $14,97 \pm 1,39$  gr/kg, tedavi gurubunun ise  $15,12 \pm 1,59$  gr/kg olarak saptanmıştır. Kontrol grubunun ortalama su tüketimi  $5,05 \pm 0,71$  gr/kg, tedavi grubunun ise  $4,48 \pm 1,22$  gr/kg olarak saptanmıştır. Kontrol gurubuyla tedavi grubunun 240 dk'lık yem ve su tüketimleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır (Şekil 11).

Kontrol yBOS grubunun karanlık periyodun 360. dk'sında ortalama alkol tüketimi  $2,79 \pm 0,12$  gr/kg olarak saptanırken, tedavi grubunda ortalama alkol tüketimi  $2,11 \pm 0,15$  gr/kg olarak saptanmış ve kontrol grubuyla karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde baskılanmıştır (Student's t testi,  $p < 0,01$ ). Kontrol grubunun ortalama yem tüketimi  $18,13 \pm 1,29$  gr/kg, tedavi gurubunun ise  $17,42 \pm 0,43$  gr/kg olarak saptanmış. Kontrol grubunun ortalama su tüketimi  $6,92 \pm 1,17$  gr/kg, tedavi grubunun ise  $5,42 \pm 1,50$  gr/kg olarak saptanmıştır. Kontrol gurubuyla tedavi grubunun 360 dk'lık yem ve su tüketimleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır (Şekil 11).

Santral telmisartan tedavisinin maksimum etkinliği 120. dk'da gözlemlenmiş ve bu noktada 100 nmol telmisartan uygulamasının sP sıçanların alkol tüketimini kontrol grubuna göre %30,9 oranında düşürdüğü saptanmıştır. Bu oran giderek azalmış ve 24 saatlik tüketim datasında %16,2 seviyesine gerilemiştir.



**Şekil 10.** Kontrol yBOS (n=6) ve telmisartan 100 nmol (n=6) gruplarının tedaviden bir gün önce, tedavi günü ve tedaviden bir gün sonraki alkol (A-C), yem (D-F) ve su (G-I) tüketimleri. \*p<0.05.



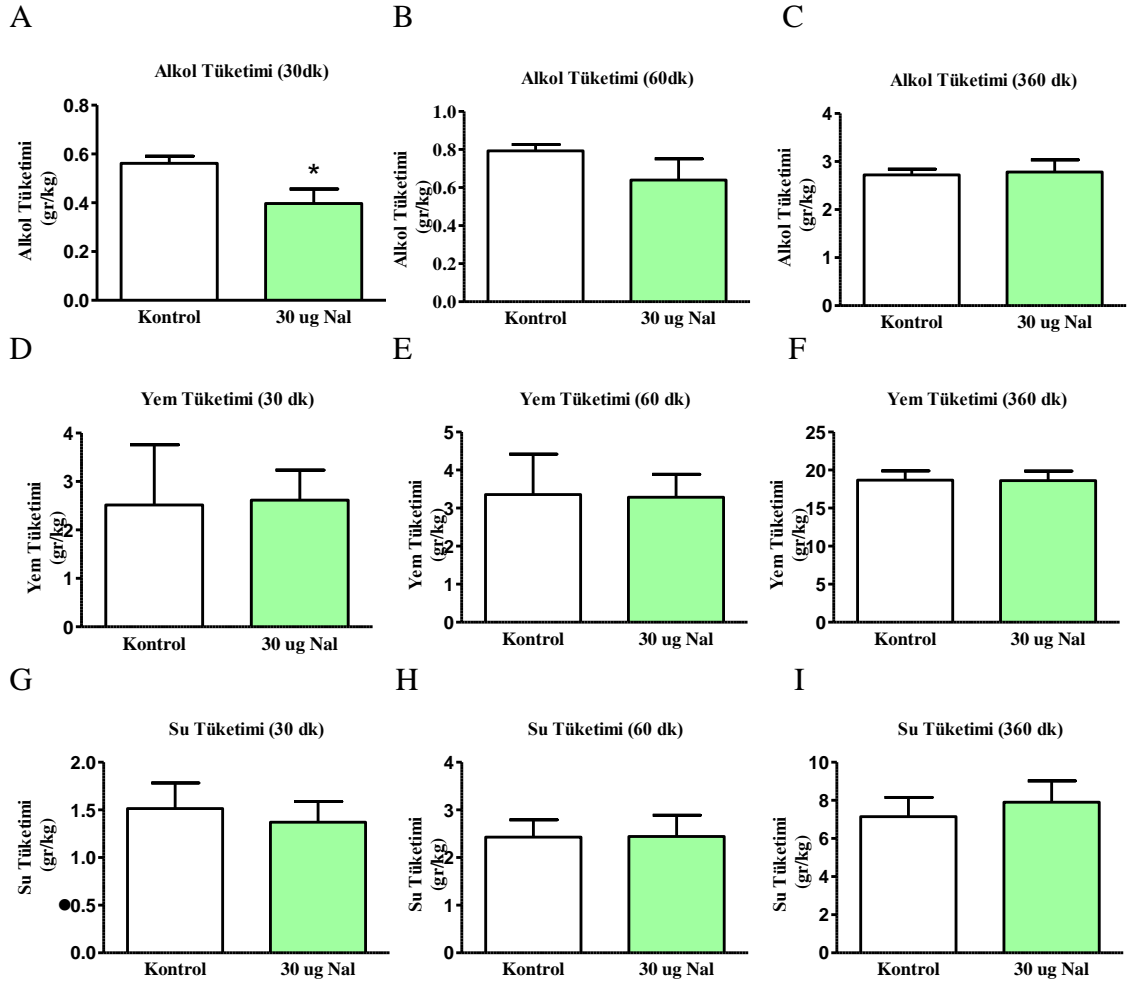
**Şekil 11.** Kontrol yBOS (n=6) ve Telmisartan (n=6) icv enjeksiyonu sonrası sP sıçanların karanlık periodun 60, 120, 240 ve 360. dk.'larındaki toplam alkol (A-D), yem (E-H) ve su (I-L) tüketimleri. \*\* p<0,01.

#### 4.1.3.3. Naloksonun santral uygulamasının iki şişe serbest tercihli alkol bağımlılık modelinde sP sıçanların alkol tüketimine etkisi

Karanlık periyodun ilk 30 dk'sında deney gruplarının ortalama alkol tüketimleri sırasıyla kontrol grubu (n=7) için  $0,56\pm0,03$  gr/kg, nalokson 30 µg grubu (n=7) için  $0,40\pm0,06$  gr/kg olarak ölçülmüştür. Kontrol ve deney gruplarının bu periyotta ortalama yem tüketimleri sırasıyla  $2,51\pm1,34$  gr/kg ile  $2,61\pm0,67$  gr/kg ve su tüketimleri ise  $1,51\pm0,29$  gr/kg ve  $1,37\pm0,23$  gr/kg olarak saptanmıştır. 30 dk'lık periyotta nalokson 30 µg grubunun, kontrol grubuna göre alkol tüketimini istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde baskıladığı ortaya çıkmıştır (Student's t testi,  $p<0,05$ ). Yem ve su tüketimleri arasında anlamlı farklılık bulunmamıştır.

30 µg naloksonun sP sıçanların alkol tüketimi üzerindeki etkisi 30 dk ile sınırlı kalmış diğer zaman aralıklarında nalokson tedavisi alan sıçanların alkol tüketimleri kontrol grubuna yaklaşmış ve 360 dk da aradaki fark tamamen kapanmıştır.

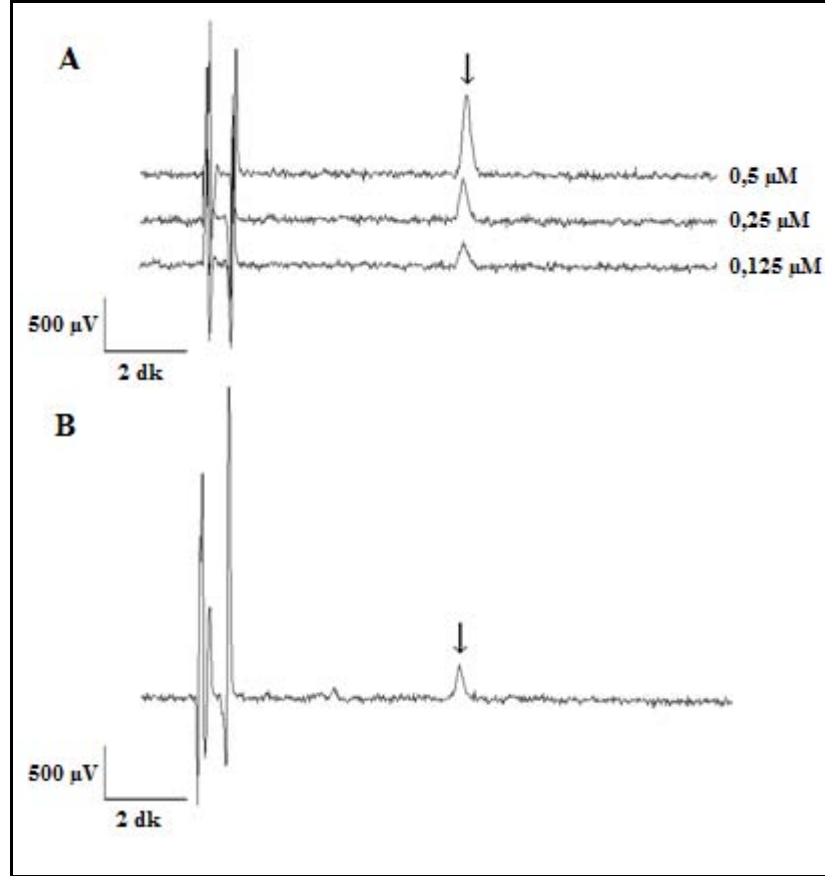
Santral nalokson tedavisinin maksimum etkinliği 30. dk' da gözlemlenmiş ve bu noktada 30 µg naloksonun sP sıçanların alkol tüketimini kontrol grubuna göre %28,6 oranında düşürdüğü saptanmıştır. Bu oran 60. dk tüketim datasında %18,9 seviyesine gerilemiş ve anlamlılığını kaybetmiştir.



**Şekil 12.** Telmisartan (n=7) ve kontrol yBOS (n=7) icv enjeksiyonu sonrası sP sıçanların karanlık periodun 30, 60 ve 360. dk'larındaki alkol (A-C), yem (D-F) ve su (G-I) tüketimleri. \*\* p<0,01.

#### 4.2. Mikrodiyaliz Deneyleri

Dopamin standartlarının ve mikrodiyaliz örneklerinin analizinde dopamin için retansiyon zamanı  $7,81 \pm 0,27$  dk olarak ölçülmüştür, retansiyon zamanları her iki tarafından %2 pik parçası içinde olacak şekilde kabul edilmiştir. Mikrodiyaliz örneklerinin analizi sonucu kromatogramda 15. dk dan sonra herhangi bir pik saptanmadığı için kromatogram süresi 15 dk ile sınırlandırılmıştır. Şekil 13’de bir mikrodiyaliz örneğinin ve bu örneğin analizinde kullanılan dopamin standartlarının örnek kromatogramları verilmiştir.



**Şekil 13.** A) Yukarıdan aşağıya doğru  $0,5 \mu\text{M}$ ,  $0,25 \mu\text{M}$  ve  $0,125 \mu\text{M}$  dopamin standartlarından elde edilen kromatogramlar ( $R^2=0,9975$ ). B) Mikrodiyaliz örneğine ait kromatogram.

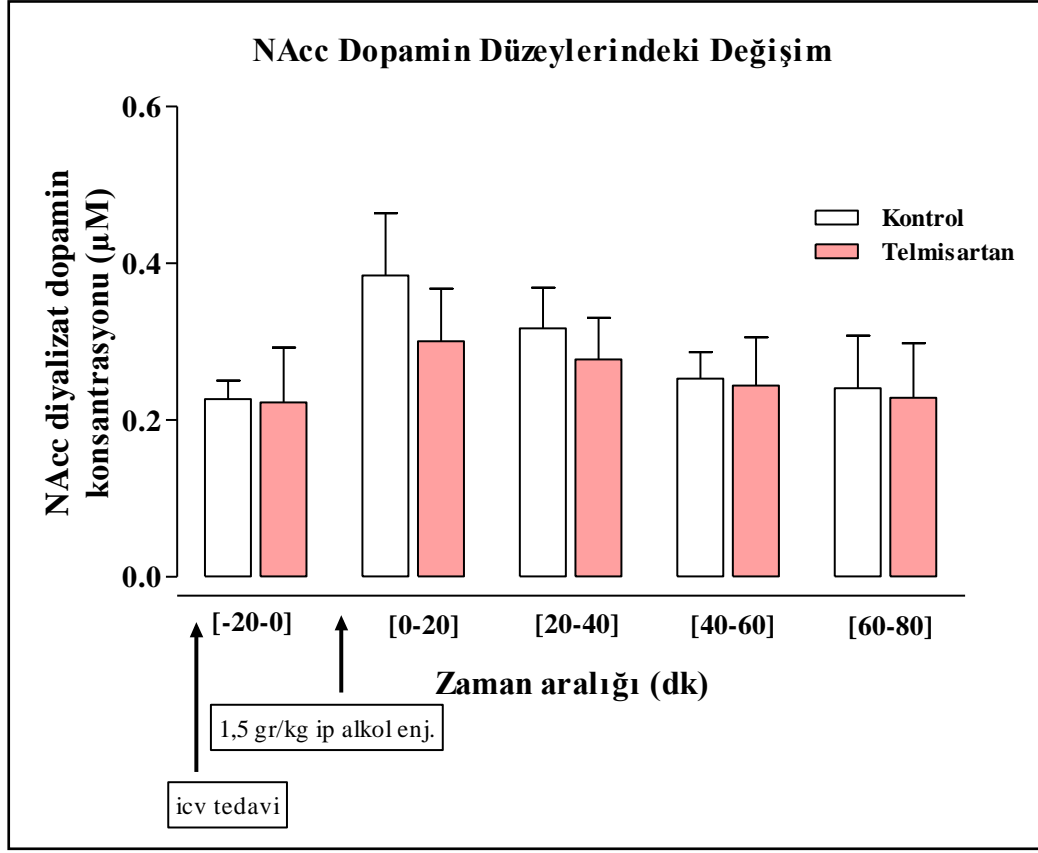
Kontrol grubunun (n=5) ve telmisartan tedavi grubunun (n=4) dinlenim periyodu sonrası toplanan bazal mikrodiyaliz örneklerindeki dopamin konsantrasyonlarının ortalamaları sırasıyla  $0,23\pm0,02 \mu\text{M}$  ve  $0,22\pm0,07\mu\text{M}$  olarak saptanmıştır.

Ön tedavi olarak yBOS enjeksiyonu yapılan kontrol grubunda 1,5 gr/kg akut alkol uygulaması sonrası [0-20] dk zaman aralığında kadar toplanan mikrodiyaliz örneğindeki dopamin konsantrasyonu  $0,38\pm0,08 \mu\text{M}$  seviyelerine yükselirken, 100 nmol telmisartan ön tedavisi alan grupta dopamin konsantrasyonu  $0,30\pm0,07 \mu\text{M}$  seviyelerine yükselmiştir ancak bu yükselme bazal değerler ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlılık göstermemiştir (ANOVA testi,  $p>0,05$ ).

Diyalizat örneklerinin dopamin konsantrasyonlarındaki artış trendi alkol enjeksiyonu sonrası ilk 20 dk'da toplanan diyalizat örneği ile sınırlı kalmıştır. [20-40] dk zaman aralığında toplanan diyalizat örneklerindeki ortalama dopamin konsantrasyonları düşmeye başlamış bu düşüş trendi [40-60] ve [60-80] dk zaman aralıklarında toplanan diyalizat örneklerinde devam etmiş ve bazal seviyelere yaklaşmıştır.

Telmisartan ön tedavisi, alkol enjeksiyonu sonrası NAcc'de oluşan dopamin salınımını [0-20] dk zaman aralığında kontrol yBOS grubuna göre azaltmış gibi görülse de kontrol yBOS ve telmisartan gruplarının dopamin konsantrasyonları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmamıştır (ANOVA testi,  $p>0,05$ ).

Tedavi ve kontrol gruplarının akut alkol uygulaması sonucu NAcc'deki dopamin konsantrasyonlarındaki değişim Şekil 14'te gösterilmiştir.



**Şekil 14.** Telmisartanın akut ip alkol uygulaması ile NAcc'den indüklenen dopamin salınımı üzerine etkisi. Kontrol (yBOS; n=5) ve Telmisartan (100 nmol; n=4) enjeksiyonları, ip alkol uygulamasından 15 dk önce gerçekleştirilmiş, diyalizat örnekleri 20 dk'lık aralıklarla toplanmıştır.

### 4.3. Bulgular Özet

Bu çalışmada:

- 1- sP sıçanlarda icv uygulanan 100 nmol telmisartanın yem ve su tüketimini değiştirmeden spesifik bir şekilde sıçanların alkol tüketimini anlamlı bir şekilde baskılamıştır.
- 2- 100 nmol telmisartanın alkol tüketimini baskılayıcı etkisi karanlık periyodun 120. dk zaman noktasında anlamlı hale gelmiş ve bu anlamlı etki 24 saat sonuna kadar sürmüştür.
- 3- 30 µg nalokson icv tedavisi sP sıçanların alkol tüketimini karanlık periyodun ilk 30 dk'ında baskılamıştır.

- 4- 100 nmol telmisartanın etkisi yine icv uygulanan 30 µg nalokson tedavisiyle karşılaştırıldığında her iki tedavinin maksimum etkinlik gösterdileri zaman aralıklarında sP sıçanların alkol tüketimleri üzerindeki etki güçleri birbirine yakın bulunmuştur.
- 5- 100 nmol telmisartanın icv uygulaması, 1,5 gr/kg akut alkol uygulaması ile NAcc'den indüklenen dopamin salınımındaki artışta istatistiksel olarak anlamlı bir etki göstermemiştir.

## 5. TARTIŞMA VE SONUÇLAR

Bu tez çalışmasında beyinde bulunan lokal RAS'nin, alkol bağımlılığı ve alkol bağımlılığının altında yatan mekanizmalardaki rolü araştırılmıştır. Bu amaçla, telmisartanın santral yoldan uygulanmasının iki şişe serbest tercihli alkol bağımlılık modelinde sP sıçanların alkol tüketimine etkisi incelenmiş ve bu etki naloksonun etkisi ile karşılaştırılmıştır.

Ayrıca bir anjiotensin reseptör blokeri olan telmisartanın mezokortikolimbik dopaminerjik sistem üzerindeki olası etkisini incelemek amacı ile telmisartanın, akut alkol uygulaması ile Wistar sıçanlarda NAcc'dan salınımı indüklenen dopamin düzeylerindeki artışa etkisi mikrodializ yöntemi ile araştırılmıştır.

### 5.1. Telmisartanın İki Şişe Serbest Tercihli Alkol Bağımlılık Modelinde sP Sıçanların Alkol Tüketimine Etkisi

Bu çalışmada literatürde ilk defa bir anjiotensin reseptör blokerinin (telmisartanın) santral uygulamasının sP sıçanların alkol tüketimlerini iki şişe serbest tercihli alkol bağımlılık modelinde baskıladığı farklı deneylerde tekrarlanarak gösterilmiştir. Telmisartan tedavisi deneylerde hayvanların yem ve su tüketiminde anlamlı değişikliklere neden olmadan spesifik bir şekilde alkol tüketimini düşürmüştür. Telmisartan tedavisini takip eden günde, telmisartan tedavisiyle alkol tüketimi azalan hayvanların tüketimlerinin yükselerek kontrol grubu seviyesine çıkması, telmisartanın alkol tüketimindeki etkisinin geri dönüşlü olduğunu göstermiştir.

Telmisartanın sP sıçanların alkol tüketimini azaltıcı etkisi enjeksiyon sonrası 120 dk'da istatistiksel olarak anlamlı hale gelmiş ve bu anlamlı etki 24 saat sonuna kadar sürmüştür.

RAS'ın deney hayvanlarının alkol tüketimi üzerindeki etkisinin incelendiği geçmiş çalışmalar birbiriyle çelişkili sonuçlar vermiştir. Bu konuda yapılan ilk deneylerde AngII'nin alkol tüketimini azalttığı ileri sürülürken daha sonraki yıllarda farklı deney modellerinde yapılan çalışmalarda AngII'nin alkol tüketimini arttırdığı gösterilmiştir.

Deney hayvanının alkole ulaşımının günde 40 dk gibi kısa süreli olduğu kısıtlı-programlı alkol tüketim modellerinde yapılan çalışmalarda AngII'nin periferik uygulamasının sıçanların alkol tüketimini azalttığı rapor edilmiştir (Grupp ve diğ., 1988;1992). ADE inhibitörü olan seranapirilin periferik uygulamasının alkol tercih eden (Preferring rats;P) ve alkol tercih etmeyen (Non-preferring rats; NP) sıçanlarda alkol tüketimini azalttığı, AngII'nin periferik uygulamasının ise sadece NP sıçanların alkol tüketiminde anlamlı azalmaya yol açtığı (Grupp ve diğ., 1992) gösterilmiştir. Başka bir çalışmada farklı ADE inhibitörlerinin ve AT<sub>2</sub> antagonisti *Sar<sup>1</sup>-Thr<sup>8</sup>Angiotensin II*'nin icv tedavisinin hayvanların alkol tüketimini azaltmadığı (Robertson ve diğ., 1994) ileri sürülmüştür. Aynı grubun yaptığı lezyon çalışmasında periferden uygulanan AngII'nin alkol tüketimindeki etkisine kan beyin bariyerinin bulunmadığı *sub fornical organ*'ın sorumlu olduğu ileri sürülmüştür (Grupp ve diğ.,1989).

Deney hayvanının alkole ulaşımının 24 saat olduğu iki şişe serbest tercihli alkol modelinin kullanıldığı çalışmalarda ise AngII'nin santral uygulamasının Long-Evans sıçanlarda su ve alkol tüketimini arttırırken, ADE inhibitörlerinin periferik uygulamasının da alkol tüketimini arttırdığı gösterilmiştir. Aynı çalışmada ADE inhibitörlerinin alkol tüketimini azaltıcı etkisinin, RAS'ın hem santral hem de periferde baskılanması kaydıyla mümkün olabileceği öne sürülmüştür (Fitts,1993). AngII'nin C57BL/6j farelerde santral yolla uygulanmasının, bu hayvanların alkol tüketimini, AngII'nin tetiklediği susama hissinden bağımsız olarak arttırdığı (Weisinger ve diğ., 1999b) gösterilmiştir. Anjiyotensinojen geni *over ekspresyonu* bulunan TGM123 farelerin kontrol grubuna göre daha yüksek oranda alkol tükettikleri, anjiyotensinojen geni *knockout* olan TLM farelerin ise kontrollerine göre ise daha az oranda alkol tükettikleri, ve kan beyin bariyerini geçebilen bir ADE inhibitörü olan spiraprilin periferik yoldan uygulanmasının TGM123 farelerinin alkol tüketimini kontrollere göre anlamlı bir şekilde düşürdüğü bulunmuştur (Maul ve diğ., 2001). AT<sub>1A</sub>, AT<sub>2</sub> ve bradikinin B<sub>2</sub> reseptörleri *knock out* farelerden sadece AT<sub>1A</sub> *knock out* farelerin alkol tüketiminin düşük olduğunun saptanması sonucu bu etkiden AT<sub>1</sub> reseptörlerinin sorumlu olduğu, spiraprilin indükleyebileceği bradikinin artışından kaynaklanmadığı (Maul ve diğ., 2005) ileri sürülmüştür.

Bu çalışmaların sonuçları arasındaki çelişkiler metod farklılıklarına bağlanabilir. Kısıtlı-programlı alkol tüketim modellerinde hayvanın günün büyük bir kısmında suya serbest ulaşımı bulunmasına rağmen alkole erişiminin kısıtlı bir süreyle sınırlandırılması, deneyin hayvanın yaşadığı kafesten başka bir kafeste gerçekleştirilmesi ve hayvanın bu kafesi alkol tüketimiyle eşleştirmesi gibi sorunlar nedeniyle 24 saatlik serbest tercihlili çalışmaların metod olarak daha üstün oldukları kabul edilmektedir (Fitts,1993).

Bu tez çalışmasında AT<sub>1</sub> reseptör blokleri telmisartanın santral uygulaması ile sP sıçanların alkol tüketimlerinin farmakolojik olarak baskılandığı gösterilmiştir. Bu sonuç santral RAS'ın farmakolojik olarak santral AngII enjeksiyonuyla indüklendiği (Fitts,1993; Weisinger, 1999) veya genetik olarak anjiyotensinojen geninin susturulduğu yada indüklendiği (Maul ve diğ., 2001; Maul ve diğ., 2005) çalışmalarla uyumludur.

Bizim bulgularımızla uyumsuz olan AngII antagonisti *Sar<sup>1</sup>-Thr<sup>8</sup>Angiotensin II'nin* santral yoldan uygulandığı çalışmada bu farmakolojik müdahalenin hayvanların alkol tüketimi üzerinde belirgin bir etkisi saptanmadığı belirtilmektedir (Robertson ve diğ., 1994). Robertson ve arkadaşlarının yaptığı bu çalışmada bizim çalışmamızdan farklı olarak kısıtlı-programlı bir metod uygulanmış ve hayvanların alkole ulaşımı günde 40 dk ile kısıtlanmıştır. Öte yandan bu çalışmada icv enjeksiyon olarak fizyolojik tuzlu su alan 2 kontrol grubunun da bazal değerlere göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde baskılanmış olması düşündürücüdür. Yazar bu durumu ilk kez icv enjeksiyon uygulanan hayvanlarda icv enjeksiyon prosedürünün bir "artefaktı" olarak değerlendirmiş ve bu grupları göz ardı etmiştir. Benzer bir baskılanma bu tez çalışmasının ilk deneyinde de daha küçük boyutta gözlemlenmiştir. Bu etki istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Robertson ve arkadaşlarının deneyinde bu tez çalışmasına göre daha yüksek hacimde ve daha hızlı (4µl-30sn) enjeksiyon uygulanması kontrol gruplarında izlenen baskılanmanın daha güçlü olmasına neden olmuş olabilir.

Sonuç olarak bu tez çalışmasında beyindeki lokal RAS'ın AT<sub>2</sub> reseptör blokleri telmisartanın icv uygulanması ile santral olarak baskılanmasının sP sıçanların alkol tüketimini istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde düşürdüğü gösterilmiştir.

## 5.2. Naloksonun İki Şişe Serbest Tercihli Alkol Bağımlılık Modelinde sP Sıçanların Alkol Tüketimine Etkisi

Opioid reseptör antagonisti olan naloksonun periferik uygulamasının deney hayvanlarının alkol tüketimini düşürücü etkisi bilinmektedir (Froehlich ve diğ.,1987). Naloksonun sıçanlarda plazma yarı ömrü 30-40 dk civarında bulunmuş ve serum konsantrasyonları ile beyin konsantrasyonlarının genellikle korele seyrettiği bununla birlikte sıçanlarda beyin konsantrasyonlarının intravenöz enjeksiyon sonrasında hızlıca azaldığı gösterilmiştir (Ngai ve diğ., 1976).

Bu çalışmada farklı alkol bağımlılık modellerinde periferik yoldan uygulandığında deney hayvanlarının alkol tüketimini baskıladığı gösterilmiş bir ajan olan naloksonun icv uygulamasının telmisartanın etkinliği ile karşılaştırılması amaçlanmıştır. Yapılan deneylerde etki süresi kısa olan nalokson sP sıçanların alkol tüketimini ilk 30 dk' da anlamlı bir şekilde baskılamış, telmisartanın etkinliğinin ortaya çıktığı 120. dk' da etkinliğini kaybetmiş, 360. dk' da ise nalokson grubunun tüketiminin kontrol grubu ile eşitlendiği gösterilmiştir.

Telmisartanın etkinliğinin maksimum olduğu 120. dk'da kontrol grubuna göre ortalama alkol tüketimindeki azalma %30,9 olarak bulunmuştur ve naloksonun etkinliğinin anlamlı olarak çıktığı 30. dk'da nalokson grubu için bu oran %28,6 olarak birbirine yakın değerlerde saptanmıştır.

Naloksonun kan beyin bariyerini geçemeyen formu olan metil naloksonun icv uygulandığı operant sistem kullanılan bir çalışmada (Heyser ve diğ., 1999), metil naloksonun 2 µg ve üzeri dozlarda operant yanıtı baskıladığı için daha yüksek dozların denenmediği belirtilmiş, 2 µg 'ın altındaki dozlarda metil naloksonun hayvanların alkole yanıtını anlamlı bir şekilde azaltmadığı gösterilmiştir. Naloksonun 30 µg dozunda icv olarak uygulandığı operant sistem kullanılan başka bir çalışmada (Hyyti ve Kiianmaa, 2001) ise naloksonun icv uygulamasının 30 dk'lık süreçte hayvanların alkol için gösterdikleri operant yanıtı azalttığı gösterilmiştir. Tez çalışmasından elde edilen bulgular Hyyti ve Kiianmaa'nın (2001) çalışması ile uyumludur. Ayrıca naloksonun etkisinin hızlı bir şekilde ortadan kalkması ve anlamlılık vermeyen 60 dk tüketim değerleri Vacca ve arkadaşlarının çalışmasındaki veriler ile uyumludur (Vacca ve diğ., 2002).

### **5.3. Telmisartanın Akut Alkol Uygulaması ile Wistar Sıçanların NAcc Bölgesinde İndüklenen Dopamin Salınımındaki Artışa Olan Etkisi**

Wistar sıçanlarda gerçekleştirilen mikrodializ deneylerinde, 1,5 gr/kg ip alkol uygulaması kontrol ve telmisartan tedavi gruplarında NAcc'den dopamin salınımını indüklemiştir ancak bu artış istatistiksel olarak anlamlılık seviyesine ulaşmamıştır.

Alkol enjeksiyonu öncesi bazal dopamin düzeyleri birbirine yakın olan deney gruplarından, ip alkol enjeksiyonu sonrasında telmisartan grubunun [0-20] ve [ 20-40] dk'lar arasında toplanan mikrodializ örneklerindeki dopamin konsantrasyonu kontrol grubundaki kadar yükselmemiştir. İki grup arasındaki bu fark istatistiksel anlamlılık vermemiştir.

Farelerde yapılan çalışmalarda NAcc gibi bağımlılık için önemli beyin bölgelerinde anjiyotensin reseptörlerinin eksprese edildiği gösterilmiştir. Dopamin antagonisti flufenazin tedavisinin anjiyotensinojen geni aşırı ekspresyonu olan TGM123 farelerinin alkol tüketimini kontrol farelere göre daha çok baskıladığını ortaya koymuştur (Maul ve diğ., 2001). Farelerde 21 günlük anti dopaminerjik etkili haloperidol tedavisinin NAcc bölgesinde AT<sub>1</sub> reseptörlerinin sayısını arttırdığı (Jenkins ve diğ., 1997), sıçanlarda ise bir ADE inhibitörü olan perindoprilin striatumda dopamin düzeylerini arttırdığı gösterilmiştir (Jenkins, 2008). AT<sub>1</sub> reseptörü aşırı ekspresyonu bulunan NSE-AT<sub>1A</sub> farelerde kronik alkol tüketiminin, kaudat putamen, NAcc ve olfaktör tüberkülda dopamin reseptörlerinde artışa yol açtığı ve bu artışın aşırı gen ekspresyonu olmayan kontrol farelerde gözlenmediği bildirilmiştir (Moore, 2007).

### **5.4 Çalışmanın Kısıtlılıkları**

sP sıçanların iki şişe serbest tercihlili alkol bağımlılık modelinde deneyin başlangıcında 3-4 gr/kg olan alkol tüketimlerinin birkaç gün içinde hızlıca 6-7 gr/kg seviyelerine çıktığı bilinmektedir (Colombo ve diğ, 2006). Bu tez çalışmasında sP sıçanların ortalama alkol tüketimi literatüte uygun olarak 3-4 gr/kg seviyelerinden başlamıştır fakat 6 gr/kg seviyelerine ulaşması yaklaşık olarak 20 gün almıştır. Bunun en önemli nedeni hayvanların ithalatında meydana gelen sorunlar nedeniyle deneylere optimal olan 75 günlük hayvanlar ile değil 120 günlük hayvanlarla

başlanmak zorunda kalınmasıdır. Bununla beraber hayvanların ağırlıkları ideal değerlerin üzerinde olmasına rağmen 6 gr/kg ve üzeri alkol tüketimlerini deneylerin sonuna kadar sürdürmüşlerdir ve bazal tüketimleri benzer deney grupları oluşturulmuştur. Histolojik doğrulamada yanlış kanül yerleşimi olan hayvanların çıkarılmasına rağmen deney öncesi günün tüketim verilerinin birbirine yakın olması da deney gruplarının başarı ile oluşturulduğunu ortaya koymuştur.

Naloksonun hayvanların alkol tüketimi üzerindeki istatistiksel olarak anlamlı etkisinin karanlık periyodun ilk 30 dk'sı ile sınırlı kalması, telmisartanın istatistiksel olarak anlamlı etkisinin ise karanlık periyodun 120. dk'sında ortaya çıkması bu iki ilacın etkinliklerinin karşılaştırılmasını zorlaştırmıştır. Bu sebeple söz konusu tedavi gruplarının alkol tüketimleri kendi kontrol gruplarına göre oranlanarak bu tedavilerin hayvanların alkol tüketimini ne kadar baskılandığı hesaplanmış ve her iki ilacında maksimum etkinlik gösterdikleri zaman aralıkları birbiriyle karşılaştırılmıştır. Nalokson ve telmisartanın etkinliklerinin farklı zaman noktaları (Nalokson için 30. dk, telmisartan için 120. dk) kullanılarak karşılaştırılması tartışmaya açıktır.

Histolojik doğrulama sonucu yerleşim yeri NAcc'nin dışında saptanan deney hayvanlarının gruplardan çıkarılması sonucu, hayvan sayısı kontrol grubunda 5, telmisartan tedavi grubunda ise 4 hayvan olmuştur. Bu durum mikrodiyaliz çalışmasının gücünü istatistiksel olarak azaltmıştır. Gruplardaki deney sayısının artırılması gruplar içerisindeki izlenen standart hatanın azalmasını sağlayacaktır. Dolayısıyla deney sonuçlarının sağlıklı olarak değerlendirilebilmesi için denek sayısının artırılması gerekmektedir.

## **5.5 Çalışma Sonuçlarının Ortaya Koyduğu Hedefler**

Bu tez çalışmasında anjiyotensin reseptör blokleri olarak seçilen telmisartanın iki şişe serbest tercihli alkol bağımlılık modelinde sP sıçanların alkol tüketimini baskıladığı gösterilmiştir. Alkol tüketiminde izlenen bu baskılanmanın, telmisartanın anjiyotensin reseptör bloker etkinliğine bağlı olduğunun gösterilmesi için farklı anjiyotensin reseptör blokerlerinin de alkol tüketimini baskıladığı gösterilmelidir. Ayrıca telmisartan ile görülen bu etkinin kullanılan yöntemle spesifik olmadığını gösterilmesi için telmisartanın farklı alkol bağımlılık modellerinde etkinliğinin araştırılması da uygun olacaktır.

sP sıçanların yüksek anksiyete seviyelerine sahip oldukları gösterilmiştir ve hayvanların yüksek anksiyete seviyelerinin yüksek alkol tüketimlerinin sebeplerinden biri olabileceği ileri sürülmüştür (Colombo, 1995; Roman ve Colombo, 2009). sP sıçanlarda amigdalanın santral nükleusunda yapılan bir mikrodializ çalışması bazal CRF değerlerinin alkol tercih etmeyen sNP sıçanlara göre 4 kat daha fazla olduğunu ortaya koymuştur (Richter ve diğ., 2000). Başka bir çalışma AT<sub>1</sub> reseptör blokleri olan kandesartanın 14 günlük tedavisinin para ventriküler nükleustaki CRF ve CRF mRNA seviyelerini, hipofizdeki ACTH seviyelerini ve adrenal bezdeki kortikosteron seviyelerindeki stress ile indüklenen artışı baskıladığını böylece hipotalamus-hipofiz-adrenal bez eksenini bozarak stress yanıtını azalttığını göstermiştir (Armando ve diğ., 2007). Kronik kandesartan tedavisinin de sıçanlarda stres ile indüklenen adrenerjik yanıtı bloke edebildiği gösterilmiştir (Müller ve diğ., 2010)

AT<sub>1</sub> reseptörlerinin stress ile ilgili beyin yapılarından hipotalamustaki CRF üreten parvoselüler nöronlarda, santral sempatik aktivitenin yönetildiği beyin alanlarında, periferik sempatik sinir uçlarında ve adrenal medullada eksprese edildiği bilinmektedir (Sommer ve Saavedra, 2008).

Bu bulgular ışığında telmisartan tedavisinin sP sıçanların alkol tüketimini düşürücü etkisi, anjiyotensin reseptör blokerlerinin stress yanıtını baskılayıcı etkileri ile yakından ilgili olabilir. Telmisartanın bu tez çalışmasında gösterilen alkol alımını baskılayıcı etkisinin altında yatan mekanizmanın aydınlatılması için yeni çalışmalara gereksinim vardır.

RAS, stres ve alkol tüketimi arasındaki ilişkinin aydınlatılabilmesi için alkol bağımlılığı ile stresin altında yatan mekanizmaların birbirine benzer olduğu alkol bağımlılığının *withdrawal/negatif affect* (yoksunluk/olumsuz duygulanım) fazını hedef alan yoksunluk çalışmalarında RAS sistemini manipüle eden farmakolojik ajanların araştırılması uygun olacaktır.

## 5.6. Sonuçlar zet

Bu alışmada;

- 1- RAS'ın santral düzeyde, anjiyotensin reseptör blokeri telmisartanın icv uygulaması ile baskılanmasının, deney hayvanlarının alkol tüketimini anlamlı bir şekilde azalttığı literatürde ilk kez gösterilmiştir.
- 2- Deney hayvanlarında periferik uygulama ile alkol tüketimini azalttığı bilinen, opioid reseptör antagonisti olan naloksonun icv uygulamasının deney hayvanlarının alkol tüketimini anlamlı bir şekilde azalttığı gösterilmiştir.
- 3- Nalokson ve telmisartanın en etkin oldukları zaman aralıklarında, deney hayvanlarının alkol tüketimini baskılayıcı etkileri birbirine yakın bulunmuştur.
- 4- RAS'ın, anjiyotensin reseptör blokeri telmisartanın icv uygulaması ile santral düzeyde baskılanması, akut alkol uygulaması ile NAcc'den indüklenen dopamin salınımını azaltma eğilimi göstermiştir.

## 6. KAYNAKLAR

- Agabio R, Carai MA, Lobina C, Pani M, Reali R, Vacca G, Gessa GL, Colombo G. Development of short-lasting alcohol deprivation effect in sardinian alcohol-preferring rats. *Alcohol* 2000;21(1):59-62.
- Alheid GF, De Olmos JS, Beltramino CA. Amygdala and extended amygdala. In: Paxinos G (ed). *The Rat Nervous System*. Academic Press: San Diego 1995;495–578.
- Allen AM, Oldfield BJ, Giles ME, Paxinos G, McKinley MJ, Mendelsohn FA. 2000. Localization of angiotensin receptors in the nervous system. In: Quirion R, Bjorklund A, Hodfelt T. (Eds.) *Handbook of Chemical Neuroanatomy*. Elsevier, Amsterdam 2000;79–124.
- Andlin-Sobocki P. Economic evidence in addiction: a review. *Eur J Health Econ* 2004;5:5–12.
- Anthony JC, Warner LA, Kessler RC. Comparative epidemiology of dependence on tobacco, alcohol, controlled substances, and inhalants: Basic findings from the National Comorbidity Survey. *Experimental and Clinical Psychopharmacology* 1994;2:244–268.
- Armando I, Volpi S, Aguilera G, Saavedra JM. Angiotensin II AT1 receptor blockade prevents the hypothalamic corticotropin-releasing factor response to isolation stress. *Brain Res* 2007;20;1142:92-9.
- Balseven A, Özdemir Ç, Tuğ A, Hancı H, Doğan Y. Madde Kullanımı, Bağımlılıktan Korunma ve Medya. *sted* 2002;11:3:91-93.
- Bankole AJ. Update on neuropharmacological treatments for alcoholism. *Scientific Basis and Clinical Findings*. *Biochem Pharmacol* 2008;1:75(1):34-56.
- Bano S, Morgan CJ, Badawy AA, Colombo G, Buckland PR, McGuffin P. Tryptophan metabolism in male Sardinian alcohol-preferring (sP) and -non-preferring (sNP) rats. *Alcohol* 1998;33:220–5.
- Basso N, Terragno NA. History About the Discovery of the Renin-Angiotensin System. *Hypertension* 2001;38:1246-1249.

- Bell RL, Sable HJK , Colombo G, Hyytia P , Rodd ZA, Lumeng L. Animal models for medications development targeting alcohol abuse using selectively bred rat lines: Neurobiological and pharmacological validity. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* 2012;103(1):119-55.
- Brunton LL and Parker KL. Renin and Angiotensin. Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics. 12th ed. Chapter 26. The McGraw-Hill Companies, China, 2011.
- Campbell VC, Taylor RE, Tizabi Y. Antinociceptive effects of alcohol and nicotine: involvement of the opiate system. *Brain Res* 2006;1097(1):71-7.
- Castelli MP, Pibiri F, Piras AP, Carboni G, Orrù A, Gessa GL. Differential G-protein coupling to GABAB receptor in limbic areas of alcohol-preferring and -non preferring rats. *Eur J Pharmacol* 2005;523:67–70.
- Cicero TJ. A critique of animal analogues of alcoholism. In: Majchrowicz E, Noble EP, editors. *Biochemistry and Pharmacology of Ethanol*, vol. 2. New York: Plenum Press 1979;533–60.
- Colombo G, Agabio R, Lobina C, Reali R, Zocchi A, Fadda F, Gessa GL. Sardinian alcohol-preferring rats: a genetic animal model of anxiety. *Physiol Behav* 1995;57(6):1181-5.
- Colombo G, Lobina C, Carai MAM, Gessa GL. Phenotypic characterization of genetically selected Sardinian alcohol-preferring (sP) and -non preferring (sNP) rats. *Addict Biol* 2006;11:324–38.
- Crackower MA, Sarao R, Oudit GY. Angiotensin-converting enzyme 2 is an essential regulator of heart function. *Nature* 2002;417:822–828.
- Crow TJ. Catecholamine-containing neurones and electrical self-stimulation: 2. A theoretical interpretation and some psychiatric implications. *Psychol Med* 1973;3: 66–73.
- Deutsch JA, Eisner A. Ethanol self-administration in the rat induced by forced drinking of ethanol. *Behav Biol* 1977;20:81–90.
- Dünya Sağlık Örgütü, Global Alcohol Report, 2011. [http://www.who.int/substance\\_abuse/publications/global\\_alcohol\\_report/msb\\_gsruprofiles.pdf](http://www.who.int/substance_abuse/publications/global_alcohol_report/msb_gsruprofiles.pdf).

- Ekmekçi A, Canberk A, Berkman K. Angiotensinler. Park Matbaacılık İstanbul, 2000.ISBN 975-97217-0-8.
- Everitt, B. J., and Wolf, M. E. (). Psychomotor stimulant addiction:a neural systems perspective. *Journal of Neuroscience* 2002;22:3312–3320
- Fadda P, Tronci S, Colombo G, Fratta W. Differences in the opiate system in selected brain regions of alcohol-preferring and alcohol-nonpreferring rats. *Alcohol Clin Exp Res* 1999;23:1296–305.
- First MB. American Psychiatric Association. Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders 4th edn. American Psychiatric Press: Washington, DC, 1994.
- Fitts DA. Angiotensin and captopril increase alcohol intake. *Pharmacol Biochem* 1993; 45(1):35-43.
- Froehlich, JC, Harts J, Lumeng L, Li TK. Naloxone attenuation of voluntary alcohol consumption. *Alcohol and Alcoholism Suppl.*1987; 1, 333–337.
- [Fuxe K](#), [Andersson K](#), [Locatelli V](#), [Mutt V](#), [Lundberg J](#), [Hökfelt T](#), [Agnati LF](#), [Eneroth P](#), [Bolme P](#). Neuropeptides and central catecholamine systems: interactions in neuroendocrine and central cardiovascular regulation. In *Neural Peptides and Neural Adv Biochem Psychopharmacol* 1980;22:37-50.
- Garrig A, Peters T. Angiotensin-converting enzyme (ACE) gene polymorphism and alcoholism. *Biochem Soc Trans* 1998;26(2):S136..
- Grant B, Dawson D, Stinson F, Chou P, Dufour M, Pickering R. The 12-month prevalence and trends in DSM-IV alcohol abuse and dependence: United States, 1991–1992 and 2001–2002. *Drug and Alcohol Dependence* 2004;11;74(3):223-34
- Griffin JF. A strategic approach to vaccine development: animal models, monitoring vaccine efficacy, formulation and delivery. *Adv Drug Deliv Rev* 2002;54:851–61.
- Grupp LA, Killian M, Perlanski E, Stewart RB. Angiotensin II reduces voluntary alcohol intake in the rat. *Pharmacol Biochem Behav.* 1988;29(3):479-82.
- Grupp LA, Perlanski E, Stewart RB. Systemic angiotensin II acts at the subfornical organ to suppress voluntary alcohol consumption. *Pharmacol Biochem Behav* 1989;34(1):201-5.

- Grupp LA. Effects of angiotensin II and an angiotensin converting enzyme inhibitor on alcohol intake in P and NP rats. *Pharmacol Biochem Behav* 1992;41(1):105-8.
- Harwood H. Updating estimates of the economic cost of alcohol abuse in the United States: Estimates, update methods, and data report. The Lewin Group for the National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism 2000
- Hernandez G, Hamdani S, Rajabi H, Conover K, Stewart J, Arvanitogiannis A. Prolonged rewarding stimulation of the rat medial forebrain bundle: neurochemical and behavioral consequences. *Behav Neurosci* 2006;120: 888–904.
- [Heyser CJ](#), [Roberts AJ](#), Schulteis G, [Koob GF](#). Central administration of an opiate antagonist decreases oral ethanol self-administration in rats. *Alcohol Clin Exp Res* 1999;23(9):1468-76.
- Hnasko TS, Sotak BN, Palmiter RD. Morphine reward in dopamine-deficient mice. *Nature* 2005;438: 854–857.
- Hoffman PL, Rabe CS, Moses F, Tabakoff B. N-methyl-D-aspartate receptors and ethanol: Inhibition of calcium flux and cyclic GMP production. *Journal of Neurochemistry* 1989;52:1937–1940.
- Holloway FA, Bird DC, Devenport JA. Periodic availability: factors affecting alcohol selection in rats. *Alcohol* 1984;1:19–25.
- Hyytia P ve Kiianmaa K. Suppression of ethanol responding by centrally administered CTOP and naltrindole in AA and Wistar rats. *Alcoholism: Clinical And Experimental Research* 2001;25(1):25-33
- Jenkins TA, Chai SY, Mendelsohn FA. Upregulation of angiotensin II AT1 receptors in the mouse nucleus accumbens by chronic haloperidol treatment. *Brain Res* 1997; 14:748(1-2):137-42.
- Jenkins TA. Effect of angiotensin-related antihypertensives on brain neurotransmitter levels in rats. *Neurosci Lett* 2008;444(2):186-9.
- Johnson BA. Update on neuropharmacological treatments for alcoholism: scientific basis and clinical findings. [Biochem Pharmacol](#). 2008;1;75(1):34-56.

- Jones E, Vinh A, McCarthy CA. AT<sub>2</sub> receptors: Functional relevance in cardiovascular disease. *Pharmacol Ther* 2008;120:292–316.
- Kalivas PW, O'Brien C. Drug addiction as a pathology of staged neuroplasticity. *Neuropsychopharmacology* 2008;33: 166–180.
- Kayaalp O. Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji, Hacettepe Taş, Ankara, 11. Baskı 2005;61:739-750.
- Koob GF, Le Moal M. Drug abuse: Hedonic homeostatic dysregulation. *Science* 1997;3:278(5335):52-8.
- Koob GF. Allostatic view of motivation: implications for psychopathology. In: Bevens RA, Bardo MT (eds). *Motivational Factors in the Etiology of Drug Abuse* (series title: Nebraska Symposium on Motivation, vol 50). University of Nebraska Press: Lincoln, NE. 2004; 1–18.
- Koob GF, Le Moal M. Alcohol. Chapter 5 *Neurobiology of Addiction*. pp:173-241. Academic Press: London. 2006.
- Koob GF, Kreek MJ. Stress, dysregulation of drug reward pathways, and the transition to drug dependence. *Am J Psychiatry* 2007;164: 1149–1159.
- Koob GF. A role for brain stress systems in addiction. *Neuron* 2008a;59: 11–34.
- Koob GF, Everitt BJ, Robbins TW. Reward, motivation, and addiction. In: Squire LG, Berg D, Bloom FE, Du Lac S, Ghosh A, Spitzer N (eds). *Fundamental Neuroscience* 3rd edn. Academic Press: Amsterdam. 2008b;987–1016
- Koob GF, Volkow ND. Neurocircuitry of Addiction. *Neuropsychopharmacology Reviews* 2010;35, 217–238.
- Lambert DW, Hooper NM, Turner AJ. Angiotensin-converting enzyme 2 and new insights into the renin–angiotensin system. *Biochemical Pharmacology* 2008,75:4:781-786
- Leggio B, Masi F, Grappi S, Nanni G, Gambarana C, Colombo G, et al. Sardinian alcohol-preferring and non-preferring rats show different reactivity to aversive stimuli and a similar response to a natural reward. *Brain Res* 2003;973:275–84.
- Lieber CS. Ethanol metabolism, cirrhosis and alcoholism. *Clinica Chimica Acta* 1997;257:59–84.

- Loi B, Lobina C, Maccioni P, Fantini N, Carai MAM, Gessa GL. Increase in alcohol intake, reduced flexibility of alcohol drinking, and evidence of signs of alcohol intoxication in Sardinian alcohol-preferring rats exposed to intermittent access to 20% alcohol. *Alcohol Clin Exp Res* 2010;34:2147–54.
- Martinez D, Gil R, Slifstein M, Hwang DR., Huang Y, Perez A, Kegeles L, Talbot P, Evans S, Krystal J, Laruelle M, Abi-Dargham A. Alcohol dependence is associated with blunted dopamine transmission in the ventral striatum. *Biol Psychiatry* 2005;58:779–786.
- Maul B, Siems WE, Hoehe MR, Grecksch G, Bader M, Walther T. Alcohol consumption is controlled by angiotensin II. *FASEB J* 2001;15(9):1640-2.
- Maul B, Krause W, Pankow K, Becker M, Gembardt F, Alenina N, Walther T, Bader M, Siems WE. Central angiotensin II controls alcohol consumption via its AT<sub>1</sub> receptor. *The FASEB Journal* 2005;19:1474-1481.
- McFarland K, and Kalivas PW. The circuitry mediating cocaine-induced reinstatement of drug-seeking behavior. *Journal of Neuroscience* 2001;21:8655–8663.
- McGregor A, Roberts DCS. Dopaminergic antagonism within the nucleus accumbens or the amygdala produces differential effects on intravenous cocaine self-administration under fixed and progressive ratio schedules of reinforcement. *Brain Res* 1993;624: 245–252.
- Mehta AK, Ticku MK. Ethanol potentiation of GABAergic transmission in cultured spinal cord neurons involves gamma-aminobutyric acidA-gated chloride channels. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 1988;246, 558–564.
- Melis M, Spiga S, Diana M. The dopamine hypothesis of drug addiction: hypodopaminergic state. *Int Rev Neurobiol* 2005;63: 101–154.
- Mendelsohn FA, Jenkins TA, Berkovic SF. Effects of angiotensin II on dopamine and serotonin turnover in the striatum of conscious rats. *Brain Res* 1993;11;613(2):221-9.
- Moore R, Krstew EV, Kirchhoff J, Davisson RL, Lawrence AJ. Central overexpression of angiotensin AT(1A) receptors prevents dopamine D(2)

- receptor regulation of alcohol consumption in mice. *Alcohol Clin Exp Res*. 2007;31(7):1128-37.
- Murphy TJ, Alexander RW, Griendling KK, Runge MS, Berstein KE. Isolation of a cDNA encoding the vascular type-1 angiotensin receptor. *Nature* 1991;351:233–236.
- Müller H, Kröger J, Jöhren O, Szymczak S, Bader M, Dominiak P, Raasch W. Stress sensitivity is increased in transgenic rats with low brain angiotensinogen. *J Endocrinol* 2010;204(1):85-92.
- [Nader K](#), [Schafe GE](#), [Le Doux JE](#). Fear memories require protein synthesis in the amygdala for reconsolidation after retrieval. 2000;17;406(6797):722-6.
- Nestler EJ. Is there a common molecular pathway for addiction? *Nat Neurosci* 2005;8: 1445–1449.
- Neugebauer V, Li W, Bird G, Han JS. The amygdala and persistent pain. *Neuroscientist* 2004;10, 221–234.
- [Ngai SH](#), [Berkowitz BA](#), [Yang JC](#), [Hempstead J](#), [Spector S](#). Pharmacokinetics of naloxone in rats and in man: basis for its potency and short duration of action. *Anesthesiology* 1976;44(5):398-401.
- Nie Z, Schweitzer P, Roberts AJ, Madamba SG, Moore SD, Siggins GR. Ethanol augments GABAergic transmission in the central amygdala via CRF1 receptors. *Science* 2004;303, 1512–1514.
- Nishimura Y, Ito T, Hoe K, Saavedra JM. Chronic peripheral administration of the angiotensin II AT(1) receptor antagonist candesartan blocks brain AT(1) receptors. *Brain Res* 2000;14;871(1):29-38.
- Paul M, Poyan Mehr A, Kreutz R. Physiology of local renin-angiotensin systems. *Physiol Rev*, 2006, 86:747–803.
- Paxinos G, Watson C, Paxinos and Watson *The Rat Brain In Stereotaxic Coordinates* 6 th edition. Elsevier Academic Press, London, 2007
- Pavel J, Benicky J, Murakami Y, Sanchez-Lemus E, Saavedra JM. Peripherally administered angiotensin II AT1 receptor antagonists are anti-stress compounds in vivo. *Ann N Y Acad Sci* 2008;1148:360-6.

- Portas CM, Devoto P, Gessa GL. Effect of ethanol on extracellular 5-hydroxytryptamine output in rat frontal cortex. *Eur J Pharmacol* 1994;270:123–5.
- Puddey IB, Vandongen R, Beilin LJ, Rouse IL. Alcohol stimulation of renin release in man: its relation to the hemodynamic, electrolyte, and sympatho-adrenal responses to drinking. *J Clin Endocrinol Metab* 1985;61:37-42.
- Quertemont E, Lallemand F, Colombo G, De Witte P. Taurine and ethanol preference: a microdialysis study using Sardinian alcohol-preferring and non-preferring rats. *Eur Neuropsychopharmacol* 2000;10:377–83.
- Richter RM, Zorrilla EP, Basso AM, Koob GF, Weiss F. Altered amygdalar CRF release and increased anxiety-like behavior in Sardinian alcohol-preferring rats: a microdialysis and behavioral study. *Alcohol Clin Exp Res* 2000;24:1765–72.
- Roberto M, Madamba SG, Moore SD, Tallent MK, Siggins GR. Ethanol increases GABAergic transmission at both pre- and postsynaptic sites in rat central amygdala neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 100 2003;2053–2058.
- Robertson JM, Harding S, Grupp LA. The reduction in alcohol intake produced by enalapril is not attenuated by centrally administered angiotensin inhibitors. *Alcohol* 1994;11(4):295-9.
- Roman E, Colombo G. Lower risk taking and exploratory behavior in alcohol-preferring sP rats than in alcohol non-preferring sNP rats in the multivariate concentric square field (MCSF) test. *Behav Brain Res* 2009;205:249–58.
- Saba L, Porcella A, Congeddu E, Colombo G, Peis M, Pistis M, et al. The R100Q mutation of the GABA-A-alpha-6 receptor subunit may contribute to voluntary aversion to ethanol in the sNP rat line. *Brain Res Mol Brain Res* 2001;87:263–70.
- Samson HH. Initiation of ethanol reinforcement using a sucrose-substitution procedure in food- and water-sated rats. *Alcohol Clin Exp Res* 1986;10:436–42.
- Sandi C, Borrell J, Guaza C. Enkephalins interfere with early phases of voluntary ethanol drinking. *Peptides* 1990;11:697–702.

- Schultz W. Multiple dopamine functions at different time courses. *Annu Rev Neurosci* 2007;30: 259–288.
- Simson PE, Criswell HE, Johnson KB, Hicks RE, Breese GR. Ethanol inhibits NMDA-evoked electrophysiological activity in vivo. *J Pharmacol Exp Ther* 1991;257(1):225-31.
- Sommer WH, Saavedra JM. Targeting brain angiotensin and corticotrophin-releasing hormone systems interaction for the treatment of mood and alcohol use disorders. *J Mol Med (Berl)* 2008;86(6):723-8.
- Stefanini E, Frau M, Garau MG, Garau B, Fadda F, Gessa GL. Alcohol-preferring rats have fewer dopamine D2 receptors in the limbic system. *Alcohol* 1992;27:127–30.
- Stein L. Effects and interactions of imipramine, chlorpromazine, reserpine, and amphetamine on self-stimulation: possible neurophysiological basis of depression. *Recent Adv Biol Psychiatry* 1962;4: 288–309.
- Tsutsumi M, Lasker JM, Shimizu M, Rosman AS, Lieber CS. The intralobular distribution of ethanol-inducible P450IIE1 in rat and human liver. *Hepatology* 1989;10(4):437-46.
- Vacca G, Serra S, Brunetti G, Carai AM, Gessa GL, Colombo G. Boosting effect of morphine on alcohol drinking is suppressed not only by naloxone but also by the cannabinoid CB1 receptor antagonist. *European Journal of Pharmacology* 2002;55– 59.
- Vinod KY, Maccioni P, Garcia-Gutierrez MS, Femenia T, Xie S, Carai MAM. Innate difference in the endocannabinoid signaling and its modulation by alcohol consumption in alcohol-preferring sP rats. *Addict Biol* 2012;17:62–75.
- Volkow ND, Wang GJ, Fowler JS, Franceschi D, Thanos PK, Wong C. Cocaine abusers show a blunted response to alcohol intoxication in limbic brainregions. *Life Sci* 2000;66:161–167.
- Weisinger RS, Blair-West JR, Burns P, Denton DA. Intracerebroventricular infusion of angiotensin II increases water and ethanol intake in rats. *American Journal of Physiology* 1999a;277:162–172.

- Weisinger RS, Blair-West JR, Denton DA, McBurnie MI. Angiotensin II stimulates intake of ethanol in C57BL/6J mice. *Physiol Behav* 1999b;67:369-76.
- Wright JW, Morseth SL, Abhold RH, Harding JW. Elevations in plasma angiotensin II with prolonged ethanol treatment in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 1986;24:813-8.
- Wright JW, Harding JW. Brain renin-angiotensin--a new look at an old system. *Prog Neurobiol.* 2011;95(1):49-67.
- Zhou Y, Colombo G, Carai MAM, Ho A, Gessa GL, Kreek MJ. Involvement of arginine vasopressin and V1b receptor in alcohol drinking in Sardinian alcohol-preferring rats. *Alcohol Clin Exp Res* 2011;35:1876–83.

## 7. EKLER

### Ek 1. Etik Kurul Onayı



MARMARA ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ  
HAYVAN DENeyLERİ ETİK KURULU  
PROJE ONAY FORMU

**PROJENİN ADI :** Anjiyotensin reseptör blokleri olan telmisartanın alkol bağımlılığı ve nökleus akömbere'de dopamin salınması üzerine etkisinin araştırılması.  
**PROJE YÜRÜTÜCÜSÜ :** Doç. Dr. Rezzan GÜLFAN  
**PROJEDEKİ ARASTIRICILAR :** Dr. Kadirhan TEZCAN  
**PROJENİN YÜRÜTÜLECEĞİ LABORATUVAR :** Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Fizyolojisi Ab.D.  
**ONAY TARİHİ VE ONAY SAYISI :** 23.09.2018 - 71.2018.mar

Sayın : Doç. Dr. Rezzan GÜLFAN

"Anjiyotensin reseptör blokleri olan telmisartanın alkol bağımlılığı ve nökleus akömbere'de dopamin salınması üzerine etkisinin araştırılması" isimli projemizin Hayvan Deneyleri Etik Kurulunun tarafınızdan incelenerek onaylanmıştır.  
Çalışmalarınızda başarılar dileriz.

Prof. Dr. Bernuk YEGEN  
Hayvan Deneyleri Etik Kurul  
Başkanı

Prof. Dr. Züfer GÖRİN

Prof. Dr. Gülsel ŞENER

Prof. Dr. Ayşen YARAT

Doç. Dr. Halil İbrahim İPE

Öğr. Gör. Dr. Gürkan SERT

Vet. Hek. Dilek ÖZBAYRAK

Av. Serkan DURAN

Av. Onur GİR

Kur: Deneylerin yapılmasına ilişkin ortaya çıkan acelikler, deney protokollerinde yapılmış herhangi bir değişiklik için, "Deney Hayvanları Anestezisi Üst. Kurulunun" bilgilendirilirdir. Bilgiye sunulduğunda, proje onay tarihli on emey ayıncı belirlenirdir. Araştırmacılar, proje ile ilgili bütün sorumluluklar, proje onay tarihine ve sonrası için kabul edilirdir.