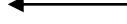


ABDURRAHMAN ASLAN

Adınızı soyadınızı giriniz



İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ SAĞ. BİL. ENST.

Tez kabul edildikten sonra yapılan **sabit ciltte sırt yazısı** bu şablona göre yazılacak. Yazılar tek satır olacak
Cilt sırtı yazıların yönü yukarıdan aşağıya
(sol yandaki gibi) olacak .



DOKTORA TEZİ

Tez, Yüksek Lisans'sa, YÜKSEK LİSANS TEZİ;
Doktora ise DOKTORA TEZİ ifadesi kalacak



İSTANBUL-2017

Tez Sınavının yapılacağı yılı yazınız



**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

(DOKTORA TEZİ)

**ZENGİNLEŞTİRİLMİŞ ÇEVRE, MEMANTİN VE
SKF82958'in SIÇANLARDA NALOKSON İLE
BAŞLATILAN MORFİN YOKSUNLUK SENDROMUNA
ETKİLERİ: HİPOKAMPAL DOKU PLAZMİNOJEN
AKTİVATÖRÜ mRNA DÜZEYLERİ**

ABDURRAHMAN ASLAN

**DANIŞMAN
PROF. DR. AYŞE PINAR YAMANTÜRK-ÇELİK**

**TIBBİ FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI
TIBBİ FARMAKOLOJİ VE KLİNİK FARMAKOLOJİ PROGRAMI**

İSTANBUL-2017

DOKTORA TEZİ ONAYI

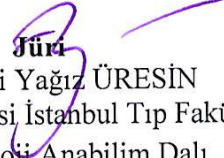
İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İstanbul Tıp Fakültesi, Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı, Tıbbi Farmakoloji ve Klinik Farmakoloji Programında Doktora öğrencisi Abdurrahman Aslan tarafından Prof. Dr. Ayşe Pınar Yamantürk-Çelik'in danışmanlığında hazırlanan "Zenginleştirilmiş çevre, memantin ve SKF82958'in sıçanlarda nalokson ile başlatılan morfin yoksunluk sendromuna etkileri: Hipokampal doku plazminojen aktivatörü mRNA düzeyleri" başlıklı tez aşağıdaki jüri üyeleri tarafından 11/07/2017 tarihinde yapılan Tez Savunma Sınavında başarılı bulunmuş ve Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.


Jüri Başkanı

Prof. Dr. Nurhan ENGİNAR
İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi
Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı


Jüri-Danışman

Prof. Dr. Ayşe Pınar YAMANTÜRK ÇELİK
İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi
Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı


Jüri

Prof. Dr. Ali Yağız ÜRESİN
İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi
Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı


Jüri

Prof. Dr. Asiye NURTEN
İstanbul Yeni Yüzyıl Üniversitesi Tıp Fakültesi
Fizyoloji Anabilim Dalı


Jüri

Doç. Dr. Hasan Raci YANANLI
Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı

BEYAN

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

Abdurrahman ASLAN

(İmza)



İTHAF

Sevgili Anneme ve Babama ithaf ediyorum.

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim boyunca, bana her zaman destek olan, gerek tezimin araştırma ve deneysel kısımlarında gerekse de yazım aşamasında, bilimsel temeller ışığında, etiği ve insan emeğine saygıyı ön planda tutarak bana engin bilgi ve tecrübeleriyle yol gösteren her koşulda desteğini hissettiğim, özverili hakkaniyetli ve etik duruşuyla kendime her zaman örnek almaktan gurur duyacağım değerli hocam, tez danışmanım Prof. Dr. Ayşe Pınar YAMANTÜRK-ÇELİK'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Yakın ilgi ve desteğiyle doktora eğitimimin ilk dönemlerinde bilgi birikimi ve tecrübesiyle beni motive ederek örnek olan Anabilim Dalı önceki başkanımız Prof Dr. Lütfiye EROĞLU'na, Anabilim Dalımızda verimli ve yaratıcı bir çalışma ortamı sağladığından dolayı Anabilim Dalı Başkanımız Prof Dr. A. Yağız ÜRESİN'e, eğitimim boyunca her zaman çalışmalarına yakın ilgi gösteren, bilgi ve deneyimlerinden faydalandığım değerli hocamız Prof.Dr. Nurhan ENGİNAR'a, Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalında emeği geçen, emekli olan tüm hocalarıma, Anabilim Dalı çalışanlarına, asistan ve öğrencilerine, çalışma arkadaşlarıma, en içten teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmamın genetik kısmı ilgili çalışmaları yapmak için Genetik Anabilim Dalının tüm olanaklarını kullanmama izin veren dönemin Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü Müdürü Prof. Dr. Uğur ÖZBEK'e, çalışmam süresince genetik Anabilim Dalındaki tüm çalışmalarımı yürütmeme yardımcı olan, projemizin genetik kısmını oluşturmada değerli fikirlerinden faydalandığım, tezin genetik kısımlarıyla ilgili desteğini esirgemeyen Dr. Özden HATIRNAZ NG'ye, yine mRNA tayininde bana çok yardımcı olan, tüm aşamalarda yanımda olan Moleküler Biyolog ve Genetik uzmanı Orçun TAŞAR'a, Deney hayvanları ile ilgili yardımlarından dolayı Aydın ÇEVİK'e, deney aşamalarında yardımlarını esirgemeyen Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı personeli Tuncay AŞKIN'a,, son olarak her zaman yanımda oldukları ve her konuda beni destekledikleri için sevgili aileme, arkadaşlarıma gönülden teşekkürler.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 1338



İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	İİ
BEYAN.....	İİİ
İTHAF.....	İV
TEŞEKKÜR.....	V
İÇİNDEKİLER	Vİİ
TABLolar LİSTESİ.....	İX
ŞEKİLLER LİSTESİ	X
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	Xİİİ
ÖZET	XV
ABSTRACT.....	XVİ
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. İlaç/Madde Bağımlılığı ve Tutkunluğu.....	3
2.1.1. Tanımlar	3
2.1.2. Bağımlılık ve Tutkunluk Gelişimi	4
2.1.3. İlaç/madde Bağımlılığı ve Tutkunluğu Mekanizmaları	4
2.2. Yoksunluk Sendromu.....	5
2.3. Dopaminerjik Sistem ve Madde Bağımlılığı	6
2.4. Glutamaterjik Sistem ve Madde Bağımlılığı	7
2.5. Sinaptik Plastisite ve Madde Bağımlılığı.....	8
2.6. Zenginleştirilmiş çevre.....	9
2.7. Doku plazminojen aktivatörü.....	10
2.8. Hipokampus	10
2.9. Morfin Yoksunluk Sendromu Deneysel Modeli.....	12
2.10. Morfin	12
2.11. Memantin	13
2.12. SKF82958	16
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	18
3.1. Deney Hayvanları	18
3.2. Deneylerin Yürütüldüğü Yer	18

3.3. Deney Maddeleri.....	18
3.3.1. Deney hayvanlarına uygulanan maddeler	18
3.3.2. Analizlerde kullanılan maddeler	18
3.4. Kullanılan Cihazlar	20
3.5. Morfin Bağımlılığı ve Yoksunluğu Oluşturulması	21
3.6. Sinaptik Plastisite Gelişimi: Zenginleştirilmiş Çevre	21
3.7. Deney Grupları ve İşlemler.....	22
3.8. Hipokampal Doku Plazminojen Aktivatörü mRNA Tayini.....	24
3.8.1. RNA İzolasyonu.....	24
3.8.2. cDNA Sentezi	25
3.8.3. Kantitatif Eş-zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)	26
3.9. İstatistiksel Analiz.....	28
4. BULGULAR.....	29
4.1. Standart çevre morfin ve plasebo grupları	29
4.2. Zenginleştirilmiş çevre nalokson ile uyarılmış morfin yoksunluk sendromu.....	34
4.3. Standart çevre ve zenginleştirilmiş çevre morfin yoksunluk sendromu karşılaştırılması.....	37
4.4. Standart çevrede memantin uygulanmış nalokson ile uyarılmış morfin yoksunluk sendromunun davranış parametreleri üzerine SKF82958'in etkisi.....	45
5. TARTIŞMA	48
5.1. SONUÇ	53
6. KAYNAKLAR	55
ETİK KURUL KARARI	71
ÖZGEÇMİŞ	72

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 3-1: Analizlerde kullanılan tampon ve çözeltiler	19
Tablo 3-2: Deneylerde ve analizlerde kullanılan cihazlar ve laboratuvar malzemesi	20
Tablo 3-3: Nalokson ile başlatılan morfin yoksunluk sendromu izlem formu	21
Tablo 3-4: Deney grupları ve işlemler	24
Tablo 3-5: cDNA Sentezinde kullanılan karışımın içeriği.	26
Tablo 4-1: Standart çevre morfin pellet uygulamasının 72 saat sonunda davranış üzerine etkileri.	29
Tablo 4-2: Standart çevrede nalokson ile uyarılmış morfin yoksunluk sendromunun plaseboya kıyasla davranış parametreleri üzerine etkisi.	31
Tablo 4-3: Zenginleştirilmiş çevrede nalokson ile uyarılmış morfin yoksunluk sendromunun plaseboya göre davranış parametreleri üzerine etkisi.	34
Tablo 4-4: Zenginleştirilmiş çevrenin standart çevre grubu ile karşılaştırarak nalokson ile uyarılmış morfin yoksunluk sendromu davranış parametreleri üzerine etkisi.	37
Tablo 4-5: Standart çevrede nalokson ile uyarılmış morfin yoksunluk sendromunun davranış parametreleri üzerine memantin (10 mg/kg, i.p.) etkisi.	46
Tablo 4-6: Standart çevrede nalokson ile uyarılmış morfin yoksunluk sendromunun davranış parametreleri üzerine SKF82958'in (1 mg/kg, i.p.) etkisi.	43
Tablo 4-7: Standart çevrede, memantin (10 mg/kg, i.p.) uygulanmış nalokson ile uyarılmış morfin yoksunluk sendromunun davranış parametreleri üzerine SKF82958'in (1 mg/kg, i.p.) etkisi.	46

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1: Dopaminerjik sinaps (Djang ve ark. 2012'den).	6
Şekil 2-2: Glutamaterjik sinaps (Popoli ve ark. 2011'den).	8
Şekil 2-3: Rodent beyinde hipokampus yerleşimi (Spijker 2011'den).	11
Şekil 2-4: Morfinin moleküler yapısı (Crow 2017'den).....	13
Şekil 2-5: Memantin kimyasal yapısı (Parsons ve ark. 1999'dan)	14
Şekil 2-6: NMDA reseptörü üzerinde memantin ve çeşitli ligand bağlanma bölgeleri (Ghasemi ve Schachter 2011'den).	15
Şekil 2-7: Benzazepinlerin kimyasal yapısı (Lee ve ark. 2014'den)	16
Şekil 2-8: Dopaminerjik D1 ve D2 reseptör yapısı (Pandey ve ark. 2013'den)	17
Şekil 3-1: Deneylede kullanılan zenginleştirilmiş çevre kafesi	22
Şekil 3-2: RNA izolasyon protokolü akış şeması (Qiagen RNeasy Lipid Tissue kiti protokolü).....	25
Şekil 3-3: Kilitlenmiş nükleik asit yapısı ve DNA ve RNA ile karşılaştırılması (Universal Prob Library, UPL)	26
Şekil 3-4: Çalışmada kullanılan plazminojen aktivatör genine ait primer ve prob yerleşimlerinin gösterimi (Universal Prob Library, UPL), 55 no'lu UPL prob Plat geni çalışması için tasarlanan primer ile kullanılmıştır.	27
Şekil 3-5: Kantitatif Eş-zamanlı PZR'de Ct Gösterimi. Referans gen amplifikasyon eğrileri (Kırmızı çizgi, eşik değeri; Ct, amplifikasyon ürününün eşik değeri geçtiği ilk döngü sayısı).	28
Şekil 4-1: Morfin pelet uygulanan SÇ'deki sıçanlarda 72 saat sonunda plaseboya kıyasla lokomotor aktivite derecesi.....	29
Şekil 4-2: Morfin pelet uygulanan SÇ'deki sıçanlarda 72 saat sonunda plaseboya göre diyare görülme derecesi.	30
Şekil 4-3: Morfin pelet uygulanan SÇ'deki sıçanlarda 72 saat sonunda yapılan 15 dakika izlem sırasında plaseboya kıyasla vücut ağırlığı kaybı.	30
Şekil 4-4: SÇ'deki sıçanlara morfin pelet uygulamasının 72 saat sonunda plaseboya kıyasla hipokampus dPA göreceli PLAT % mRNA düzeyi üzerine etkisi.....	31

Şekil 4-5: Standart çevrede nalokson ile uyarılmış morfin yoksunluk sendromunun plaseboya kıyasla lokomotor aktivite üzerine etkisi. *P=0.0001 (Mann Whitney U test)	32
Şekil 4-6: Standart çevrede nalokson ile uyarılmış morfin yoksunluk sendromunda plaseboya kıyasla diyare derecesi. *P=0.0041 (Mann Whitney U test)	32
Şekil 4-7: Standart çevrede nalokson ile uyarılmış morfin yoksunluk sendromunda plaseboya kıyasla vücut ağırlığı kaybı. *P=0.0015 (Student'in t testi)	33
Şekil 4-8: Standart çevrede nalokson ile uyarılmış morfin yoksunluk sendromunun plaseboya kıyasla hipokampus dPA göreceli PLAT % mRNA düzeyi üzerine etkisi. *P=0.0205 (Student'in t testi)	33
Şekil 4-9: Zenginleştirilmiş çevrede nalokson ile uyarılmış morfin yoksunluk sendromunda plaseboya kıyasla lokomotor aktivite derecesi. *P=0.0317 (Mann Whitney U test)	35
Şekil 4-10: Zenginleştirilmiş çevrede nalokson ile uyarılmış morfin yoksunluk sendromunda plaseboya kıyasla diyare derecesi. *P=0.0476 (Mann Whitney U test) ..	35
Şekil 4-11: Zenginleştirilmiş çevrede nalokson ile uyarılmış morfin yoksunluk sendromunda plaseboya kıyasla vücut ağırlığı kaybı. *P=0.0118 (Student'in t testi)	36
Şekil 4-12: Zenginleştirilmiş çevrede nalokson ile uyarılmış morfin yoksunluk sendromunun plaseboya kıyasla hipokampus dPA göreceli PLAT % mRNA düzeyi üzerine etkisi.	36
Şekil 4-13: Zenginleştirilmiş çevrenin nalokson ile uyarılmış morfin yoksunluk sendromunda SÇ grubu ile karşılaştırarak lokomotor aktivite parametreleri üzerine etkisi.	38
Şekil 4-14: Zenginleştirilmiş çevrenin nalokson ile uyarılmış morfin yoksunluk sendromunda SÇ grubu ile karşılaştırarak diyare üzerine etkisi.	38
Şekil 4-15: Zenginleştirilmiş çevrenin nalokson ile uyarılmış morfin yoksunluk sendromunda SÇ grubu ile karşılaştırarak vücut ağırlığı kaybı üzerine etkisi.	39
Şekil 4-16: Zenginleştirilmiş çevrenin nalokson ile uyarılmış morfin yoksunluk sendromunda SÇ grubu ile karşılaştırarak hipokampus dPA göreceli PLAT % mRNA düzeyi üzerine etkisi.	39
Şekil 4-17: Standart çevrede nalokson ile uyarılmış morfin yoksunluk sendromunda lokomotor aktivite üzerine memantin (10 mg/kg, i.p.) etkisi.	41

Şekil 4-18: Standart çevrede nalokson ile uyarılmış morfin yoksunluk sendromunda diyare üzerine memantin (10 mg/kg, i.p.) etkisi. *P=0.0004 (Mann Whitney U test).	41
Şekil 4-19: Standart çevrede nalokson ile uyarılmış morfin yoksunluk sendromunda vücut ağırlığı kaybı üzerine memantin (10 mg/kg, i.p.) etkisi. *P=0.0046 (Student'in t testi)	42
Şekil 4-20: Standart çevrede nalokson ile uyarılmış morfin yoksunluk sendromunda hipokampus tPA göreceli PLAT % mRNA düzeyi üzerine memantin (10 mg/kg, i.p.) etkisi. Standart çevrede morfin yoksunluk sendromu üzerine SKF82958'in etkisi	42
Şekil 4-21: Standart çevrede nalokson ile uyarılmış morfin yoksunluk sendromunda lokomotor aktivite üzerine SKF82958'in (1 mg/kg, i.p.) etkisi.....	44
Şekil 4-22: Standart çevrede nalokson ile uyarılmış morfin yoksunluk sendromunda diyare üzerine SKF82958'in (1 mg/kg, i.p.) etkisi. *P=0.0364 (Mann Whitney U test)	44
Şekil 4-23: Standart çevrede nalokson ile uyarılmış morfin yoksunluk sendromunda vücut ağırlığı kaybı üzerine SKF82958'in (1 mg/kg, i.p.) etkisi. *P=0.0381 (Student'in t testi)	44
Şekil 4-24: Standart çevrede nalokson ile uyarılmış morfin yoksunluk sendromunda hipokampus dPA göreceli PLAT % mRNA düzeyi üzerine SKF82958'in (1 mg/kg, i.p.) etkisi.....	45
Şekil 4-25: Standart çevrede, memantin (10 mg/kg, i.p.) uygulanmış nalokson ile uyarılmış morfin yoksunluk sendromunun lokomotor aktivite düzeyi üzerine SKF82958'in (1 mg/kg, i.p.) etkisi. *P=0.0057 (Mann Whitney U test).....	46
Şekil 4-26: Standart çevrede, memantin (10 mg/kg, i.p.) uygulanmış nalokson ile uyarılmış morfin yoksunluk sendromunun diyare düzeyi üzerine SKF82958'in (1 mg/kg, i.p.) etkisi. *P=0.0083 (Mann Whitney U test)	46
Şekil 4-27: Standart çevrede, memantin (10 mg/kg, i.p.) uygulanmış nalokson ile uyarılmış morfin yoksunluk sendromunun vücut ağırlığı kaybı düzeyi üzerine SKF82958'in (1 mg/kg, i.p.) etkisi. *P=0.0046 (Student'in t testi)	47
Şekil 4-28: Standart çevrede, memantin (10 mg/kg, i.p.) uygulanmış nalokson ile uyarılmış morfin yoksunluk sendromunun hipokampus dPA göreceli PLAT % mRNA düzeyi üzerine SKF82958'in (1 mg/kg, i.p.) etkisi.....	47

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

WHO	: Dünya Sağlık Örgütü
SÇ	: Standart Çevre
ZÇ	: Zenginleştirilmiş Çevre
dPA	: Doku plazminojen aktivatörü
NAc	: Nukleus Akumbens
NMDA	: N-metil-D-aspartatik asit
PLA	: Plasebo
PZR	: Kantitatif Eş-zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu
SF	: Serum Fizyolojik
MEM	: Memantin
MOR	: Morfin
SKF82958	: (±)-6-Chloro-7,8-dihydroxy-3-allyl-1-phenyl-2,3,4,5-tetrahydro-1H-3-benzazepine hydrobromide
DOPA	: 3,4 Dihidroksifenilalanin
AMPA	: α -amino-3-hidroksi-5-metil-4-izoksazolepropionik asit
MK-801	: Dizosilpin
LTP	: Uzun Süreli Potansiyasyon
LTD	: Uzun Süreli Depresyon
CaMKII	: Kalmudolin kenetli protein kinaz-2
EDTA	: Etilen Diamin Tetra Asetikasit
GABA	: Gama Aminobütirik Asit
cAMP	: Siklik Adenozin Monofosfat
μ	: Mü
i.p.	: Periton içi

DNA	: Deoksiribo Nükleik Asit
DNase-I	: Deoksiribonükleaz
RNA	: Ribo Nükleik Asit
mRNA	: Mesajcı Ribo Nükleik Asit
cDNA	: Komplementer DNA
cRNA	: Komplementer RNA
(RT)-PZR	: Ters Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu
FCS	: Fetal Sığır Serumı
UPL	: Universal Prob Kütüphanesi
PBS	: Fosfat Salin Çözeltisi
PLA	: Yakınsal Bağlanma Tespiti
Ct	: Eşik Döngüsü (<i>Threshold Cycle</i>)
miRNA	: Mikro RNA
siRNA	: Küçük interfere RNA
3'UTR	: 3' transle edilmemiş bölge

ÖZET

Aslan, A. (2017). Zenginleştirilmiş çevre, memantin ve SKF82958'in sıçanlarda nalokson ile başlatılan morfin yoksunluk sendromuna etkileri: Hipokampal doku plazminojen aktivatörü mRNA düzeyleri. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı. Doktora Tezi. İstanbul.

Bu çalışma, morfin bağımlılığı nörobiyolojisinde glutamaterjik, dopaminerjik sistemlerin ve hipokampus doku plazminojen aktivatörü (dPA)'nın rollerini ve olası etkileşimlerini incelemek üzere tasarlandı. Wistar Albino erkek sıçanların bazıları standart çevre (SÇ)'de bazıları ise sinaptik plastisite gelişimi için zenginleştirilmiş çevre (ZÇ)'de bir ay süre ile tutuldu. Sonra tümünün sırt derileri altına morfin (150 mg) ya da plasebo peletleri yerleştirildi. Pelet yerleşiminden 72 saat sonra hayvanların bir kısmına serum fizyolojik bir kısmına opioid-reseptör antagonisti nalokson (1 mg/kg, i.p.) uygulandı. SÇ hayvanlarından bir gruba nalokson uygulaması öncesi glutamaterjik reseptör alt tiplerinden N-metil-D-aspartik asit reseptör antagonisti memantin (10 mg/kg i.p.), bir kısmına dopamine D1-reseptör agonisti SKF82958 (1 mg/kg, i.p.) ve memantin öncesi SKF82958 uygulandı. Her bir hayvan, nalokson enjeksiyonundan sonra 15 dakika boyunca yoksunluk sendromu parametreleri için izlendi. İzleme sonrası hayvanlar dekapite edilerek çıkartılan beyinlerinden hipokampusları, sinaptik plastisite göstergelerinden biri olarak düşünülen dPA'nın mRNA analizi için ayrıldı. ZÇ grubunda, yoksunluk belirtilerinden sıçrama, diş gıcırdatma, diyare, lokomotor aktivite artışı ve vücut ağırlığı kaybı istatistiksel anlamlı olmaksızın daha fazla gelişti. Hipokampus dPA mRNA, SÇ yoksunluk grubunda plasebo grubuna göre anlamlı olarak daha düşük saptanırken, ZÇ yoksunluk grubuna yakın bulundu. Yoksunluk belirtilerinden diş gıcırdatma, ptozis, diyare ve vücut ağırlığı kaybını istatistiksel anlamlı olarak memantin azalttı, SKF82958 sıçrama ve ptozisi azaltırken diyare ve kilo kaybını artırdı, memantin etkilerini ise geri çevirdi. Bulgular, glutamaterjik ve dopaminerjik sistemlerin morfin bağımlılık mekanizmalarında birbirleri ile etkileşimli olarak önemli rolleri olabileceğini düşündürmekte, bağımlılık gelişiminde hipokampus dPA'nın bu sistemlerle etkileşiminin ileri çalışmalarla araştırılması gerektiğine işaret etmektedir.

Anahtar Kelimeler: morfin bağımlılığı, memantin, SKF82958, zenginleştirilmiş çevre, doku plazminojen aktivatörü

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 1338

ABSTRACT

Aslan, A. (2017). Effects of enriched environment, memantine and SKF82958 on naloxone precipitated morphine abstinence syndrome in rats: Hippocampal tissue plasminogen activator mRNA levels. İstanbul University, Institute of Health Science, İstanbul Faculty of Medicine, Department of Medical Pharmacology, Doctoral Thesis. İstanbul.

This study was designed to investigate involvement of glutamatergic, dopaminergic systems and hippocampal tissue-plasminogen-activator (tPA) with possible interactive roles in neurobiology of morphine dependence. For this purpose, some male Wistar Albino rats were kept in standard-environment (SE) and some in enriched-environment (EE) to induce synaptic-plasticity for one month. Then, rats were implanted subcutaneously with either morphine (150 mg) or placebo pellets. Seventy-two hours after this, opioid-receptor antagonist naloxone (1 mg/kg, i.p.) was administered to precipitate abstinence syndrome. In divided groups, saline, memantine (10 mg/kg i.p.) an antagonist of N-methyl-D-aspartic acid class of glutamatergic receptor-subtype, dopamine D1-receptor agonist SKF82958 (1 mg/kg, i.p.) or memantine pre-treated SKF82958 were administered prior to naloxone administration. Then, signs of morphine-abstinence of rats taken individually to observation cage were recorded for 15 minutes. Immediately after, animals were decapitated and hippocampi of them were removed for the analysis of mRNA of tPA which was deemed to be one of the synaptic plasticity indicators. Jumping, teeth-chattering, diarrhea, locomotor activity and weight loss increased without statistical significance in the EE group. Hippocampal tPA mRNA was found to be significantly lower in SE-abstinence group than in placebo group, but close to EE-abstinence group. Memantine decreased teeth-chattering, ptosis, diarrhea, and weight loss significantly. SKF82958 increased diarrhea and weight loss while decreasing jumping and ptosis, and reversed the effects of memantine. Findings suggest that in morphine dependence mechanisms, glutamatergic and dopaminergic systems may have important interactions with each other and the interaction of tPA with these systems should be further investigated.

Key Words: morphine dependence, memantine, SKF82958, enriched environment, tPA

The present work was supported by the Research Fund of İstanbul University. Project No. 1338

1. GİRİŞ VE AMAÇ

İlaç/madde bağımlılığı ve tutkunluğu, bağımlı bireyleri ilgilendiren olumsuz etkileri yanında tüm dünyada sosyal ve ekonomik yönleri ile ciddi bir toplumsal sorundur. Bağımlılığa neden olan ilaç ya da maddeler çok çeşitli olup, oluşturdukları bağımlılığın psikolojik ve/veya fiziksel olması, oluşma koşulları, gelişme süresi, şiddeti, yoksunluk belirtileri gibi özellikleri benzerlik ve farklılıklar taşımaktadır. Günümüzde ilaç ya da madde bağımlılığı ve tutkunluğu tedavisinin başarısı ilaç ya da maddeye göre değişmekte, morfin bağımlılığı ve tutkunluğu gibi güçlü olanların tedavi başarı oranı düşük kalmaktadır. Morfinin, nökslerle (relaps) seyreden tutkunluğun eşlik ettiği fiziksel bağımlılığının henüz radikal bir tedavisi bulunmamakta, mevcut davranış tedavisi ve farmakolojik yaklaşımlar tek başına ya da birlikte yeterli tedavi başarısı sağlamamaktadır (Bart 2012; Lüscher 2015 pp. 552-566).

İlaç ya da madde bağımlılığına neden olan mekanizmalar yoğun olarak araştırılmasına rağmen tam olarak anlaşılamamıştır. Madde bağımlısı kişilerin sıklıkla nikotin, morfin, alkol gibi birden fazla maddeyi aynı anda ya da birbirinin yerine kullanması, bu bağımlılık türlerinin biyolojik zemininin ortak mekanizma ya da mekanizmalara dayandığı düşüncesine yol açmıştır. Son yıllarda, bu düşüncenin geçerliliğine dair kanıtlar giderek güçlenmektedir. Bunlardan biri, bağımlılık yapıcı maddelerin etkisi altında beyinde dopamin salıverilmesinde artışın saptanmasıdır. Böylelikle mezolimbik dopaminerjik ödül yolağının etkinleşmesi bağımlılık gelişiminde gerekli olabilir (Wise 1989; Lüscher 2015 pp. 552-566). Diğer yandan, öğrenme-bellek işlevinin önemli bir bileşeni olduğu düşünülen sinaptik plastisite patolojik olarak gelişerek bağımlılığın yerleşmesinden sorumlu bulunmaktadır. Bağımlılık yapıcı maddeye kronik maruziyet sonucu gelişen nöroadaptif değişikliklerin, sinaptik plastisite ile ilişkili olduğu gösterilmektedir (Nestler 2001; Everitt ve Wolf 2002; Jones ve Bonci 2005).

Bağımlılık türleri arasında morfin bağımlılığı, yaygınlığı ve ciddi sonuçları ile önemli bir araştırma alanıdır. Morfin bağımlılığı gelişiminde dopaminerjik sistem yanında öğrenme-bellek ile de ilişkili olan glutamaterjik sistemin rolünün varlığı

varsayımı giderek güçlenmiştir (Koyuncuoğlu ve ark. 1992; Trujillo ve Akil 1994; Chartoff ve ark. 2003). Ancak, morfin bağımlılığının biyolojik zemini ile bu sistemlerin ilintisi tüm yönleri ile aydınlığa kavuşmamıştır ve morfin bağımlılığı sürecinde glutamaterjik ve dopaminerjik iki temel mekanizmanın arasındaki etkileşim de yeterli bilinmemektedir.

Son yıllarda, sinaptik plastisitede rol oynadığı saptanan doku plazminojen aktivatörünün (dPA) (Samson ve Medcalf 2006), madde bağımlılığı gelişiminde de rolü olabileceği düşünülmektedir (Nagai ve ark. 2004; Yamada ve ark. 2005). Doku plazminojen aktivatörünü morfinin de indüklediği bildirilmiş ve morfin yoksunlukta hipokampusta sinaptik değişimler (Zhong ve ark. 2006) saptanmıştır. Öte yandan, deneysel modellerde zenginleştirilmiş çevrenin, sinaptik plastisite gibi nöral (Kempermann ve ark. 1997; Rema ve ark. 2006) ve öğrenme-bellek performansı artışı gibi davranışsal (Rampon ve ark. 2000) değişiklikler oluşturduğu bilinmektedir.

Tümü birlikte değerlendirildiğinde, morfine karşı gelişen bağımlılığın mekanizmalarının henüz yeterli aydınlatılamadığı ve morfin bağımlılığı tedavisinin başarısının istenen düzeyde olmadığını görülmektedir. Bu tez projesi ile morfin bağımlılığı gelişim mekanizmalarında, glutamaterjik ve dopaminerjik sistemlerin ayrı ayrı ve birlikte rolleri, öğrenme-belleğin önemli beyin merkezlerinden hipokampüste olası dPA ilişkili sinaptik plastisitenin yerinin değerlendirildiği bir zeminde araştırılması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. İlaç/Madde Bağımlılığı ve Tutkunluğu

2.1.1. Tanımlar

Tedavi amaçlı verilen bazı ilaçların yinelenen kullanımı ile beyinde gelişen uyum yanıtı (nöroplastik değişiklikler) sonucu sıklıkla bağımlılık (fiziksel bağımlılık), ender olarak da kontrol dışı ilaç kullanımına yol açan kompulsif bir davranış (psikolojik bağımlılık) gelişmektedir (O'Brien 2011 pp. 649-668; Lüscher 2015 pp. 552-566). Uzun süre kavram kargaşası yaşanmış ve bu iki durum farklılık gözetilmeden birbirinin yerine kullanılan bağımlılık ve adiksiyon sözcükleri ile ifade edilmiştir. Adiksiyon, kendini bir şeye teslim etme anlamındaki Latince “ad dicere” sözcüğünden türetilen ve dilimize tutkunluk olarak çevrilen bir deyimdir (Kayaalp ve Uzbay 2012 pp. 846-868). Oysa, bağımlılık (fiziksel bağımlılık), giderek daha yüksek dozlarda beklenen etkinin elde edilebildiği (tolerans) durumu izleyerek, ilacın yokluğunda bazı klinik belirtilerin oluşması ile karakterizedir. Tolerans gelişimi ile birlikte genellikle fiziksel bağımlılık da oluşmaktadır (Kalant 2007 pp. 236-251).

Uzun süre beta-bloker ya da kortikosteroid kullanımı sonrası aniden ilaç kesilmesi ile de ciddi yoksunluk belirtileri gelişmektedir. Bu nedenle, tıbbi amaçlarla kullanılan bazı ilaçlara karşı gelişebilen bu durum, normal fizyolojik işlevlerin devamı için yeniden ilacın alınmasını gerektirmekte, yavaşça ilacın kesilmesi ile yapılan tedaviye iyi yanıt vermektedir (O'Brien 2011 pp. 649-668). Bağımlılık (fiziksel bağımlılık), psikoaktif (morfin, etanol, kokain, nikotin, vb.) maddeler dışında psikoaktif olmayan maddelere (nitratlar, semptomimetik vazokonstriktör ve bronkodilatör ilaçlar gibi) karşı da santral sinir sistemi dışı hedef sistemlerine özgü klinik özellikler ile gelişebilmekte iken adiksiyon/tutkunluk sadece psikoaktif bazı ilaç/maddelere karşı gelişmektedir (Lüscher 2015 pp. 552-566). Öte yandan, tedavi amaçlı kullanılan ilaç psikoaktif olsa da çoğu hasta ilacı yeniden kullanmayı arzu etmemekte, ilacı aramamaktadır.

Amerikan Psikiyatri Derneği çalışma grubunda önceleri küçültücü bir ifade olabileceği için tutkunluk yerine bağımlılığın kullanılması önerilmiş, bu öneri kabul edilmiş fakat daha sonra kontrol dışı ilaç/madde kullanımını tutkunluk (adiksiyon)

olarak ifade etme kararı alınmıştır (O'Brien 2011). Zira, kavram karışıklığı sonucu oluşan çekincelerle ağırlı hastaların yeterli opioid uygulamasından yoksun kalmaları gibi olumsuz sonuçlar yaşanmıştır. Kötüye kullanım (abuse) söylemi ise ilaç kullanımı ve ilaç tutkunluğu arasında bir durumu destekleyen veriler olmadığından aynı dönemde dışlanmıştır. Tutkunluk, tıbbi amaçlar dışında bazı ilaçların (kötüye) kullanımı sonucu ya da bazı maddelerin kullanımı ile daha sık gelişmekte ve tedavi başarısı oldukça düşük oranda kalmaktadır.

Bir ilaç/maddeye adiksiyon/tutkunluğun (psikolojik bağımlılık) eşlik etmediği bağımlılık (fiziksel bağımlılık) olabilirken, bazı kişilerde hem bağımlılık ve hem de adiksiyon/tutkunluk gelişebilmektedir.

2.1.2. Bağımlılık ve Tutkunluk Gelişimi

Tutkunluğun eşlik ettiği ilaç/madde bağımlılığı, olumsuz sonuçlarına rağmen sürekli yeniden ilgili ilaç/maddenin alımları ile nükseden ciddi sağlık sorunları ve sosyal sorunlara yol açan karmaşık bir durumdur. Biyolojik ve çevresel değişkenlerin etkileşimleri tutkunluğa giden yolu oluşturmaktadır (Leshner 1997) ancak bu etkileşim mekanizmaları iyi bilinmemektedir. Genel olarak bu tür ilaç ya da maddelerin keyif verici, güçlü hissettirici (öforik) ve kaygı giderici etkileri vardır. Bağımlılık yapan maddelerin, bu etkilerle pozitif pekiştiri etki zemininde beyin ödül sistemini etkinleştirerek bağımlılığı geliştirdiği düşünülmektedir (Wise ve Bozarth, 1987; Nesse ve Berridge 1997). Başlangıçta ilaç/maddelerin kullanımı bu öforik ve kaygı giderici özellikleri nedeni ile gerçekleşmektedir. Ancak bu maddeler kendi özelliklerine ve kişinin yatkınlığına göre değişebilen bir sürede kişide maddeye karşı şiddetli bir istek oluşturmaya başlarlar. Böyle impulsif olarak başlayan daha sonra madde alımının kontrol edilemediği kompulsif hale dönüşen bir süreç söz konusudur (Koob ve Le Moal 2001). İmpulsif etkiler “iyi” olan durumun tekrar yaşanmak istenmesi ile kişinin madde alımını pozitif şekilde pekiştirmektedir. Diğer yandan, maddenin vücuttan atılımı ile etkilerinin kaybolması sonucu gelişen yoksunluk belirtilerinin yaşanmak istenmemesine karşılık da kompulsif etki negatif pekiştiri oluşturmaktadır. Bu süreç ilaç/maddenin bağımlılığını güçlendirmektedir.

2.1.3. İlaç/madde Bağımlılığı ve Tutkunluğu Mekanizmaları

Çeşitli ilaç ya da maddelere karşı gelişen bağımlılıkta beyinde ortak mekanizmaların sorumlu olabileceğini düşündüren kanıtlar çokça bulunmaktadır. Bu

kanıtlardan biri bağımlı kişilerin tutkun oldukları maddeleri bulamadıklarında diğer bağımlılık yapıcı maddeleri kullanmalarındır (Collins ve ark. 1988; Burton ve Tiffany 1997). Morfin, amfetamin, nikotin, kokain ve tetrahidrokanabinol gibi bağımlılık ve tutkunluk oluşturan maddeler, ödüllendirici ve pekiştirici etkileri ile beyin ödül sisteminden dopamin salıverilmesinin artmasına yol açmaktadır (Adinoff 2004). Ödül, beyinde olumlu ve ulaşılması gereken bir şey olarak algılanan bir uyarı iken pekiştirici uyarı yinelenen davranışlara yol açabilmektedir ve her zaman ödüllendirici değildir (Nestler ve ark. 2009 pp. 364-388). Fazla dopamin salıverilmesi, maddenin kronik alımı sonrası ve yoksunluk sırasında kaybolmakta tersine dopaminerjik sistem etkinliği belirgin olarak azalmaktadır (Adinoff 2004; Radke ve Gewirtz 2012).

Psikoaktif tutkunluğa yol açan ilaçların etkilediği beyin ödül yolları, normal olarak yaşamsal ve üreme için gerekli bir sistemdir. Yiyecek, su ve cinsel temas gibi doğal pekiştiricilere ilişkin davranışları yönetmektedir (Nestler ve ark. 2009 pp. 364-388). Beyin doğal ve doğal olmayan uyarıyı ayıramamaktadır, ayrıca doğal olmayan tutkunluğa yola açan maddelerin uyarıcı etkisi daha güçlü bulunmaktadır. Kompulsif ilaç ya da madde arayışı böylelikle gelişmektedir.

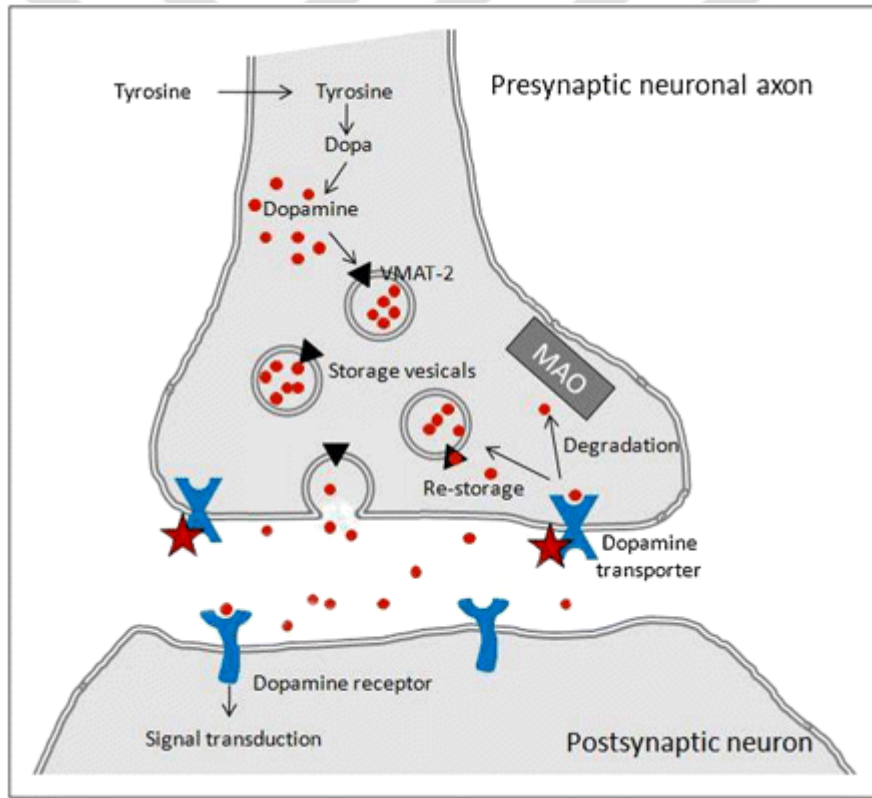
2.2. Yoksunluk Sendromu

Dünya Sağlık Örgütü'nün tanımına göre (WHO), yoksunluk sendromu, genellikle uzun bir süre ve /veya yüksek dozlarda yinelenen şekilde alınan bir psikoaktif maddenin kullanımının kesilmesi veya azaltılması üzerine ortaya çıkan şiddet derecesi maddeye göre değişkenlik gösteren semptomlar grubudur. Yoksunluk sendromu, madde ya da ilaç bağımlılığının geliştiğinin göstergesidir.

Yoksunluk sendromunun şiddeti, bağımlılık yapan maddeye göre hafiften, yaşamı tehdit edici düzeye farklı olabilmektedir. Bağımlılık yapıcı madde ya da ilacın yinelenen uygulaması ile etkileri, beyinde normal işlevlerin sürdürülebilmesi için telafi mekanizmaları tarafından karşılanmaktadır. Madde ya da ilacın santral sinir sistemini uyarıcı ya da baskılayıcı etkili olmasına göre etkinin zıttı mekanizmalar telafi mekanizması olarak gelişmektedir. Madde ya da ilacın yoksunluğunda ise bu telafi mekanizmaları yoksunluk sendromunu, ilgili madde ya da ilaca özgü olarak oluşturmaktadır. Yoksunluk sendromunun belirtileri önce yoğun olarak ortaya çıkar, daha sonra şiddeti azalarak kaybolur. Dolayısı ile geriye dönüşümlü fizyolojik bir süreçtir (Kalant ve Grupp 2007 pp. 945-958).

2.3. Dopaminerjik Sistem ve Madde Bağımlılığı

Tirozinden sentezlenen dopamin (3-hidroksitriptamin), katekolamin nörotransmitterler arasında beyinde en yaygın bulunandır. Tirozin, tirozin hidroksilaz enzimi ile 3,4-dihidroksifenilalanin (DOPA)'e dönüşmekte, DOPA da dopamin dekarboksilaz enzimi aracılığı ile dopamine dönüşmektedir (Şekil 2-1). Dopaminin etki sonlanması metabolik ve geri-alım mekanizmaları ile gerçekleşmektedir (Sanders-Bush ve Hazelwood 2011 pp. 335-361). Dopaminerjik reseptörlerden D1, D4, D5 postsinaptik yerleşimli iken D2 ve D3 presinaptik ve postsinaptik yerleşimlidir. Sinyal ileti yollarında cAMP rol almaktadır.



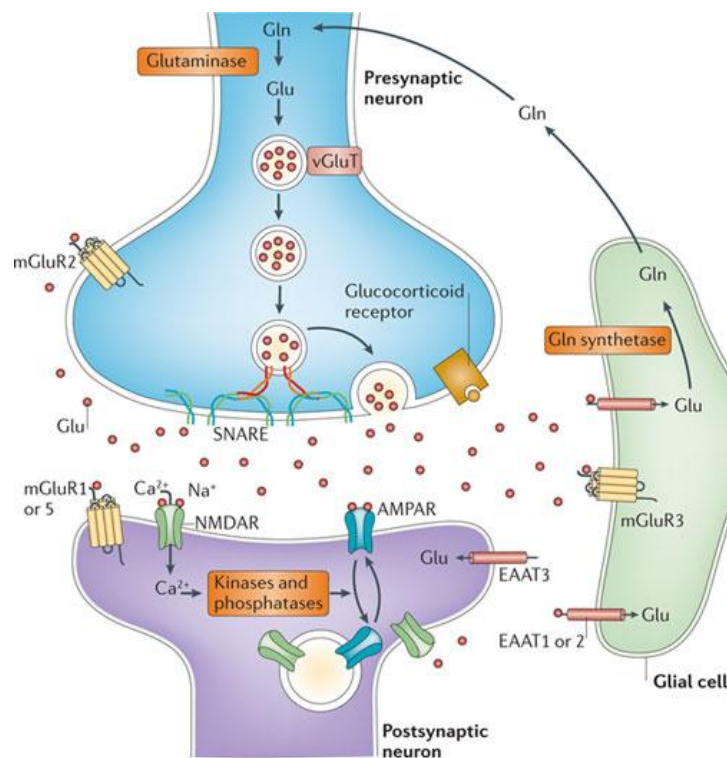
Şekil 2-1: Dopaminerjik sinaps (Djang ve ark. 2012'den).

Substantia nigra'dan bazal gangliyonlara uzanan nigrostriatal, tegmentum-nukleus akumbens-limbik korteks üzerindeki mezokortikolimbik ve hipotalamustan hipofize uzanan tuberoinfundibuler yollar beyinde temel dopaminerjik devreleri

oluşturmaktadır. Bunlardan mezokortikolimbik yolak, öfori, keyif gibi durumların olduğu beyin bölgesi olup beyin ödül sistemini oluşturmaktadır. Bu dopaminerjik yolağın etkinleşmesi ile madde bağımlılığı ve tutkunluğunun geliştiği düşünülmektedir (Wise ve Bozarth, 1987; Nesse ve Berridge 1997).

2.4. Glutamaterjik Sistem ve Madde Bağımlılığı

Glutamaterjik sistem, santral sinir sistemindeki en yaygın uyarıcı aminoasit nörotransmitter sistem olup, glutamaterjik yollar, diğer birçok nörotransmitter sistemler ile bağlantılıdır (Molinoff 2011 pp. 363-395). Glutamat, glutaminden glutaminaz enzimi aracılığı ile sentezlenir (Şekil 2-2). İyonotropik olan N-metil-D-aspartik asit (NMDA), AMPA (α -amino-3-hidroksi-5-metil-4-izoksazolepropionik asit), kainat reseptörleri ve metabotropik reseptörler glutamaterjik sistemin reseptör alt tipleridir. Bu sistemde etki sonlanması geri-alım mekanizması ile olur. NMDA reseptörleri, NR1, NR2A, NR2B, NR2C, NR2D, NR3A ve NR3B alt protein birimlerine sahiptir (Kew ve Kemp 2005; Pleasure 2008). İyonotropik olan reseptörün kalsiyuma geçirgenliği yüksek olup, kanalın açık kalma süresi uzundur. AMPA ve kainat reseptörlerinin kalsiyum geçirgenliği düşük olup kanallarının açık kalma süreleri kısadır. AMPA, kainat ve G-protein ilişkili metabotropik reseptörlerin de protein alt birimleri vardır. NMDA reseptörlerinin yaygın olarak nörotransmisyonunda önemli yeri olduğu ve sinaptik plastisitenin birçok formunda temel aracı işlevi bulunduğu anlaşılmıştır (Malenka 2004).



Şekil 2-2: Glutamaterjik sinaps (Popoli ve ark. 2011'den).

Glutamaterjik sistemin, morfin bağımlılığının gelişmesinde ve sürdürülmesinde katkısının olduğu deneysel olarak gösterilmiştir (Koyuncuoğlu ve ark. 1999; Tehrani ve ark. 2009). NMDA reseptör antagonisti olan MK-801 maddesi, morfin ve alkol yoksunluğunu baskılamaktadır (Koyuncuoğlu ve ark. 1992; Boyce-Rustay ve Cunningham 2004).

2.5. Sinaptik Plastisite ve Madde Bağımlılığı

"Sinaps" sözcüğü, 19. yüzyılın sonlarında Sherrington tarafından tanımlanan Yunanca kökenli syn-:birlikte ve haptin:bağlamak sözcüklerinden oluşmaktadır. Sinapsların çoğu kimyasal olup, presinaptik nöron, sinaptik yarık içine bir nörotransmitter salıvererek komşu postsinaptik nöron zarında bulunan spesifik reseptörlerle etkileşime girmektedir.

Sinaptik plastisite, çok çeşitli çevresel uyaranlara karşı uyum için gereklidir. Bağımlılık yapıcı madde ve ilaçların, ilgili beyin devrelerinde sinaptik fonksiyonu ve plastisiteyi değiştirerek davranış üzerinde uzun vadeli değişikliklere neden olabileceğini varsayımı uzun zamandır araştırılmaktadır. Bu birikim sonucunda, bağımlılık yapıcı maddeler ile yapılan çeşitli davranış deneylerinden elde edilen veriler, diğer sinapslarda uzun süreli potansiyasyon (LTP) ve uzun süreli depresyon (LTD) mekanizmalarında yer alan spesifik sinyal moleküllerinin rolüne işaret etmektedir (Kelley 2004).

NMDA reseptör blokajının, çeşitli beyin bölgelerinde LTP ve LTD gelişimini önlediği bilinmektedir (Malenka 2004). Bunun yanı sıra, koşullandırılmış yer tercihini, davranışsal hassaslaşmayı ve bağımlılık maddelerinin kendine uygulama etkisini de önlemektedir (Schenk ve ark. 1993, Tzschentke ve Schmidt 1995). NMDA reseptör blokajı, dopaminerjik sistemin bağımlılıkla ilgili önemli merkezi ventral tegmental bölgede nukleus akumbensden farklı olarak hem davranışsal hassasiyeti hem de koşullandırılmış yer tercihini etkili bir şekilde önlemektedir (Kalivas ve Alesdatter 1993; Harris ve Aston-Jones 2003). Öte yandan, NMDA reseptörlerine bağlı sinaptik plastisitenin normal öğrenme ve bellekte olduğu düşünülen kritik rolü göz önüne alındığında, bu bulgular bağımlılığın erken gelişiminde de benzer süreçlerin gerekli olduğunu düşündürmektedir (Morris 2006).

İlk olarak hipokampusta gözlemlenen NMDA reseptör-bağımlı LTP, uzun zamandan beri incelenmiş ve memeli beyinde uzun süren sinaptik plastisitenin en iyi anlaşılmış hali olarak kalmıştır (Bliss ve Lomo 1973, Malenka 2004). LTP oluşumu, presinaptik olarak salıverilen glutamat aracılığıyla NMDA reseptörlerinin aktivasyonunu, postsinaptik membranın önemli ölçüde depolarize olmasını gerektirir. LTP için önemli tetikleyici olan postsinaptik Ca^{2+} konsantrasyonundaki artış, çeşitli protein kinazları, en önemlisi CaMKII29'u içeren kompleks hücre içi sinyalleme kaskadlarını harekete geçirir.

Mezokortikolimbik dopaminerjik sistem, bağımlılık yapıcı maddelerin pekiştirme etkisinde önemli bir rol oynamaktadır ve aktiviteye bağlı bu sistemin sinaptik plastisitesi madde bağımlılığında rol almaktadır (Otani ve ark. 2003). Morfin veya metamfetamine bağımlı sıçanların dopaminerjik nükleus akumbens (nAC)'lerinde yapılan DNA mikroarray taramasında, doku plazminojen aktivatörü (dPA) mRNA'sının ekspresyon seviyelerinin kontrol grubuna göre belirgin şekilde arttığı görülmüştür (Yamada ve ark. 2005). Bu şekilde, dPA'nın ilaç bağımlılığına bağlı uzun süreli nöronal değişikliklerde rol oynadığına dair hipotezler öne sürülmektedir.

2.6. Zenginleştirilmiş çevre

Zenginleştirilmiş çevre (ZÇ), Rosenzweig ve ark. (1978) tarafından cansız bir kompleksin sosyal bir uyaranla birleşimi olarak tanımlanmıştır.

Zenginleştirilmiş çevre, beyin fonksiyonları ve yapısı üzerinde güçlü etkilere sahiptir. Ancak, zenginleştirilmiş çevrede yapılan birçok çalışma, öğrenme ve bellek fonksiyonlarının davranışsal boyutuna, öğrenme ve bellek sürecine katılan hipokampus gibi beyin yapılarının hücresel ve moleküler yapılarına odaklanılmışlardır (Van Praag ve ark. 2000).

Rosenzweig ve ark. (1972) bir süre için rastgele standart kafes, zenginleştirilmiş çevre ve fakir çevre olarak üç çevre koşuluna yerleştirilen aynı genetik özelliklere sahip olan otuz günlük sıçanların farklı beyin bağlantı modelleri gösterdiğini bildirmiştir. Zenginleştirilmiş çevreye konulan hayvanların beyin ağırlıkları, standart çevre ve fakirleştirilmiş ortama konulan sıçanlarınkine göre ağırlıkça daha yüksekti. Bunun yanı sıra zenginleştirilmiş çevre grubu hayvanlarının çok belirgin bir şekilde daha fazla sinirsel ağlara, daha fazla dendritik dallanma ve yoğunluğa sahip oldukları gösterildi.

2.7. Doku plazminojen aktivatörü

Doku plasminojen aktivatörü (dPA), plazminojenin plazmine dönüşümünü katalize ederek ekstraselüler matrikste bulunan proteinlerin santral sinir sistemine geçişini sağlama görevini yapan bir serin proteazdır. Membran depolarizasyonu ile nöronlardan salıverilmekte (Lochner ve ark. 2006) ve sinaptik plastisitede rol almaktadır (Hori-Hayashi ve ark. 2011). Embriyonik hipokampal nöronlarda, NMDA'nın düşük düzeylerde uyardığı hücre içine kalsiyum girişini önlediği gösterilmiştir (Robinson ve ark. 2015).

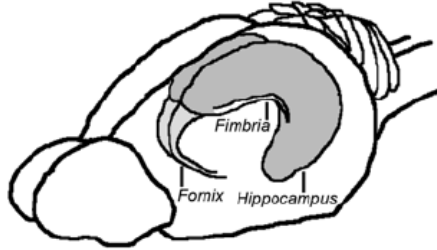
Santral sinir sisteminin çeşitli bölgelerinde, özellikle nöron ve glialarda üretilen dPA başta özellikle hipokampus olmak üzere, hipotalamus, serebellum ve amigdalada bol miktarda bulunur (Sappino ve ark. 1993).

Doku plazminojen aktivatörünün (dPA) NMDA spesifik alt birimlerinden NR1 ve NR2B ile etkileşerek NMDA-reseptör sinyalizasyonunu güçlendirdiği bildirilmiştir. dPA ile NMDA reseptörleri arasındaki fonksiyonel etkileşim, in vivo olarak, intrastriatal rekombinant dPA enjeksiyonlarının, NMDA kaynaklı eksitotoksik lezyonların potensiyasyonu ile sonuçlandığını gösteren kanıtlarla desteklenmiştir (Nicole ve ark. 2001).

Morfinin ödüllendirici mekanizmasındaki dPA rolü ile ilgili yapılan bir çalışmada, koşullu yer tercihinin dPA-yoksun (dPA-/-) farelerde önemli ölçüde azaldığı saptanmıştır (Noda ve ark. 1998). Bu bulgular, dPA-plazmin sisteminin, nAC'de akut olarak morfin tarafından indüklenen dopamin salıverilmesinin düzenlenerek morfinin ödüllendirici etkisinde rol alabileceğindüşündürmektedir (Nagai ve ark. 2004).

2.8. Hipokampus

Hipokampus, Yunanca denizati anlamına gelen hippos:at ve kampos:deniz canavarı ya da verimli tarla kelimelerinden türetilen insan ve omurgalı canlıların beyinlerinde bulunan en eski beyin bölümlerinden biridir. Hipokampus limbik sistem içinde her iki serebral korteks temporal lobunun medialinde yer alır (Şekil 2-3). Karmaşık yapılardan oluşur ve tümü hipokampal sistem olarak adlandırılır. Bu sistem, dentat girus, ammon boynuzu (CA bölgeleri) ve subikulum bölümlerini içermektedir (Wible 2013). Öğrenme-bellek ve yön bulma işlevleri olup uzaysal bellek bilgisini pekiştirilmesinde önemli bir merkezdir.



Şekil 2-3: Rodent beyinde hipokampus yerleşimi (Spijker 2011'den).

Nöral plastisite göstergesi olarak bilinen uzun süreli potentiyasyon (LTP)'nin varlığı ilk kez hipokampusta ortaya çıkarılmıştır (Bliss ve Lomo 1973), böylelikle hipokampus sıklıkla incelenen bir beyin bölümü olmuştur.

Hipokampusün beyin ödül sisteminde rol alabileceği düşünülmemesine rağmen, yapılan çalışmalar hipokampusün doğrudan katılımı ile maddenin ödüllendirici etkisine aracılık ettiğini göstermiştir. Klasik bir ödül modeli kullanarak, sıçanların bir pedala basarak kendi hipokampuslerini elektriksel olarak stimüle edebildikleri gösterilmiştir (Ursin ve ark. 1966). Hipokampusun dopaminerjik bağlantıları olduğu ve yüksek oranda D1 ve D2 reseptörleri içerdiği bilinmektedir (Bruinink ve Bischoff 1986). Madde tutkunluğu göstergesi ilgili maddeye aşerme ve kompulsif olarak arama, maddenin pekiştirici etkisinin deneyimlendiği anılarla canlanmaktadır. Bu klinik gözlemden hareketle yapılan bir çalışmada, sıçanların mü-reseptör antagonisti naloksonla geri çevrilebilir bir şekilde opioid dinorfin-A maddesini hipokampusun CA3 bölgesine verdiklerini saptamışlardır (Stevens ve ark. 1991). Morfinin hipokampus içine doğrudan infüzyonunun sıçanlarda koşullandırılmış yer tercihinin artırdığı da gösterilmiştir (Corrigall ve Linseman 1980). Öte yandan hipokampal sinaptozomlarda glutamat alımı (uptake)'nın morfin yoksunluk oluşturulan sıçanlarda belirgin olarak arttığı gösterilmiştir (Xu ve ark. 2003).

Birlikte ele alındığında, mevcut kanıtlar, öğrenme ve bellek altında yatan mekanizmaların madde bağımlılığı için de geçerli olup, klasik ödül devresinin merkezi bir bileşeni olduğunu göstermektedir (Kelley 2004; Hyman ve ark. 2006). Hipokampusun da sözkonusu bağımlılık mekanizmaları içinde önemli yer aldığına dair yeterince bilgi birikimi oluşmuş görünmektedir.

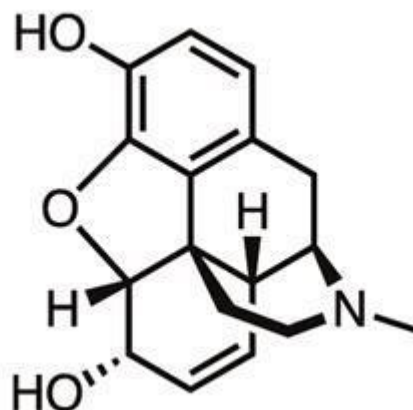
2.9. Morfin Yoksunluk Sendromu Deneysel Modeli

Morfin yoksunluk sendromunun şiddeti, bağımlılığın şiddeti ile uyumludur (Martin 1967). Böylelikle, opiyat antagonistleri ile yapılan tetiklenmiş yoksunluk sendromu deneysel modeli, morfin bağımlılık mekanizmalarının araştırılmasına araç olabilmektedir.

Yoksunluk sendromu modelinde, morfine bağımlı hale getirilen deney hayvanlarına opiyat antagonistleri uygulaması ile akut olarak başlatılan yoksunluğun stereotipik davranış belirtileri izlenmektedir (Himmelsbach ve ark. 1935; Francis ve Schneider 1971; Wei ve ark. 1973). Bu sırada normal davranışlar azalmakta, sıçan ya da farelerde sıçrama, silkinme (ıslak köpek titremesi), diş gıcırdatma, şahlanma, ptosis, tremor, diyare, ürinyasyon, piloereksiyon gibi bulgular gözlenmektedir. Opiyat antagonisti uygulamasından hemen sonra ortaya çıkan bu bulgular, ilk 15-20 dakika içinde yoğun olarak gelişmekte, giderek sönümlenmektedir. Yoksunluk sendromunda gözlenen davranışla ilgili belirtiler bu sırada saptanan elektrofizyolojik ve biyokimyasal değişiklikler ile uyumlu bulunmaktadır (Rasmussen ve ark. 1990).

2.10. Morfin

Morfin (Şekil 2-4), gelincikler familyası olarak da bilinen Papaveracea familyasının *Papaver somniferum* (haşhaş) bitkisinin meyve kapsülünden izole edilerek elde edilmektedir (Kayaalp 2012 pp. 826-845). İlk olarak Alman eczacı Friedrich Wilhelm Adam Sertürner tarafından 1805 yılında izole edilmiştir (Kalant 2007 pp. 236-251). Morfin adı, Sertürner tarafından sedatif etkisi nedeniyle rüya tanrısı Morpheus'tan esinlenerek verilmiştir. Güçlü bir analjezik olan morfinin, orta ve ciddi ağrılarda kullanımı günümüzde geçerliliğini korumaktadır.



Şekil 2-4: Morfinin moleküler yapısı (Crow 2017'den)

Opiyatlar, mü, kappa ve delta opioid reseptörlerine farklı afinitelerle bağlanarak G-proteini kenetli reseptörlerinin sinyal yollarını aktive ederler (Kalant 2007 pp. 236-251). Morfin, mü reseptörler üzerine güçlü, kappa reseptörler üzerine zayıf agonistik etkilere sahiptir (Kayaalp 2012 pp. 826-845). Santral ve periferik sinir sistemi başta olmak üzere organizmada çeşitli sistemlere morfin ve diğer opiyatlar etki etmektedir. Opiyatların istenen etkilerinin başında analjezik etkileri gelmektedir. Morfinin güçlü analjezik etkisi yüzyıllardır bilinmekte, günümüzde de ciddi istenmeyen etkilerine rağmen tıbbi endikasyon alanlarında geçerliliğini sürdürmektedir. Morfinin, ciddi istenmeyen etkileri arasında fiziksel bağımlılık geliştirmesi bulunmaktadır. Tedavi amaçlı kullanımlarında az oranda tutkunluk düzeyinde bağımlılığa yol açsa da tıp dışı kullanımları ile yüksek oranda ve güçlü bir şekilde bağımlılık oluşturmaktadır. Morfinin etkilerine tolerans yinelenen uygulamalarda hızla gelişmektedir. Örneğin, deney hayvanlarında 4 saat gibi kısa süreli sürekli yavaş morfin infüzyonu sonucu tolerans gelişebilmektedir (Kalant 2007 pp. 236-251).

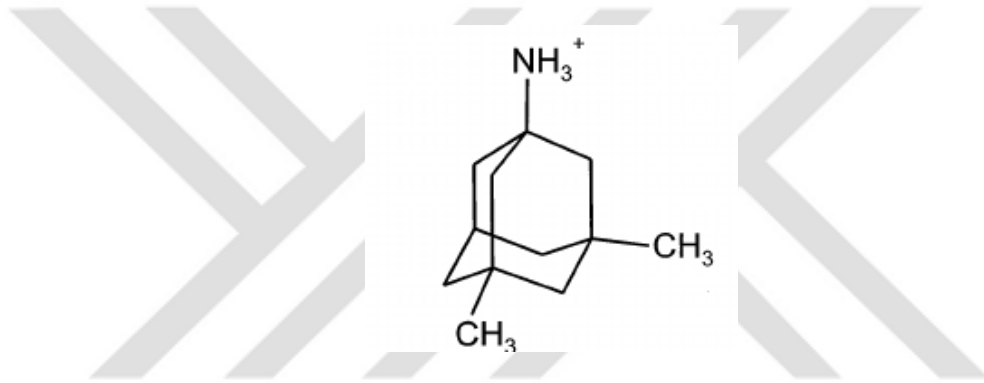
Morfin bağımlılık ve tutkunluk mekanizmaları henüz tam olarak aydınlatılamamış olup, nökslerle giden tutkunluğunun etkin bir tedavisi bulunmamaktadır. Bağımlılık mekanizmaları için beyinde çeşitli bölümlerin incelenmesi ile farklı nörotransmitter nörohumoral sistemlerin rolü araştırılmaktadır (Koyuncuoğlu ve ark. 1999; Allahverdiyev ve ark. 2011; Yamantürk-Çelik ve ark. 2011; Bhalla ve ark. 2016).

2.11. Memantin

İnfluenza virüsüne karşı antiviral etkinliği ile 1968 yılında patent alınan amantadini, grip infeksiyonu profilaksisi için kullanan bir hastada Parkinson hastalığı belirtilerinin gerilediği tesadüfen saptanmıştır (Schwab ve ark. 1969). Daha sonra yapılan klinik çalışmalarla amantadinin Parkinson hastalığındaki tedavi edici etkisi kanıtlanmış ve yeni bir endikasyon alanı bulunmuştur (Parker 1970). Böylece, adamantan türevlerinin santral sinir sistemini etkileyen hastalıklardaki olası tedavi

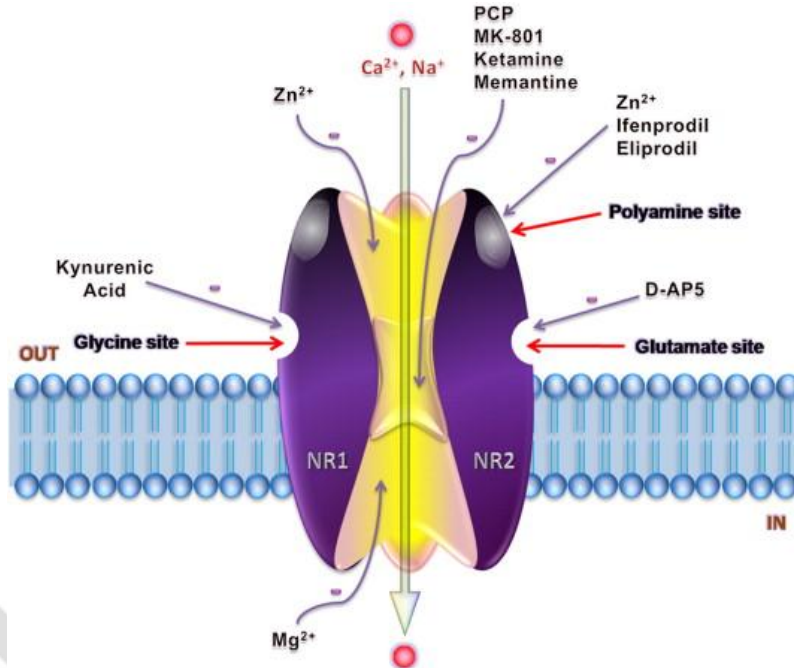
değerini araştırma yolu açılmıştır (Wanka ve ark. 2013). Altmışlı yıllarda hipoglisemik ilaç olarak araştırılırken bu etkisi saptanmayan başka bir adamantan türevi memantin, yıllar içinde Parkinson hastalığı ve Alzheimer hastalığı tedavisinde kullanılmaya başlanmıştır (Rabey ve ark. 1992; Ditzler 1991).

Memantin (1-amino-3,5-dimetil-adamantan), organik bileşiklerden sikloheksilaminler grubu içinde yer almaktadır (Şekil 2-5). Sikloheksilaminler, bir amin grubuna bağlı sikloheksan halkasına sahip sikloheksilamin kısmı içeren alifatik homopolisiklik bileşiklerdir.



Şekil 2-5: Memantin kimyasal yapısı (Parsons ve ark. 1999'dan)

Çeşitli santral sinir sistemi patolojilerine özgü deneysel modellerde NMDA-reseptör antagonistlerinin tedavi değeri olabileceği saptanmaktadır (Cho ve ark. 2013; Refsgaard ve ark. 2017). Ancak, dizosilpin (MK-801), fensiklidin ya da ketamin gibi bu NMDA reseptör antagonistleri insanda psikotomimetik toksisiteye yol açmaktadır (Luby ve ark. 1959; Luisada 1978). Glutamaterjik reseptörler, santral sinir sisteminde çok yaygın bulunmakta, bu sisteme yönelik ilaç moleküllerinin seçiciliği yetersiz kalmaktadır. NMDA reseptörleri (Şekil 2-6), öğrenme-bellek işlevi gibi fizyolojik sinaptik plastisitede önemli rol oynamakta (Collingridge ve Singer 1990), NMDA reseptör antagonistlerinin ise bu işlevler üzerine olumsuz etkileri olası görülmektedir (Parsons ve ark 1999).



Şekil 2-6: NMDA reseptörü üzerinde memantin ve çeşitli ligand bağlanma bölgeleri (Ghasemi ve Schachter 2011'den).

Memantin, düşük ya da orta derecede afiniteli, yarışmaz NMDA reseptör antagonisti olduğu Bormann tarafından bildirilmiştir (1989). Diğer NMDA-reseptör antagonistlerinden farklı olarak memantin, insanda daha az istenmeyen etkisi bulunmaktadır (Kornhuber ve Weller 1997). Güçlü voltaj bağımlı olması ve hızlı kinetiği ile memantin, reseptöre patolojik aktivasyonunu önleyecek kadar uzun süre bağlı kalmakta ve fizyolojik etkinliğini engellemeyecek hızla uzaklaşmaktadır (Danysz ve ark. 2000). Memantin, nöronal hücre ölümüne ve bilişsel işlev bozukluğuna neden olabilecek anormal glutamat etkinliğinin etkilerini bloke etmektedir. Hızlı açma/kapama kinetiği ve düşük dereceli afinite, memantin, klinik kullanıma uygunluğunu sağlamaktadır. Normal nörolojik işlevleri yöneten düşük reseptör etkinliğine etkisiz kalmakta, NMDA reseptörlerinin glutamatın yüksek düzeyleri ile olan aşırı etkinliğine karşı etkili olmaktadır (Chen ve Lipton 2006). Diğer yandan, daha düşük dozlarda, klinik olarak ilgili konsantrasyonlarda memantin, sinaptik plastisiteyi uyarabilmektedir ve Alzheimer hastalığı hayvan modellerinde bellek işlevini korumakta ve bellek performansını artırmaktadır (Rogawski ve Wenk, 2003). Memantin bu etkisini yaşlı hayvanların bellek performansını artırarak da göstermektedir (Uğur 2006).

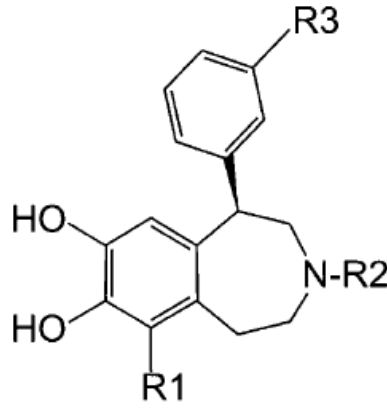
Memantin, glutamaterjik sistem dışında başka nörotransmitter sistemleri üzerine etkileri de saptanmıştır. Bunlar arasında dopaminerjik, serotonerjik, kolinerjik

sistemler bulunmaktadır (Seeman ve ark 2008; Rammes ve ark, 2001; Aracava ve ark, 2005). Etkilerinde NMDA-reseptörü antagonisti olmasının yanı sıra diğer nörotransmitter sistem reseptörleri ile olan etkileşimlerinin katkısı iyi bilinmemektedir.

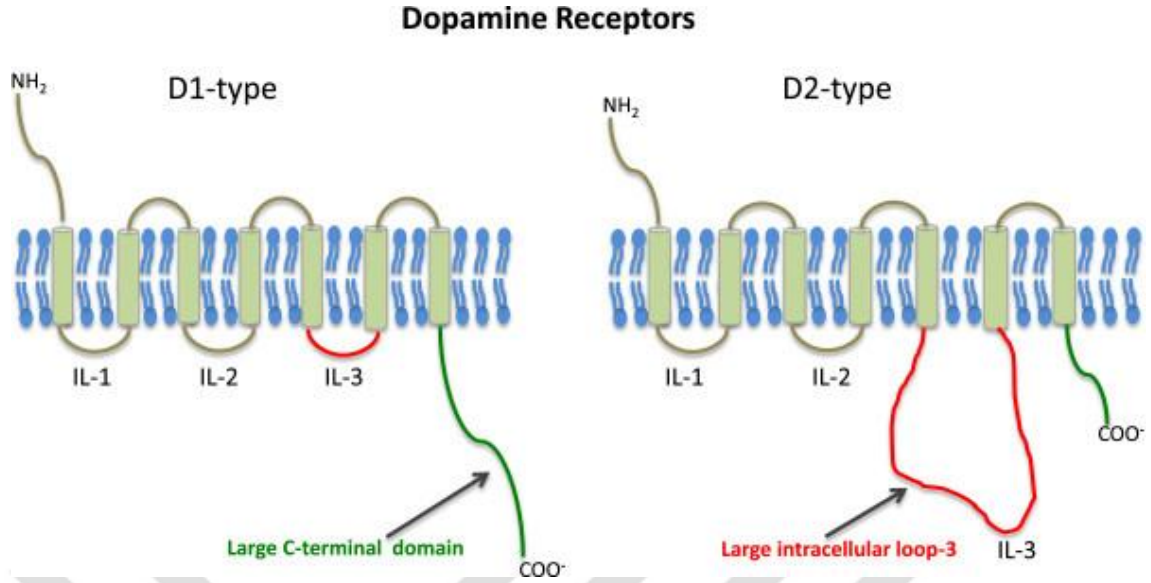
Morfin bağımlılık mekanizmalarında glutamaterjik sistem ve NMDA reseptör alt tipinin önemi uzun zamandan beri bilinmektedir. NMDA antagonistlerinin deneysel modellerde morfin yoksunluk sendromunu baskıladığı gösterilmektedir (Koyuncuoğlu ve ark. 1992; Trujillo ve Akil 1994). Olumlu deneysel sonuçların kliniğe yansması kullanılan NMDA antagonisti moleküllerin ciddi istenmeyen etkileri nedeni ile gerçekleşmemiştir. Memantin sentezlenmesi bu kısıtlılığı ortadan kaldıran umut verici bir gelişme olmuştur.

2.12. SKF82958

SKF82958, benzazepin grubu sentetik bir bileşik olup D1/D5 reseptörleri için tam agonisttir (Pfeiffer ve ark. 1982). Şekil 2-7’de görülen benzazepinlerin genel kimyasal yapısında R1, R2 ve R3 için sırası ile klor, CH₂CHCH₂ ve hidrojen olduğunda molekül SKF82958 adını almaktadır (Lee ve ark. 2014).



Şekil 2-7: Benzazepinlerin kimyasal yapısı (Lee ve ark. 2014’dan)



Şekil 2-8: Dopaminerjik D1 ve D2 reseptör yapısı (Pandey ve ark. 2013'den)

SKF82958'in, çeşitli çalışmalarla santral etkileri gösterilmektedir. Nükleus akumbens üzerine etki ve D1 dopamin reseptörleri (Şekil 2-8) aracılığı ile lokomotor aktiviteyi ve şahlanmayı sıçanlarda akut olarak artırmakta, bu etkisi glutamaterjik etkinliğin artırılması ile şiddetlenmekte ve iki madde amfetaminin lokomotor etkinliği artırma etkisini de birlikte artırmaktadır (Kim ve ark. 2001). SKF82958, kendisi de tek başına uygulandığında sıçanların kendine-verme testinde D1 dopaminerjik reseptörler üzerinden pekiştirici etki göstermektedir (Self ve ark. 1996). Öte yandan, dopamin D1 reseptör agonisti SKF 82958 uygulamasının, sıçanlarda alkol alımını ve tercihini azalttığı da gösterilmiştir (Spoelder ve ark. 2016).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Deney Hayvanları

Deneylerde, İ.Ü. Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü'nde üretilen inbred Wistar Albino üç aylık erkek sıçanlar kullanıldı. Hayvanlar, deney gününe kadar $21\pm 2^{\circ}\text{C}$ sıcaklık kontrollü odada, standart yemle beslendiler. Deneysel protokol İstanbul Üniversitesi Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü Deney Hayvanları Etik Kurulu tarafından onaylandı (Onay No: 30, Tarih:17/05/2007).

3.2. Deneylerin Yürütüldüğü Yer

Tez projesinin davranışsal ve genetik verilerini oluşturan deneyleri, İ.Ü. Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü'nün Laboratuvar Hayvanları Bilimi Anabilim Dalı ve Genetik Anabilim Dalı mekanlarında ve sağladıkları imkanlar ile gerçekleştirilmiştir.

3.3. Deney Maddeleri

3.3.1. Deney hayvanlarına uygulanan maddeler

Deneylerde kullanılan maddelerden morfin Toprak Mahsülleri Ofisi (Türkiye), nalokson, memantin ve SKF82958 Sigma (Almanya)'dan satın alınmıştır. Morfin içeren peletler ve plasebo peletler Marmara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı'nda her bir morfin pelet 75 mg baz morfin içerecek şekilde Gibson ve Tingstad'ın formülüne (Gibson ve Tingstad, 1970) göre hazırlanmıştır. Nalokson hidroklorid, memantin ve SKF82958 serum fizyolojik (%0.9 NaCl) içinde çözülmüştür. Morfin ve plasebo peletler deri altına, diğer maddeler periton içine uygulanmıştır.

3.3.2. Analizlerde kullanılan maddeler

Hipokampal dPA mRNA analizinde kullanılan etil alkol ve glasiyal asetik asit Merck (Almanya)'den, etidyum bromür, tris baz, EDTA ve DNase I ise Sigma (Almanya)'dan satın alınmıştır. Kantitatif PZR analizi için kullanılan, LC480 Master Mix, UPL Prob, UPL Primer ve 96 kuyulu PZR tabakları Roche (Almanya)'dan satın alınmıştır. cDNA sentezi için MBI Fermentas (Litvanya)'dan satın alınan 5X RT buffer,

10 mM dNTP miks, DTT, RNaz inhibitör (20U/ μ l), revers transkriptaz (200 U/ μ l) ve random primer kullanılmıştır. Analizlerde kullanılan tampon ve çözeltiler Tablo 3-1’de verilmektedir.

Tablo 3-1: Analizlerde kullanılan tampon ve çözeltiler
Tris-asetat EDTA-TAE (500 mL, 50X) 121 g Tris baz, 28,5 mL glasiyal asetik asit, 50 mL EDTA, 0,5 M ddH ₂ O ile 500 mL’ye tamamlanarak otoklavlandı ve oda ısısında saklandı.
Lysis Buffer 250 mL ddH ₂ O içinde 1mM Tris (pH:8), 5M NaCl, 0.5M EDTA, 0.5M NaF, 25 mL %100 gliserol, 2.5 mL NP40 olacak şekilde hazırlandı.
0.5 M Tris pH:6.8 15.1 g Tris’e 250 mL’ye kadar ddH ₂ O eklenir. 5N HCl ile pH ayarı yapılır.
1.5M Tris pH:8.8 45.4 g Tris’e 250 mL’ye kadar ddH ₂ O eklenir. 5N HCl ile pH ayarı yapılır.
Elektroforez Buffer 1000 mL ddH ₂ O içerisine 145 g glisin, 30 g tris, 50 mL %10 SDS eklenir.
10X blot buffer pH:8 1000 mL ddH ₂ O içerisine 144.1 glisin, 30.3 Tris eklenir. 1X blot buffer hazırlanırken %20 metanol eklenerek sulandırılır.
10X TBS 1000 mL ddH ₂ O içerisine 100 mM Tris, 1.5M NaCl eklenir. 5N HCl ile pH 7.4’e ayarlanır.
TBS-Tween 100 mL 10X TBS üzerine 900 mL ddH ₂ O konur. Hazırlanan solüsyona %0.05 tween 20 eklenir.
2X Protein Loading Buffer 30 mL ddH ₂ O içerisine 6 mL 1.5M Tris pH 6.8, 4.5 mL beta-merkapto-ethanol, 9 mL %20 SDS, 10.34 mL %87 gliserol, 250 μ L, Broom fenol mavisi eklenir.
StripBuffer 50 ml ddH ₂ O içerisine 6.25 ml 0.5M tris pH6.7, 10 ml %10 SDS, 349 μ l B-ME eklenir.
Timosit Ayrımı için Çözelti I: 23 mL RPMI1640 içerisinde 25u/uL Dnase I karıştırılarak elde edilir.

Timosit Ayrımı için Çözelti II: 11.2 mL medium A içerisinde 2.8 mL FCS eklenerek elde edilir.

3.4. Kullanılan Cihazlar

Deneyler ve analizlerde kullanılan cihazlar Tablo 3-2’de sıralanmıştır.

Tablo 3-2: Deneylerde ve analizlerde kullanılan cihazlar ve laboratuvar malzemesi	
Hassas terazi (Shimadzu)	Masa üstü mini santrifüj (Hettich, Eppendorf)
Otomatik pipetler (Glison, Eppendorf)	CCD kamera-bilgisayar donanımı (BIO-RAD)
Çeker ocak (Kermanlar)	Elektroforez aleti (Stratagene)
Otoklav (Kermanlar)	Güç kaynağı (Stratagene)
Distile su cihazı (Millipore)	Eş-zamanlı PZR cihazı (Roche, Light Cycler 480)
Buzdolabı ve derin dondurucu (+4°C, -20°C, -80°C) (Arçelik, Sanyo, Bosch, Heraeus Sepatech)	Vorteks (Kermanlar)
Soğutmalı santrifüj (Eppendorf)	Spektrofotometre (Nanodrop)
Mikro Dizi Cihazı (Affymetrix)	Hibridizasyon Fırını (Affymetrix)

3.5. Morfin Bağımlılığı ve Yoksunluğu Oluşturulması

Morfin (MOR) bağımlılığı, hafif eter inhalasyonu ile oluşturulan anestezi altında hayvanların sırt derisi altına her biri 75 mg baz morfin içeren peletlerden ikişer adet yerleştirilmesi ile oluşturuldu (Way ve ark. 1969). Pelet yerleşiminden 72 saat sonra opiyat reseptör antagonisti nalokson (NAL) (1 mg/kg, i.p.) uygulanarak MOR yoksunluk sendromu başlatıldı. NAL uygulamasından kısa süre sonra hayvanlarda başlayan MOR yoksunluk sendromunda sıçrama, ıslak köpek titremesi, dış gıcırdatma, şahlanma, lokomotor aktivite artışı gibi stereotipik davranışlar ve ptozis, diare oluşumu, vücut ağırlığı kaybı gibi bulgular gözlemlendi (Tablo 3-3). Elde edilen bulgular değerlendirilmek üzere kaydedildi.

Tablo 3-3: Nalokson ile başlatılan morfin yoksunluk sendromu izlem formu

No:		Tarih:			
Kantitatif	Sayı				
<i>Sıçrama</i>					
<i>Islak köpek titremesi</i>					
<i>Şahlanma</i>					
Kalitatif	Derece				
<i>Diş gıcırdatma*</i>					
<i>Ptozis**</i>					
<i>Diare**</i>					
<i>Lokomotor aktivite***</i>					

* *Ortaya çıkma durumuna göre 1-10 arası dereceleme*
 ** *0/1 (yok/var) her 3 dakikada bir değerlendirme (toplam en fazla 5)*
 *** *0/1/2 (yok/hafif, orta, şiddetli) her 3 dakikada bir değerlendirme (toplam en fazla 10)*

	Nalokson uygulaması öncesi	Nalokson uygulaması 15 dakika sonrası
Vücut ağırlığı (g)		

3.6. Sinaptik Plastisite Gelişimi: Zenginleştirilmiş Çevre

Standart çevre için 10X30X30 cm., zenginleştirilmiş çevre için ise 40X84.5X55 cm boyutlarında kafesler kullanıldı. Standart çevre kafeslerinde yalnızca suluk ve yemlik bulunurken, zenginleştirilmiş çevre için kafes içine merdivenler ve

tünel yerleştirildi (Şekil 3-1) (Kempermann ve ark. 1997). Sinaptik plastisite gelişimini indüklemek üzere üç aylık deney hayvanları bir ay boyunca ZÇ kafeslerinde tutuldu.



Şekil 3-1: Deneylerde kullanılan zenginleştirilmiş çevre kafesi

3.7. Deney Grupları ve İşlemler

Erkek Wistar Albino sıçanlar (üç aylık) bir ay süre ile SÇ ya da ZÇ kafeslerinde tutuldu. Bu süre sonunda SÇ’de tutulan hayvanlardan bir kısmının sırt derisi altına hafif eter anestezisi altında morfin pellet yerleştirilirken bir kısmının sırt derisi altına plasebo pellet yerleştirildi. Bu hayvanların bir kısmına pellet yerleşiminden yetmiş-iki saat sonra

SF uygulaması (SÇ-PLA-SF-SF ya da SÇ-MOR-SF-SF) bir kısmına ise nalokson uygulaması (SÇ-PLA-SF-NAL ya da SÇ-MOR-SF-NAL) yapıldı. ZÇ'de tutulan hayvanların da bir kısmının sırt derisi altına hafif eter anestezisi altında morfin pellet yerleştirilirken bir kısmının sırt derisi altına plasebo pellet yerleştirildi. ZÇ gruplarındaki hayvanlara pellet yerleşiminden 72 saat sonra nalokson uygulandı (ZÇ-PLA-SF-NAL ya da ZÇ-MOR-SF-NAL). SÇ kafeslerde bulunan diğer hayvanlara ise morfin pellet yerleşiminden 72 saat sonra nalokson injeksiyonundan 30 dakika önce memantin (SÇ-MOR-MEM-NAL), SKF82958 (SÇ-MOR-SKF82958-NAL) ya da SKF82958 ile memantin (SÇ-MOR-SKF82958-MEM-NAL) birlikte uygulandı. Bu şekilde dokuz deney grubu oluşturuldu (Tablo 3-4). Deney grupları 5-10 hayvan içerecek şekilde oluşturuldu. Tüm deneyler, farklı deney gruplarından hayvanları aynı günde içerecek şekilde 09:00-14:00 saatleri arasında gerçekleştirildi.

Nalokson ile başlatılan morfin yoksunluk sendromu gruplarındaki her bir hayvan NAL injeksiyonundan hemen sonra izleme kafeslerine (20X20X20 cm.) alınarak 15 dakika süre ile izlendi. NAL uygulaması öncesi ve 15 dakika sonunda hızla her bir hayvan tartıldı. NAL uygulamasından kısa süre sonra başlayan yoksunluk sendromu belirtilerinden sıçrama, ıslak köpek titremesi, şahlanma, diş gıcırdatma, ptozis, diyare ve lokomotor aktivite, vücut ağırlığı kaybı kaydedildi (Tablo 3-3). Sendromun değerlendirilmesi Maldonado ve ark. (1992) kullandığı yöntem kısmen değiştirilerek yapıldı. Kantitatif değerlendirme sıçrama, ıslak köpek titremesi, şahlanma parametreleri, kalitatif değerlendirme ise diş gıcırdatma, ptozis, diyare ve lokomotor aktivite parametreleri için yapıldı. Sıçrama, ıslak köpek titremesi ve şahlanma sayıldı; diş gıcırdatma ortaya çıkma durumuna göre sayıldı (15 dk'da en fazla 10); ptozis ve diyare 0/1 (yok/var) ve lokomotor aktivite 0/1/2 (yok/hafif, orta, şiddetli) şeklinde her 3 dakikada bir değerlendirme yapıldı. Bu şekilde 15 dk içinde her bir hayvan için ptozis ve diyare için en fazla 5, lokomotor aktivite için en fazla 10 değeri belirlendi.

Tartımdan hemen sonra ise tüm gruplardaki hayvanlar servikal dislokasyon sonrası dekapite edildi. Beyinleri çıkartılarak hipokampusları ayrıldı ve hipokampus ıslak ağırlıkları tartıldı. Tartılan hipokampuslar sıvı azotta hemen dondurularak -80 C⁰ sıcaklıkta saklandı. Nalokson uygulanmayan iki gruptaki hayvanlara da aynı işlemler yapıldı ve hipokampusları -80 C⁰ sıcaklıktaki derin dondurucuya alındı. Ayrılan hipokampuslar dPA mRNA düzeyi tayini için kullanıldı.

Tablo 3-4: Deney grupları ve işlemler

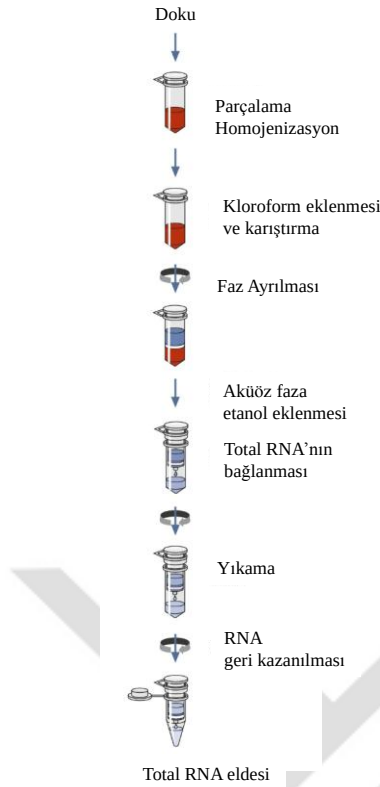
30 gün	3 gün Pelet	0. dk 1. İnjesiyon (i.p.)	30. dk 2. İnjesiyon (i.p.)	15 dk izlem	Tartım ve Dekapitasyon	Beyinden hipokampusların ayrılması
SÇ	PLA	SF	SF	+	+	+
			NAL	+	+	+
	MOR	SF	SF	+	+	+
			NAL	+	+	+
		MEM	NAL	+	+	+
		SKF	NAL	+	+	+
ZÇ	PLA	SF	NAL	+	+	+
			NAL	+	+	+
	MOR	SF	NAL	+	+	+
			NAL	+	+	+

3.8. Hipokampal Doku Plazminojen Aktivatörü mRNA Tayini

Tüm gruplarda hipokampal doku plazminojen aktivatörü mRNA düzeyleri “Real time PCR” ile ölçüldü (Nagai ve ark, 2004).

3.8.1. RNA İzolasyonu

RNA molekülü çok hassas olup yıkılımı hızlı olduğundan, hipokampal dokunun çıkartılmasını takiben tartılarak sıvı nitrojen içinde hızla dondurulması sağlandı. Dondurulan dokular izolasyon tarihine kadar $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ ’de saklandı. İzolasyon tarihinde hızla çözödürülen dokular 1 mL Qiazol lizis solüsyonu içine alınarak el homojenizatörü ile buz üzerinde parçalandı. Her bir örnek üzerine 200 μL kloroform eklenerek hızla karışması sağlandı. Ardından 2-3 dakika kadar oda sıcaklığında bekletildi ve $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ’de 15 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası örnek üç faza ayrıldı (Şekil 3-2). Üst akuöz fazda RNA, orta fazda DNA ve alt fazda proteinlerin ayrıldığı gözlemlendi.



Şekil 3-2: RNA izolasyon protokolü akış şeması (Qiagen RNeasy Lipid Tissue kiti protokolü)

RNA'nın bulunduğu şeffaf üst faz yeni bir 1,5 mL tüpe aktararak eş hacimde %70 etanol eklendi ve vorteks yardımı ile karıştırıldı. RNA izolasyonları Qiagen RNeasy Lipid Tissue kiti ile üretici firmanın önerisi doğrultusunda gerçekleştirildi. RNA'nın çözünmesi için 40 μ L RNase açısından arındırılmış su eklenerek 10.000 rpm'de çevrildi ve alt tüpe geçmesi sağlandı. İzole edilen RNA örneklerinin miktarı Nanodrop 1.000 cihazında ölçüldü, aynı zamanda kalite açısından %1'lik agaroz jelde yürütülerek kontrol edildi.

3.8.2. cDNA Sentezi

cDNA sentezi için 1 μ g total RNA kullanıldı. Örnekler 20 μ M random primer eklenerek 65 C°'de 10 dakika bekletildi. Hemen buza alınan örnekler üzerine reaksiyon karışımı (Tablo 3-5) eklendi ve 25 C°'de 10 dakika, 42 C°'de 1 saat ardından da 70 C°'de 10 dakika inkübe edildi. Örnekler 100 ng/ μ L olacak şekilde sulandırılarak -20 C°'de saklandı.

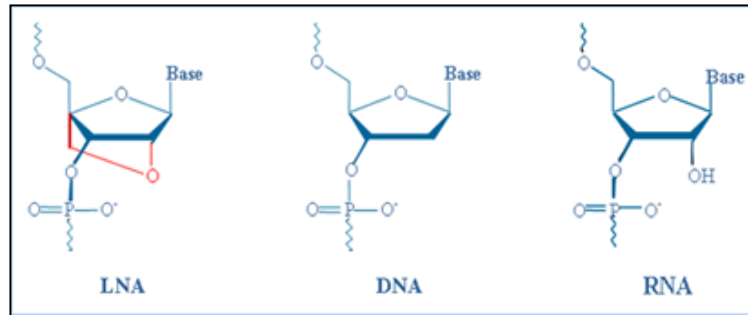
Tablo 3-5: cDNA Sentezinde kullanılan karışımın içeriği.

	Örnek başına miktar (μL)
5xTers Transkriptaz Tampon	4
10mM dNTP karışımı	2
0.1M DTT	1
Rnase İnhibitör (20U/ μL)	1
Ters Transkriptaz Enzimi (250U/ μL)	1
Toplam	9

3.8.3. Kantitatif Eş-zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)

Eş-zamanlı PZR, floresan işaretli boya ya da probler yardımıyla, in-vitro çoğaltma işleminin bilgisayar ekranında eş-zamanlı olarak takip edilmesini sağlayan bir teknolojidir. Kantitatif eş-zamanlı PZR ise konsantrasyonu ya da kopya sayısı bilinen referans örnekler yardımıyla, çalışma örneklerindeki gen anlatım düzeylerini sayısal olarak belirlemek mümkündür.

Çalışmada kullanılan probler, Roche firması tarafından oluşturulmuş Evrensel Prob Kütüphanesi (*Universal Prob Library*, UPL) yardımıyla tasarlandı (Şekil 3-3) (<https://www.roche-applied-science.com/sis/rtpcr/upl/index.jsp>).



Şekil 3-3: Kilitlenmiş nükleik asit yapısı ve DNA ve RNA ile karşılaştırılması (*Universal Prob Library*, UPL)

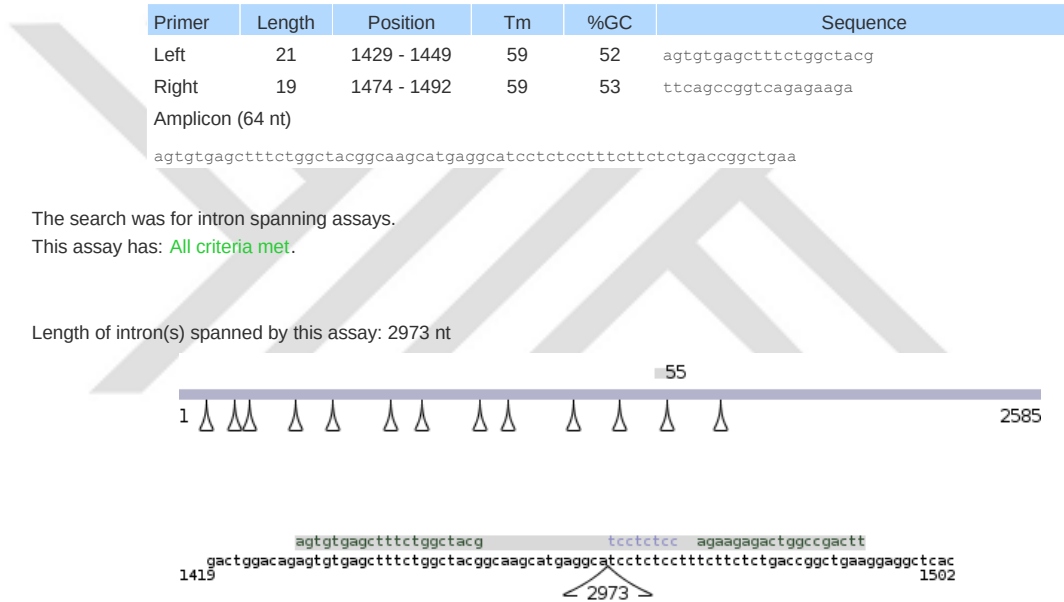
UPL probolar 8-9 nükleotid uzunluğunda ve genom boyunca çok sayıda farklı yere homoloji gösterebilen, 5' ucu floresein (FAM) işaretli, 3' ucu ise karanlık soluk bir boya içeren dizilerdir. Her bir UPL prob dizisinde kilitlenmiş nükleik asit (*Locked Nucleic Acid*, Şekil 3-4) adı verilen nükleik asit analogları eklenmiştir. Bu sayede kısa oldukları halde özgünlük ve stabilite sağlayabilirler.

1. NM_013151.2

ProbeFinder has designed an optimal real-time PCR assay for:
NM_013151.2 *Rattus norvegicus* plasminogen activator, tissue (Plat), mRNA

Assay rank 1

Use probe #55 (cat. no. 04688520001)

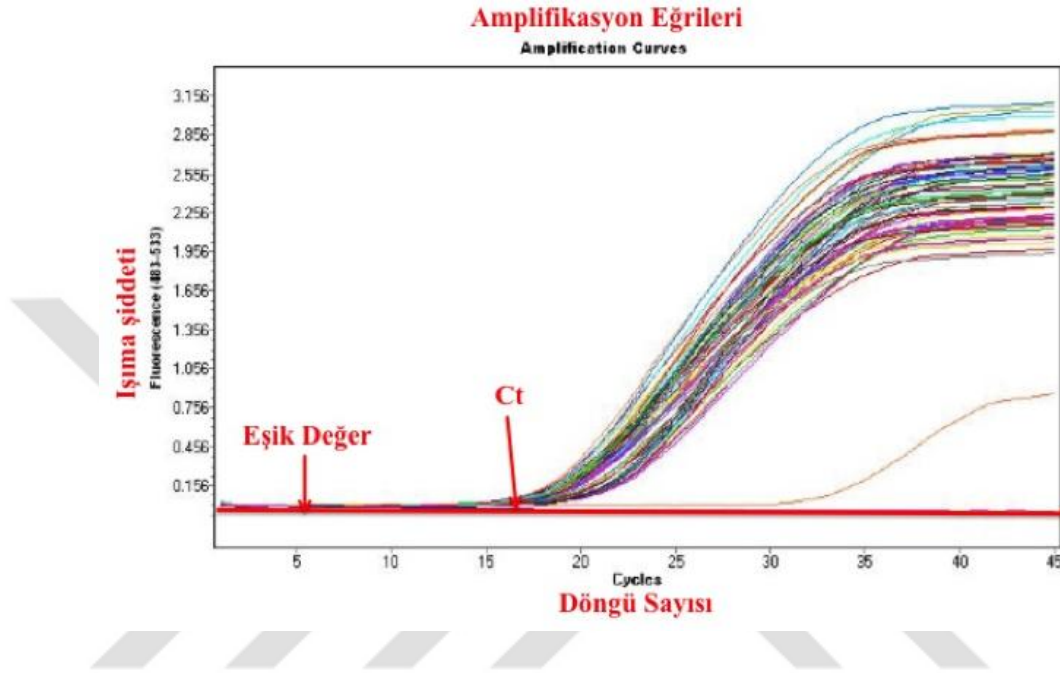


Şekil 3-4: Çalışmada kullanılan plazminojen aktivatör genine ait primer ve prob yerleşimlerinin gösterimi (*Universal Prob Library*, UPL), 55 no'lu UPL prob Plat geni çalışması için tasarlanan primer ile kullanılmıştır.

Eş-zamanlı PZR teknolojisinde iki farklı şekilde sayısal analiz yapılabilir. Mutlak sayısal analizde PZR ışımaları, kopya sayısı bilinen bir kalibratör ile karşılaştırılırken, görece sayısal analiz, mRNA anlatımlarındaki görece değişimleri tespit eder.

Göreceli sayısal analiz yöntemi uygulamalarında bir örneğin referans gen seviyesi ile hedef gen seviyesi karşılaştırılarak analiz yapılır. Bir genin anlatım seviyesi ne kadar yüksekse, çoğalma (logaritmik faz) evresine girişi o kadar erken olacaktır. Bir örneğin çoğalma evresine girdiği döngü sayısına Ct (*Threshold Cycle*) denir (Bustin ve

ark. 2005) (Şekil 3-5). Göreceli sayımsal analizlerde Ct değerinden faydalanılır. Buna göre göreceli gen anlatım düzeyleri delta Ct algoritması ile Livak ve Schmittgen'in tanımladığı şekilde hesaplanmıştır (Livak ve Schmittgen 2001). Referans gen olarak yine Universal Prob Library tarafından tasarlanmış.



Şekil 3-5: Kantitatif Eş-zamanlı PZR'de Ct Gösterimi. Referans gen amplifikasyon eğrileri (Kırmızı çizgi, eşik değeri; Ct, amplifikasyon ürününün eşik değeri geçtiği ilk döngü sayısı).

3.9. İstatistiksel Analiz

Elde edilen verilerin istatistiksel analizi, GraphPad Prism 7.01 programı kullanılarak yapılmıştır. Yapılan istatistiksel analizde, ikili karşılaştırmalarda parametrik olanlar için Student'in t-testi, parametrik olmayanlar için Mann-Whitney u-testi kullanılmıştır. İstatistiksel anlamlılık için $p < 0.05$ değeri anlamlı kabul edilmiştir. Değerler $\text{ort.} \pm \text{s.h.}$ olarak verilmiştir.

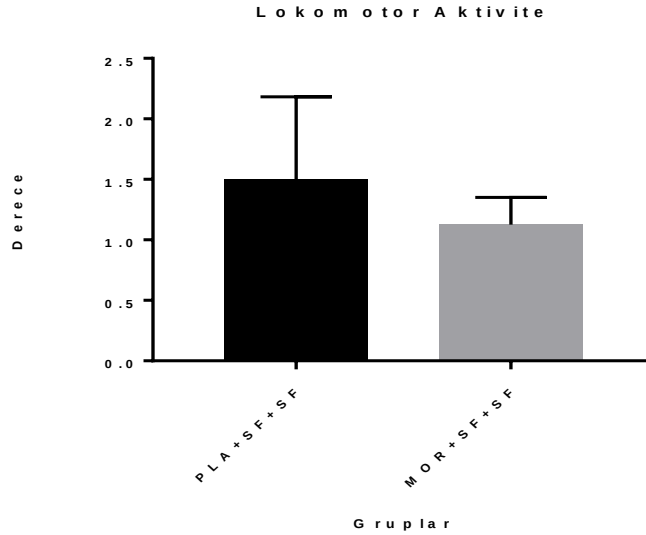
4. BULGULAR

4.1. Standart çevre morfin ve plasebo grupları

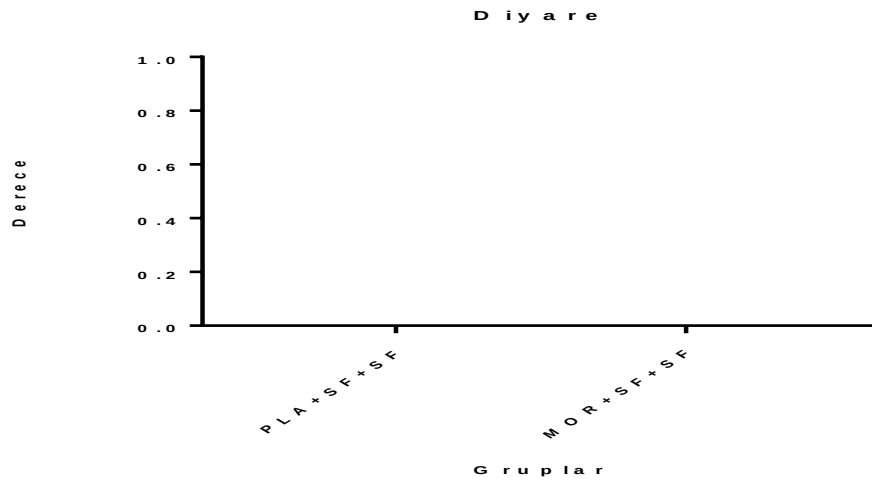
Standart çevrede (SÇ) tutulan plasebo ve morfin pelet uygulanmış deney gruplarında davranış parametrelerine ait elde edilen değerler arasında istatistiksel anlamlı fark elde edilmedi (Tablo 4-1). Her iki grup arasında lokomotor aktivite, diyare ve vücut ağırlığı kaybı değerleri birbirine benzer bulundu (Şekil 4-1, Şekil 4-2, Şekil 4-3). Bu gruplarda hipokampal doku plazminojen aktivatörü göreceli PLAT % mRNA değerleri de birbirinden anlamlı farklı değildi (Şekil 4-4).

Tablo 4-1: Standart çevre morfin pellet uygulamasının 72 saat sonunda davranış üzerine etkileri.

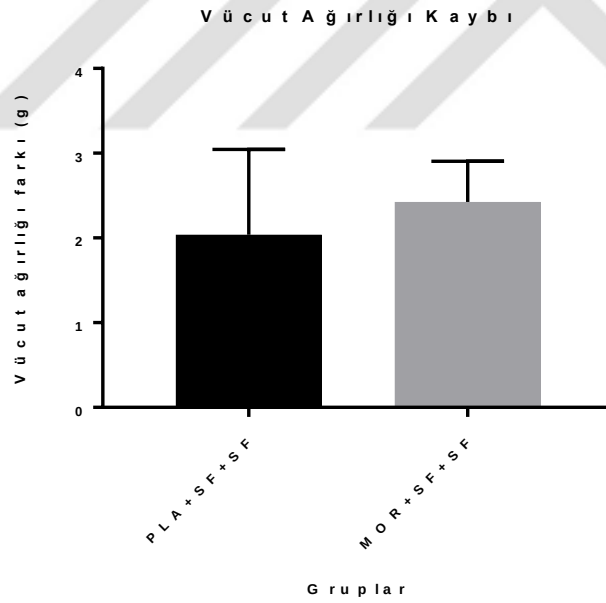
Gruplar	N	Sıçrama	Islak köpek titremesi	Diş Gıcırdatma	Şahlanma	ptozis
SÇ-PLA+SF+SF	8	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	4.1±1.7	0.0±0.0
SÇ-MOR+SF+SF	8	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	3.0±1.4	0.3±0.2



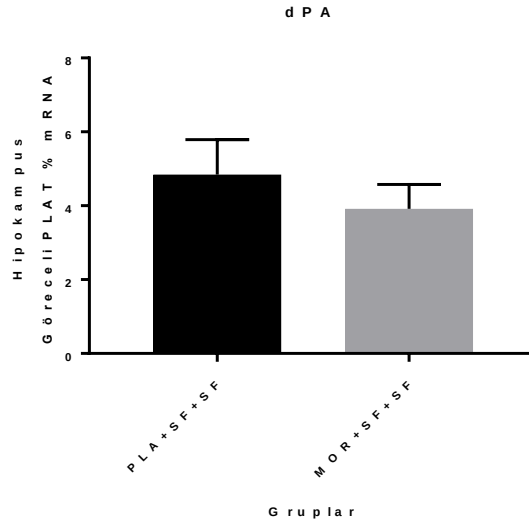
Şekil 4-1: Morfin pelet uygulanan SÇ'deki sıçanlarda 72 saat sonunda plaseboya kıyasla lokomotor aktivite derecesi.



Şekil 4-2: Morfin pelet uygulanan SÇ'deki sıçanlarda 72 saat sonunda plaseboya göre diyare görülme derecesi.



Şekil 4-3: Morfin pelet uygulanan SÇ'deki sıçanlarda 72 saat sonunda yapılan 15 dakika izlem sırasında plaseboya kıyasla vücut ağırlığı kaybı.



Şekil 4-4: SÇ'deki sıçanlara morfin pelet uygulamasının 72 saat sonunda plaseboya kıyasla hipokampus dPA göreceli PLAT % mRNA düzeyi üzerine etkisi.

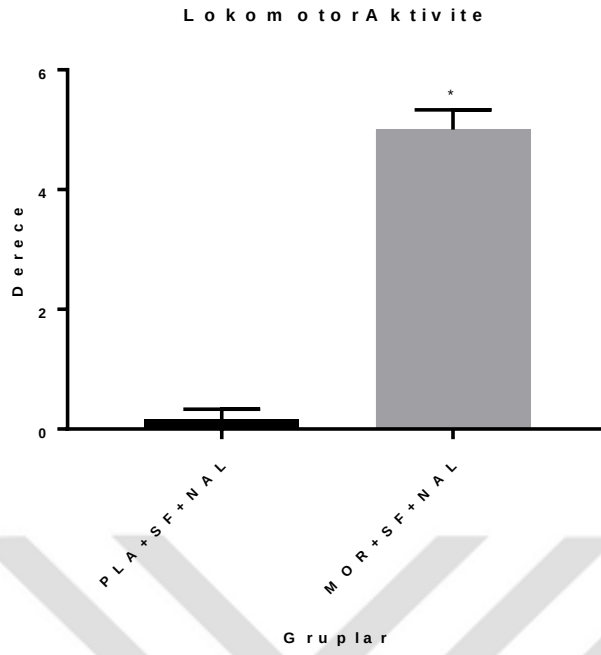
Standart çevre nalokson ile uyarılmış morfin yoksunluk sendromu

Morfin pelet uygulanmış deney gruplarında 72 saat sonra nalokson ile uyarılmış morfin yoksunluk sendromu beklenen davranış parametrelerinin belirgin olarak elde edildiği 15 dakikalık izlem sürecinde gözlemlendi (Tablo 4-2). Lokomotor aktivite, diyare ve vücut ağırlığı kaybı değerleri de NAL ile uyarılmış MOR yoksunluk sendromunda anlamlı olarak yüksek değerlerde bulundu (Şekil 4-5, Şekil 4-6, Şekil 4-7). Hipokampal doku plazminojen aktivatörü göreceli PLAT % mRNA değeri ise NAL ile uyarılmış MOR yoksunluk sendromu grubunda anlamlı olarak daha düşük saptandı (Şekil 4-8).

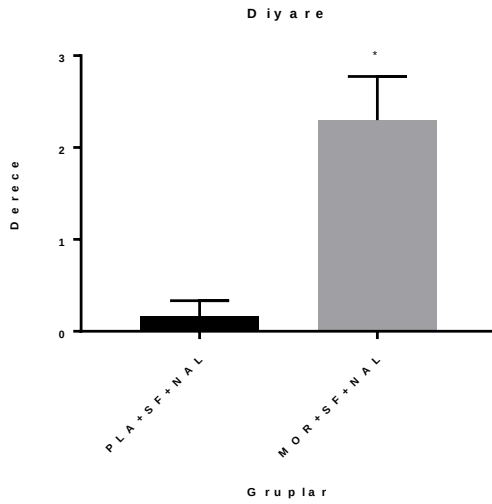
Tablo 4-2. Standart çevrede nalokson ile uyarılmış morfin yoksunluk sendromunun plaseboya kıyasla davranış parametreleri üzerine etkisi.

Gruplar	N	Sıçrama	Islak köpek titremesi	Diş Gıcırdatma	Şahlanma	Ptozis
SÇ-PLA+SF+NAL	6	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0
SÇ-MOR+SF+NAL	10	4.6±1.4*	5.1±1.3**	3.2±0.9***	12.4±1.9**	3.8±0.4**

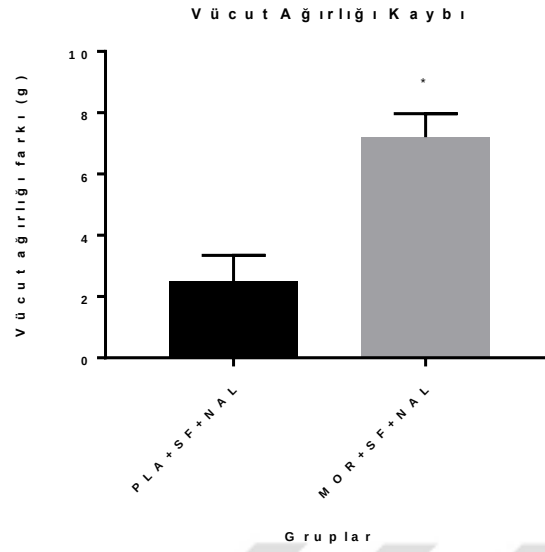
*P=0.0170, **P=0.0002, ***P=0.0016 (Mann Whitney U test)



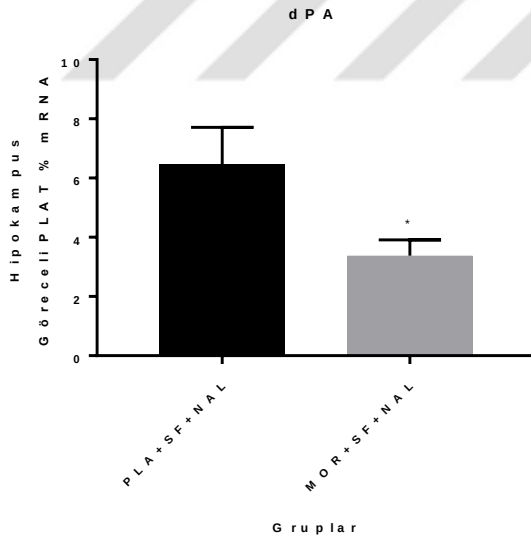
Şekil 4-5: Standart çevrede nalokson ile uyarılmış morfin yoksunluk sendromunun plaseboya kıyasla lokomotor aktivite üzerine etkisi. *P=0.0001 (Mann Whitney U test)



Şekil 4-6: Standart çevrede nalokson ile uyarılmış morfin yoksunluk sendromunda plaseboya kıyasla diyare derecesi. *P=0.0041 (Mann Whitney U test)



Şekil 4-7: Standart çevrede nalokson ile uyarılmış morfin yoksunluk sendromunda plaseboya kıyasla vücut ağırlığı kaybı. *P=0.0015 (Student'in t testi)



Şekil 4-8: Standart çevrede nalokson ile uyarılmış morfin yoksunluk sendromunun plaseboya kıyasla hipokampus dPA göreceli PLAT % mRNA düzeyi üzerine etkisi. *P=0.0205 (Student'in t testi)

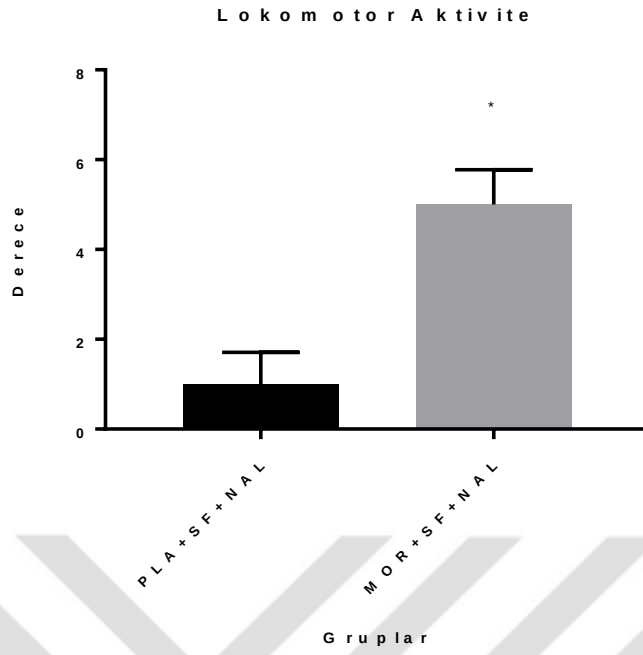
4.2. Zenginleştirilmiş çevre nalokson ile uyarılmış morfin yoksunluk sendromu

Zenginleştirilmiş çevreye alınmış morfin pelet uygulanmış deney grubunda 72 saat sonra nalokson ile uyarılmış morfin yoksunluk sendromu beklenen davranış parametrelerinin belirgin olarak elde edildiği 15 dakikalık izlem sürecinde gözlemlendi (Tablo 4-3). Lokomotor aktivite, diyare ve vücut ağırlığı kaybı değerleri de zenginleştirilmiş çevre NAL ile uyarılmış MOR yoksunluk grubunda zenginleştirilmiş çevre NAL uygulanan plasebo grubundan anlamlı olarak yüksek bulundu (Şekil 4-9, Şekil 4-10, Şekil 4-11). Hipokampal doku plazminojen aktivatörü göreceli PLAT % mRNA değeri ise NAL ile uyarılmış MOR yoksunluk sendromu ZÇ grubunda plaseboya göre daha düşük saptandı ancak bu fark istatistiksel olarak anlamlı değildi (Şekil 4-12).

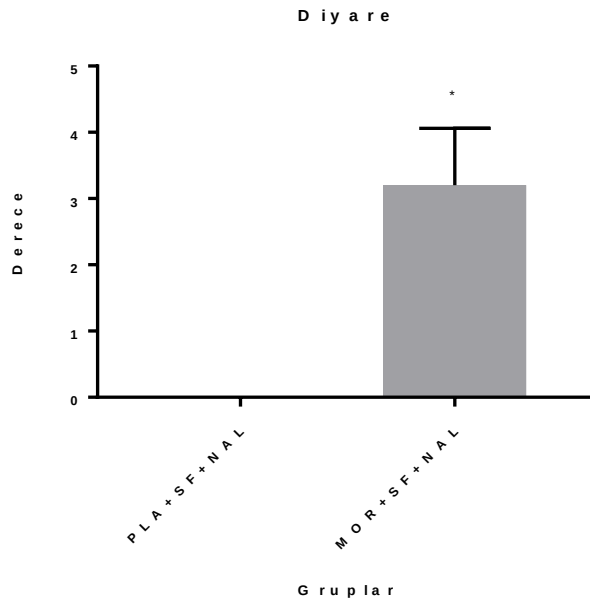
Tablo 4-3. Zenginleştirilmiş çevrede nalokson ile uyarılmış morfin yoksunluk sendromunun plaseboya göre davranış parametreleri üzerine etkisi.

Gruplar	N	Sıçrama	Islak köpek Titremesi	Diş Gıcırdatma	Şahlanma	Ptozis
ZÇ-PLA+SF+NAL	4	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	1.25±0.94	0.0±0.0
ZÇ-MOR+SF+NAL	5	6.6±2.3*	5.2±2.0*	6.2±1.4**	11.6±3.8***	4.2±0.3**

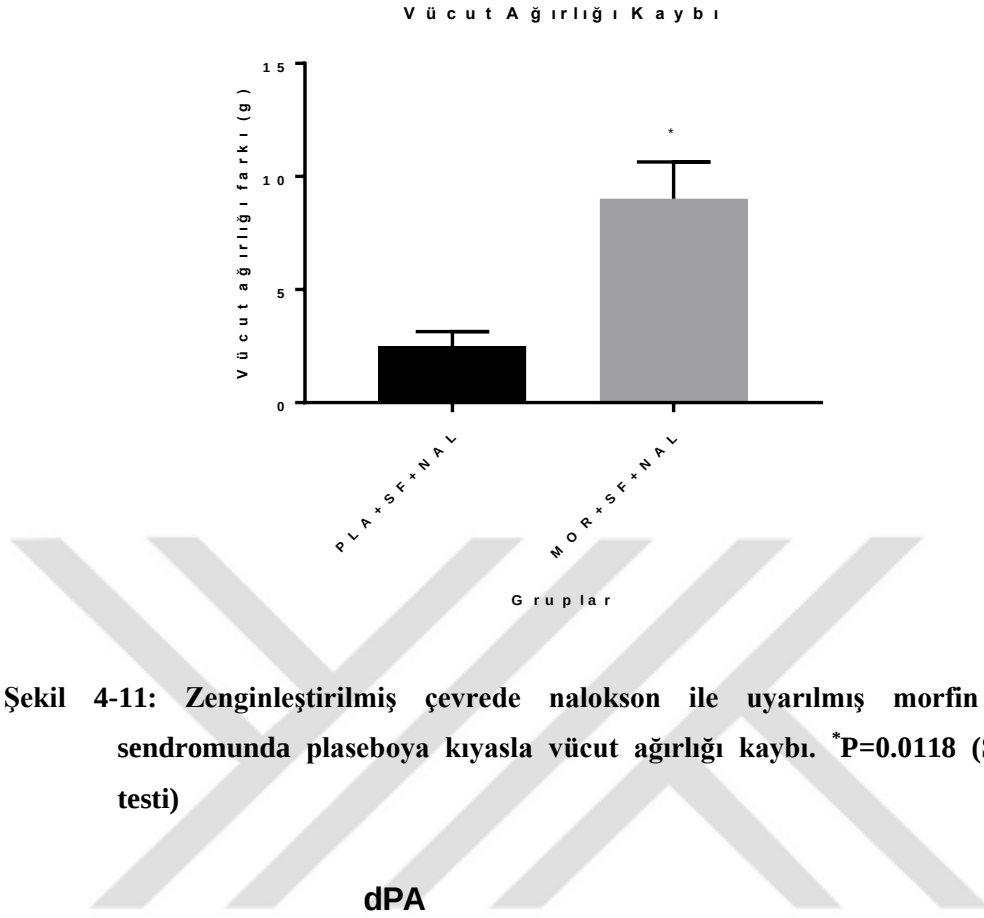
*P=0.0476, **P=0.0159, ***P=0.0317 (Mann Whitney U test)



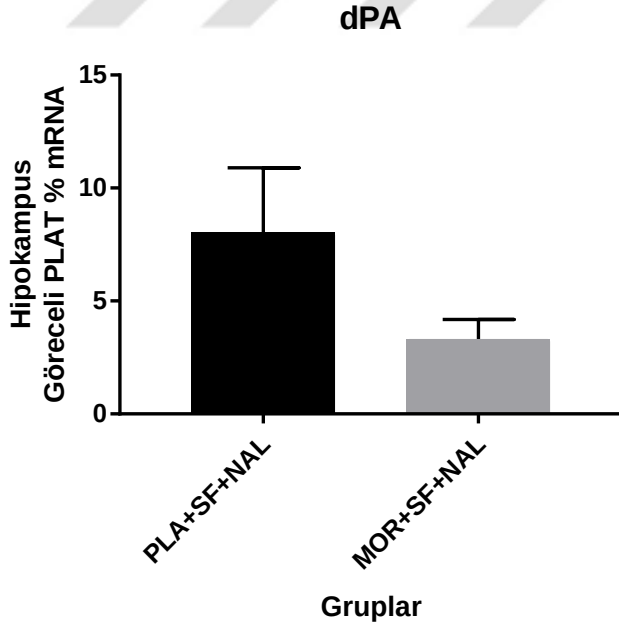
Şekil 4-9: Zenginleştirilmiş çevrede nalokson ile uyarılmış morfin yoksunluk sendromunda plaseboya kıyasla lokomotor aktivite derecesi. *P=0.0317 (Mann Whitney U test)



Şekil 4-10: Zenginleştirilmiş çevrede nalokson ile uyarılmış morfin yoksunluk sendromunda plaseboya kıyasla diyare derecesi. *P=0.0476 (Mann Whitney U test)



Şekil 4-11: Zenginleştirilmiş çevrede nalokson ile uyarılmış morfin yoksunluk sendromunda plaseboya kıyasla vücut ağırlığı kaybı. *P=0.0118 (Student'in t testi)



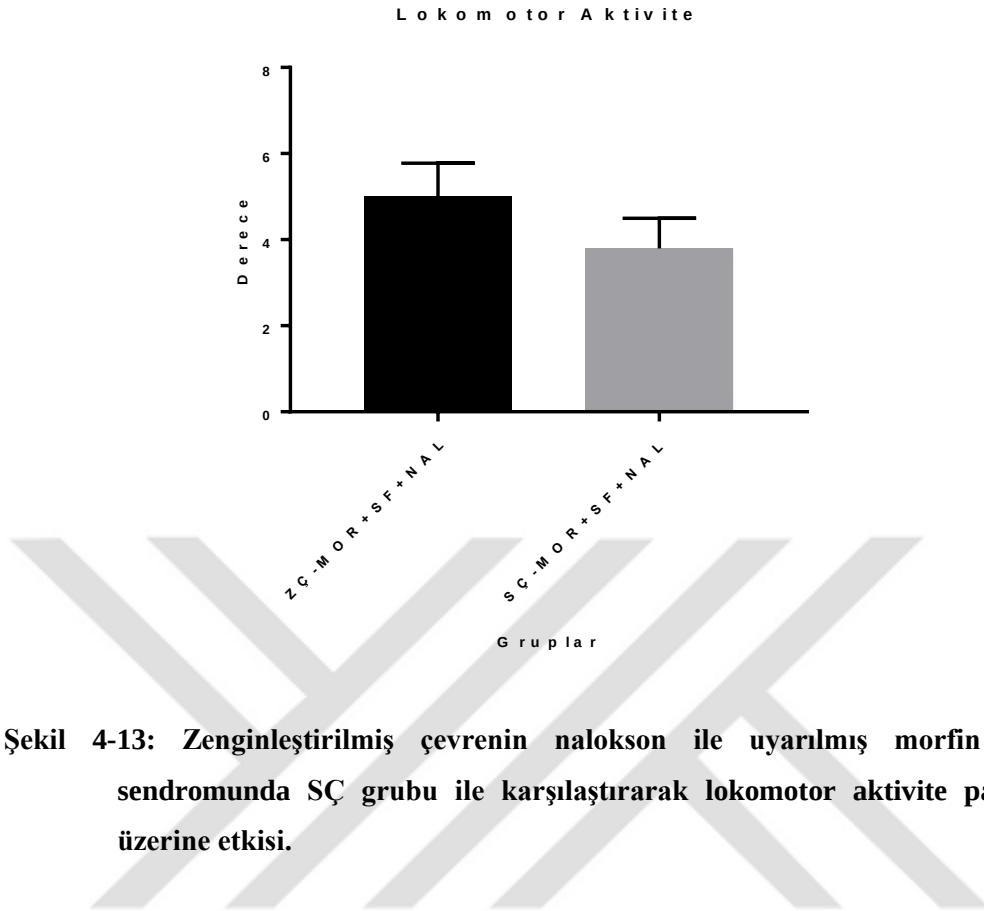
Şekil 4-12: Zenginleştirilmiş çevrede nalokson ile uyarılmış morfin yoksunluk sendromunun plaseboya kıyasla hipokampus dPA göreceli PLAT % mRNA düzeyi üzerine etkisi.

4.3. Standart çevre ve zenginleştirilmiş çevre morfin yoksunluk sendromu karşılaştırılması

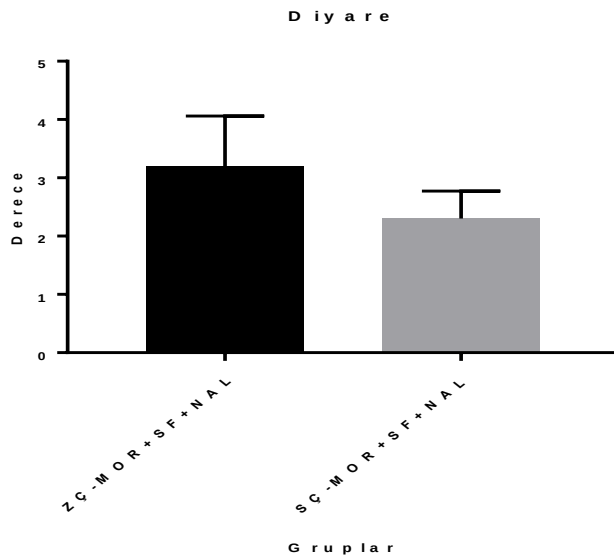
Zenginleştirilmiş çevreye alınmış MOR pelet uygulanmış ve standart çevreye alınmış MOR pelet uygulanmış gruplarda, 72 saat sonra nalokson ile uyarılmış morfin yoksunluk sendromu davranış parametreleri birbirine benzer bulundu, ZÇ grubunda bazı parametrelerdeki daha yüksek değerler istatistiksel olarak anlamlı elde edilmedi (Tablo 4-4). Lokomotor aktivite, diyare ve vücut ağırlığı kaybı değerleri de zenginleştirilmiş çevre NAL ile uyarılmış MOR yoksunluk sendromu grubunda istatistiksel olarak anlamlı olmaksızın biraz daha yüksekti (Şekil 4-13, Şekil 4-14, Şekil 4-15). Hipokampal doku plazminojen aktivatörü göreceli PLAT % mRNA değerleri ise her iki grupta birbirine yakın elde edildi (Şekil 4-16).

Tablo 4-4: Zenginleştirilmiş çevrenin standart çevre grubu ile karşılaştırarak nalokson ile uyarılmış morfin yoksunluk sendromu davranış parametreleri üzerine etkisi.

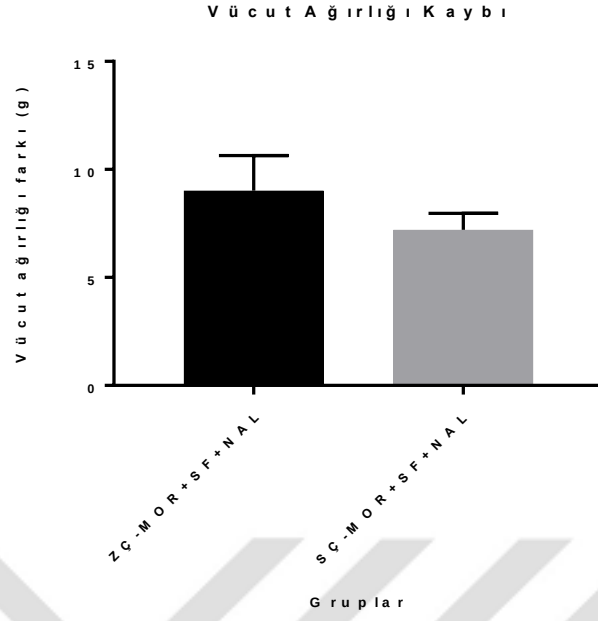
Gruplar	N	Sıçrama	Islak köpek Titremesi	Diş Gıcırdatma	Şahlanma	Ptozis
SÇ-MOR+SF+NAL	10	4.6±1.4	5.1±1.3	3.2±0.9	12.4±1.9	3.8±0.4
ZÇ-MOR+SF+NAL	5	6.6±2.3	5.2±2.0	6.2±1.4	11.6±3.8	4.2±0.3



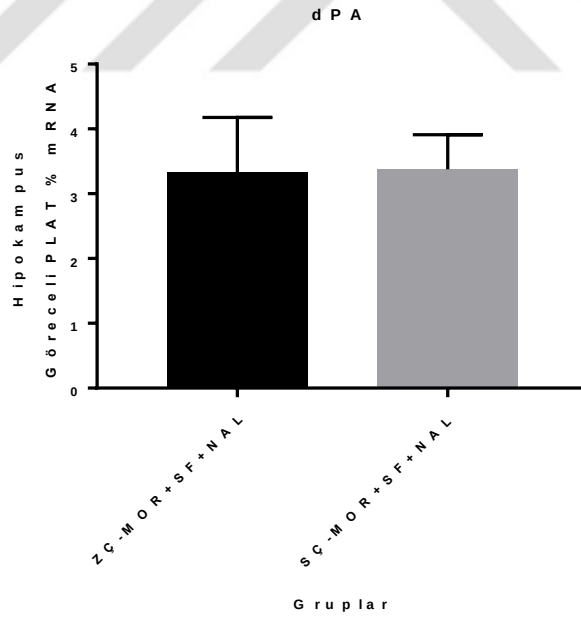
Şekil 4-13: Zenginleştirilmiş çevrenin nalokson ile uyarılmış morfin yoksunluk sendromunda SÇ grubu ile karşılaştırarak lokomotor aktivite parametreleri üzerine etkisi.



Şekil 4-14: Zenginleştirilmiş çevrenin nalokson ile uyarılmış morfin yoksunluk sendromunda SÇ grubu ile karşılaştırarak diyare üzerine etkisi.



Şekil 4-15: Zenginleştirilmiş çevrenin nalokson ile uyarılmış morfin yoksunluk sendromunda SÇ grubu ile karşılaştırarak vücut ağırlığı kaybı üzerine etkisi.



Şekil 4-16: Zenginleştirilmiş çevrenin nalokson ile uyarılmış morfin yoksunluk sendromunda SÇ grubu ile karşılaştırarak hipokampus dPA göreceli PLAT % mRNA düzeyi üzerine etkisi.

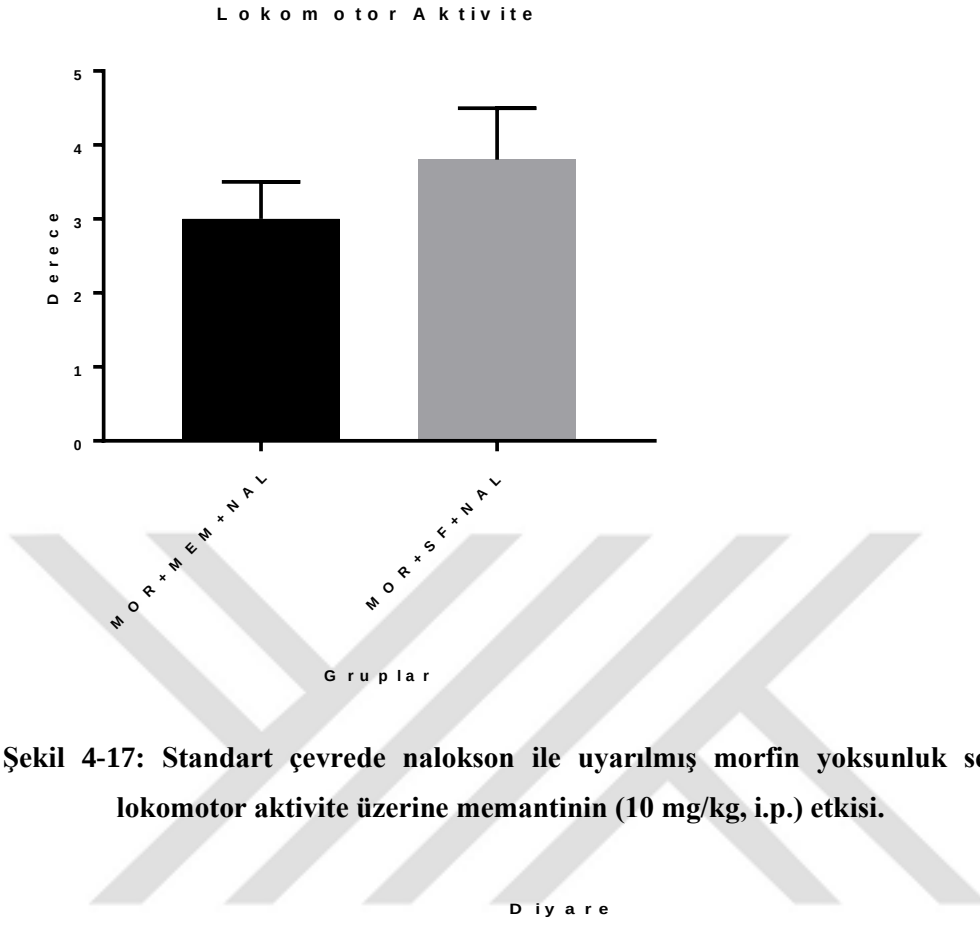
Standart çevrede morfin yoksunluk sendromu üzerine memantin etkisi

Standart çevre MOR pelet uygulanmış grupta 72 saat sonra yapılan NAL injeksiyonundan 30 dk. önce yapılan MEM grubunda davranış parametreleri NAL öncesi serum fizyolojik (SF) yapılan gruba göre sıçrama, dış gıcırdatma, şahlanma ve ptozis parametrelerinde daha düşük ıslak köpek titremesinde ise daha yüksek saptandı. Bu değişikliklerden dış gıcırdatma ve ptozis istatistiksel olarak anlamlı idi (Tablo 4-5). Lokomotor aktivite, diyare ve vücut ağırlığı kaybı değerleri de MEM uygulanan MOR yoksunluk grubunda daha düşüktü, bu fark, lokomotor aktivite dışında istatistiksel olarak anlamlı idi (Şekil 4-17, Şekil 4-18, Şekil 4-19). Hipokampal doku plazminojen aktivatörü göreceli PLAT % mRNA değerleri ise her iki grupta birbirine yakın elde edildi (Şekil 4-20).

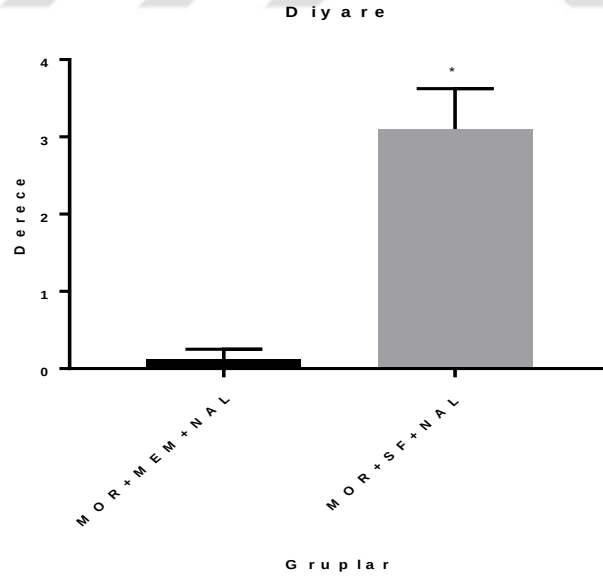
Tablo 4-5: Standart çevrede nalokson ile uyarılmış morfin yoksunluk sendromunun davranış parametreleri üzerine memantin (10 mg/kg, i.p.) etkisi.

Gruplar	N	Sıçrama	Islak köpek titremesi	Diş Gıcırdatma	Şahlanma	Ptozis
SÇ-MOR+SF+NAL	10	4.6±1.4	5.1±1.3	3.2±0.9	12.4±1.9	3.8±0.4
SÇ-MOR+MEM+NAL	8	1.3±0.7	7.1±2.5	0.6±0.3*	6.2±2.7	0.8±0.5**

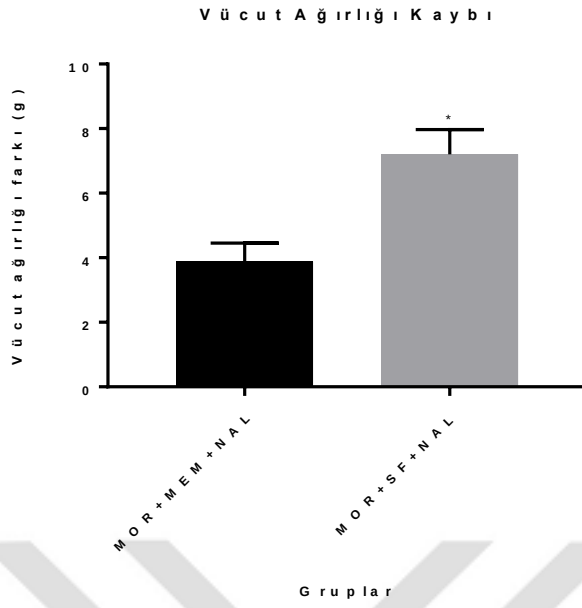
*P=0.0076, **P=0.0011 (Mann Whitney U test)



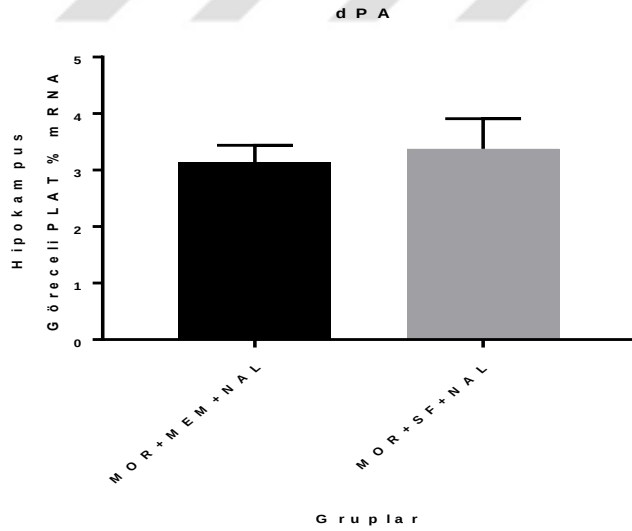
Şekil 4-17: Standart çevrede nalokson ile uyarılmış morfin yoksunluk sendromunda lokomotor aktivite üzerine memantin (10 mg/kg, i.p.) etkisi.



Şekil 4-18: Standart çevrede nalokson ile uyarılmış morfin yoksunluk sendromunda diyare üzerine memantin (10 mg/kg, i.p.) etkisi. *P=0.0004 (Mann Whitney U test)



Şekil 4-19: Standart çevrede nalokson ile uyarılmış morfin yoksunluk sendromunda vücut ağırlığı kaybı üzerine memantin (10 mg/kg, i.p.) etkisi. *P=0.0046 (Student'in t testi)



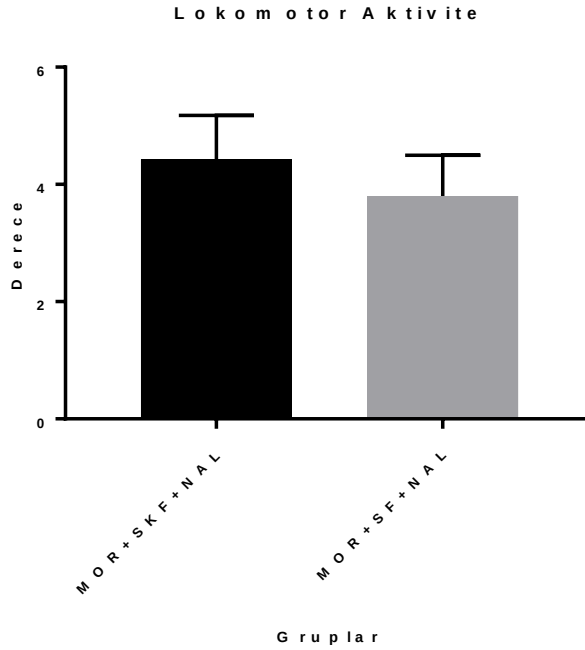
Şekil 4-20: Standart çevrede nalokson ile uyarılmış morfin yoksunluk sendromunda hipokampus tPA göreceli PLAT % mRNA düzeyi üzerine memantin (10 mg/kg, i.p.) etkisi. Standart çevrede morfin yoksunluk sendromu üzerine SKF82958'in etkisi

Standart çevre MOR pelet uygulanmış grupta 72 saat sonra yapılan NAL injeksiyonundan 30 dk. önce yapılan SKF82958 grubunda davranış parametrelerinden NAL öncesi serum fizyolojik (SF) yapılan gruba göre sıçrama ve ptozis parametreleri istatistiksel anlamlı olarak daha düşük elde edildi, ıslak köpek titremesi değerleri her iki grupta birbirine yakındı, diş gıcırdatma ve şahlanma ise istatistiksel anlamlı olmayarak SKF82958 grubunda daha yüksekti (Tablo 4-6). Lokomotor aktivite SKF82958 grubunda anlamlı olmayarak daha yüksek saptanırken, diare ve kilo kaybı değerleri SKF82958 uygulanan MOR yoksunluk grubunda anlamlı olarak daha yüksekti (Şekil 4-21, Şekil 4-22, Şekil 4-23). Hipokampal doku plazminojen aktivatörü göreceli PLAT % mRNA değerleri ise SKF82958 uygulanan grupta anlamlı olmayarak daha yüksek bulundu (Şekil 4-24).

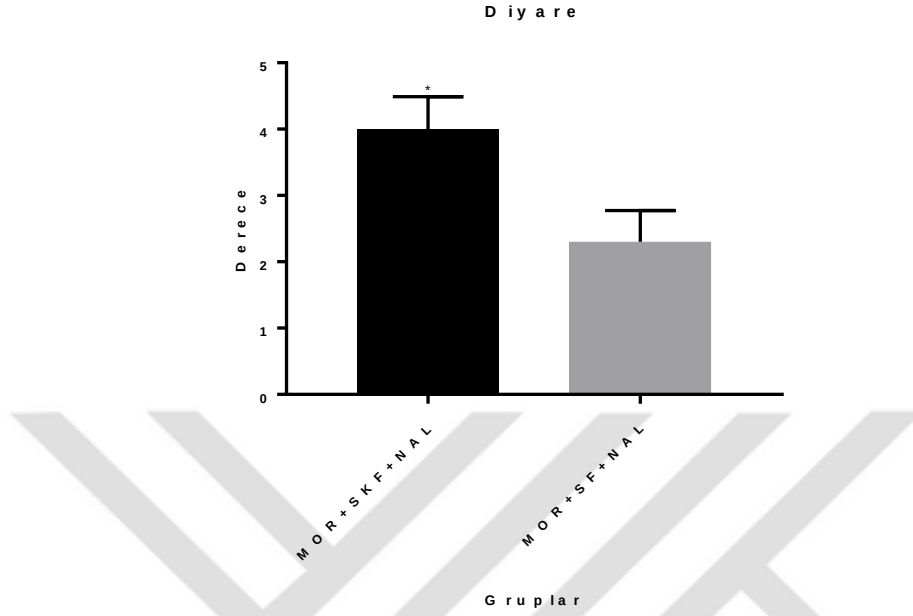
Tablo 4-6: Standart çevrede nalokson ile uyarılmış morfin yoksunluk sendromunun davranış parametreleri üzerine SKF82958'in (1 mg/kg, i.p.) etkisi.

Gruplar	N	Sıçrama	Islak köpek Titremesi	Diş Gıcırdatma	Şahlanma	Ptozis
SÇ-MOR+SF+NAL	10	4.6±1.4	5.1±1.3	3.2±0.9	12.4±1.9	3.8±0.4
SÇ-MOR+SKF+NAL	7	0.5±0.3*	5.1±1.0	4.8±1.8	27.7±7.8	1.4±0.6**

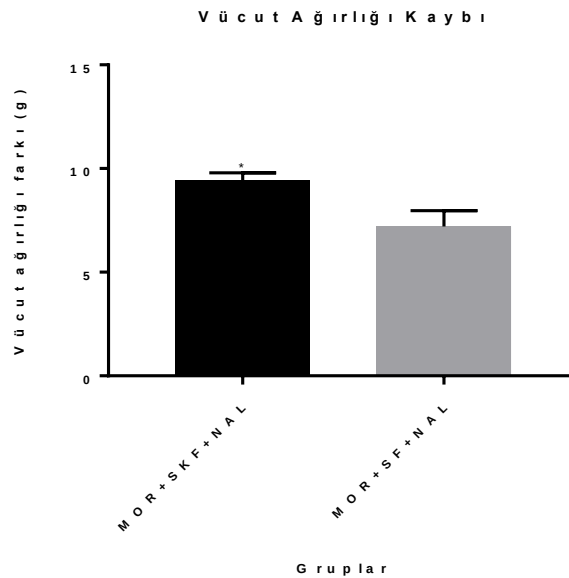
*P=0.0378, **P=0.0076 (Mann Whitney U test)



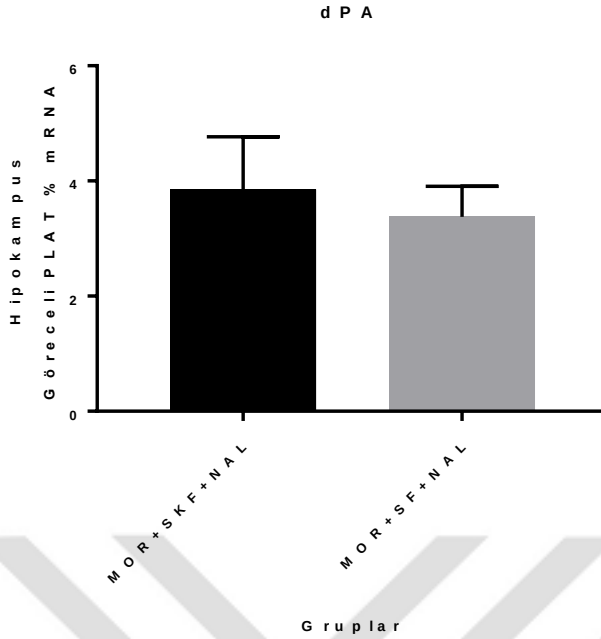
Şekil 4-21: Standart çevrede nalokson ile uyarılmış morfin yoksunluk sendromunda lokomotor aktivite üzerine SKF82958'in (1 mg/kg, i.p.) etkisi.



Şekil 4-22: Standart çevrede nalokson ile uyarılmış morfin yoksunluk sendromunda diyare üzerine SKF82958'in (1 mg/kg, i.p.) etkisi. *P=0.0364 (Mann Whitney U test)



Şekil 4-23: Standart çevrede nalokson ile uyarılmış morfin yoksunluk sendromunda vücut ağırlığı kaybı üzerine SKF82958'in (1 mg/kg, i.p.) etkisi. *P=0.0381 (Student'in t testi)



Şekil 4-24: Standart çevrede nalokson ile uyarılmış morfin yoksunluk sendromunda hipokampus dPA göreceli PLAT % mRNA düzeyi üzerine SKF82958'in (1 mg/kg, i.p.) etkisi.

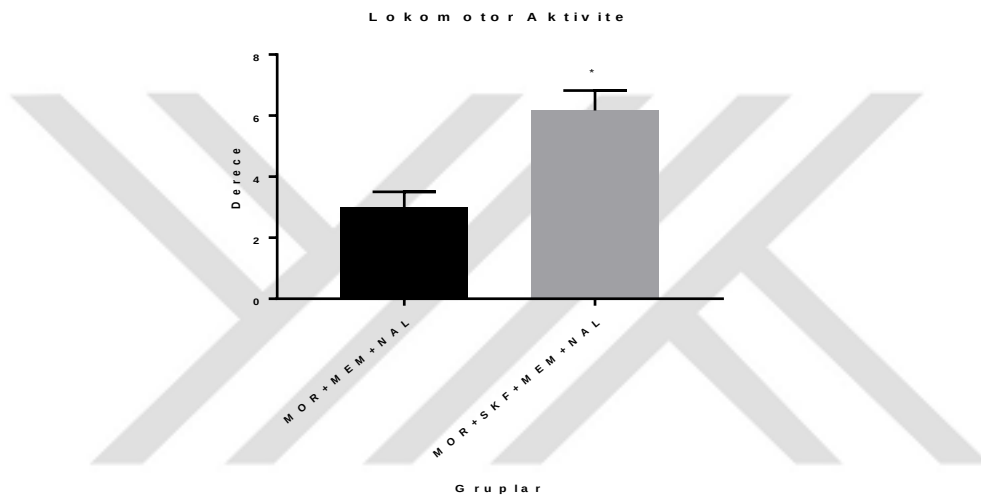
4.4. Standart çevrede memantin uygulanmış nalokson ile uyarılmış morfin yoksunluk sendromunun davranış parametreleri üzerine SKF82958'in etkisi

Standart çevre MOR pelet uygulanmış grupta 72 saat sonra yapılan NAL injeksiyonundan önce SKF82958 ve MEM yapılan grupta, NAL öncesi sadece MEM yapılan gruba göre ptozis daha düşük iken diğer davranış parametreleri daha yüksek değerlerde bulundu, bunlardan dış gıcırdatma ve şahlanmadaki yükseklik istatistiksel anlamlı idi (Tablo 4-7). Lokomotor aktivite, diare ve vücut ağırlığı kaybı değerleri SKF82958 ve MEM yapılan grupta sadece MEM uygulanan gruba göre istatistiksel anlamlı olarak daha yüksek saptandı (Şekil 4-25, Şekil 4-26, Şekil 4-27). Hipokampal doku plazminojen aktivatörü göreceli PLAT % mRNA değerleri, istatistiksel anlamlı olmayarak SKF82958 ve MEM uygulanan grupta daha yüksek bulundu (Şekil 4-28).

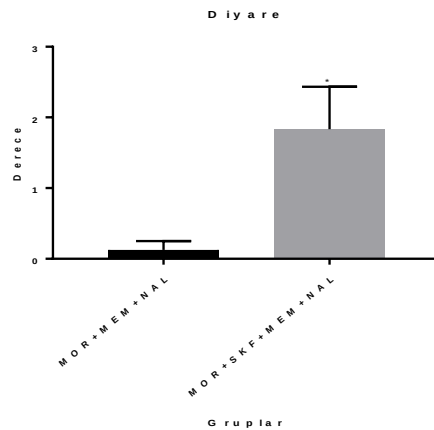
Tablo 4-7: Standart çevrede, memantin (10 mg/kg, i.p.) uygulanmış nalokson ile uyarılmış morfin yoksunluk sendromunun davranış parametreleri üzerine SKF82958'in (1 mg/kg, i.p.) etkisi.

Gruplar	N	Sıçrama	Islak köpek titremesi	Diş Gıcırdatma	Şahlanma	Ptozis
SÇ-MOR+MEM+NAL	8	1.3±0.7	7.1±2.5	0.6±0.3	6.2±2.7	0.8±0.5
SÇ-MOR+SKF+MEM+NAL	6	2.8±1.2	7.8±2.1	4.0±1.5*	22.0±4.1**	0.0±0.0

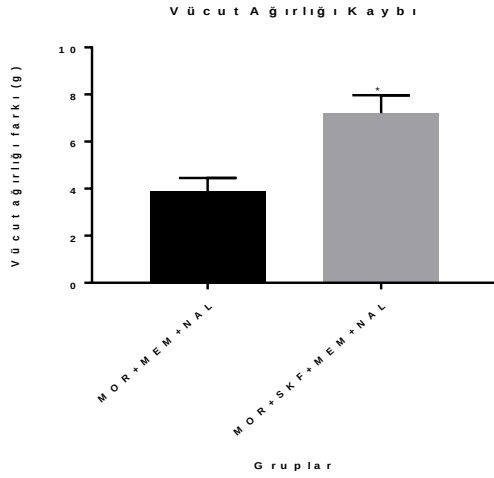
*P=0.0336, **P=0.0176 (Mann Whitney U test)



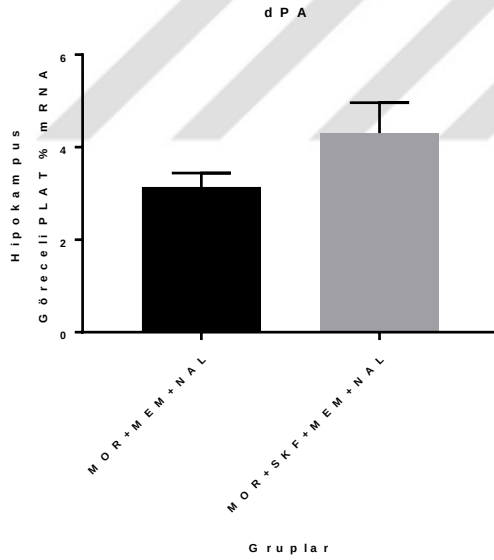
Şekil 4-25: Standart çevrede, memantin (10 mg/kg, i.p.) uygulanmış nalokson ile uyarılmış morfin yoksunluk sendromunun lokomotor aktivite düzeyi üzerine SKF82958'in (1 mg/kg, i.p.) etkisi. *P=0.0057 (Mann Whitney U test)



Şekil 4-26: Standart çevrede, memantin (10 mg/kg, i.p.) uygulanmış nalokson ile uyarılmış morfin yoksunluk sendromunun diyare düzeyi üzerine SKF82958'in (1 mg/kg, i.p.) etkisi. *P=0.0083 (Mann Whitney U test)



Şekil 4-27: Standart çevrede, memantin (10 mg/kg, i.p.) uygulanmış nalokson ile uyarılmış morfin yoksunluk sendromunun vücut ağırlığı kaybı düzeyi üzerine SKF82958'in (1 mg/kg, i.p.) etkisi. *P=0.0046 (Student'in t testi)



Şekil 4-28: Standart çevrede, memantin (10 mg/kg, i.p.) uygulanmış nalokson ile uyarılmış morfin yoksunluk sendromunun hipokampus dPA göreceli PLAT % mRNA düzeyi üzerine SKF82958'in (1 mg/kg, i.p.) etkisi.

5. TARTIŞMA

Morfin bağımlılık mekanizmaları, diğer sistemlerin katkısı da dışlanmayarak esas olarak glutamaterjik sistem ve dopaminerjik sistem ile ilişkili bulunmakta, glutamaterjik sistemin özellikle bağımlılık gelişiminde sinaptik plastisite zemininde sorumlu olabileceği düşünülmektedir (Tzschentke ve Schmidt 2003; Kim ve ark. 2016). Son yıllarda, doku plazminojen aktivatörünün, sinaptik plastisite belirteci olabileceği doğrultusunda bulgular rapor edilmekte (Samson ve Medcalf 2006), madde bağımlılığı gelişimi zemininde de rolü olabileceği düşünülmektedir (Nagai ve ark. 2004; Yamada ve ark. 2005). Morfin bağımlılığının nörobiyolojik zemininde sözkonusu sistemlerin ve oluşumların aralarındaki etkileşim iyi bilinmemektedir.

Bu tez projesi ile morfin bağımlılığı biyolojik zemininde glutamaterjik, dopaminerjik sistemler ve dPA'nın rolünün birbirleri ile etkileşimleri ile anlaşılması amaçlanarak, nalokson ile başlatılan morfin yoksunluk sendromu üzerine sinaptik plastisiteyi uyaran zenginleştirilmiş çevre, NMDA reseptör antagonisti memantin ve dopamin D1 reseptör agonisti SKF82958'nin etkileri incelenmiş, beyin öğrenme-bellekle ilgili işlevi olan bölümlerinden hipokampusta dPA mRNA değişimi ilgili deney gruplarında saptanmıştır.

Bu çalışmada nalokson ile başlatılan morfin yoksunluk sendromu modeli, SÇ de tutulan hayvanlarda plasebo pelete göre morfin pelet grubunda elde edilen sonuçlarla çalışmalarımızda kullanılacak parametreler için bazal değerleri oluşturmuştur. NAL uygulanmayan gruplardan plasebo grubuna göre MOR grubunda davranışsal ve somatik belirtiler anlamlı olarak farklı bulunmamıştır.

Tüm deney gruplarında morfin yoksunluk sendromu sırasında gözlenen stereotipik davranışlar ve somatik bulgulara ait elde edilen değerler ayrı ayrı karşılaştırılmıştır. Literatür incelendiğinde, bu şekilde bulguların ayrı ayrı değerlendirilmesi olduğu gibi bazı çalışmalarda, sıçrama tek başına yoksunluğun major belirtisi olarak incelenirken (Nemoto ve ark. 2013), bazı çalışmalarda yoksunluk sırasında gözlenen davranış belirtileri toplam bir değer ile ifade edilerek morfin yoksunluk değerlendirilmektedir (Gellert ve Holtzman 1978; Espejo ve ark. 2001; Chartoff ve ark. 2006). Bu tür farklılıklar, çelişkili sonuçlar elde edilmesine yol açmakla birlikte tüm raporlara bakılarak genel bir değerlendirme olanağı da sunmaktadır. Morfin

yoksunluk bulgularının, uygulanan maddeden genel olarak etkilenme yönünün toplam bir değer olarak ifade edilmesi elde edilen sonucun kolayca değerlendirilmesini sağlayabilir. Uygulanan maddenin, yoksunluk belirtileri üzerine etkilerini tek tek değerlendirmek ise klinik çalışmalar için daha güvenli bir yorumlama yolu açabilmektedir. Bu çalışma ile elde edilen yoksunluk bulgularının analizi tek tek yapılmış, sonuçların değerlendirmesinde literatürde yer alan çalışmalar ile bütünlüyci bir tartışma yapılmaya çalışılmıştır.

Morfin bağımlılığının şiddeti, nalokson ile başlatılan yoksunluk sendromunun şiddeti ile uyumludur (Martin 1967). Zenginleştirilmiş çevrede tutulan hayvanlarda MOR yoksunluk sendromunun bazı parametrelerinde, SÇ grubuna göre hafif olarak daha yüksek değerler elde edilmiş ancak bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Elde edilen bu farkların anlamlı bulunmaması, ZÇ grubundaki hayvan sayısının ve zenginleştirilmiş çevrede tutulma süresinin yeterli olmamasından ya da kafesin zenginleştirme tarzından kaynaklanabilir. ZÇ'de tutulma süresi çeşitli çalışmalarda farklı olabilmekle birlikte bir ay süre genellikle yeterli bulunmaktadır (Zhang 2015). Kafesin zenginleştirme tarzı da çoğu çalışma ile uyumlu olarak yapılmıştır (Rema ve ark. 2006). Opiyatların davranışsal etkilerine duyarlılığı, ZÇ'nin ne yönde etkilediğini inceleyen az sayıda çalışma vardır. Bazı çalışmalarda, ZÇ'nin, erkek sıçanları MOR'in ödüllendirici etkilerine (Bardo ve ark. 1997) ve dişi sıçanları ise MOR'in aversif etkilerine (Smith ve ark. 1998) daha duyarlı kıldığı saptanırken, başka bir çalışmada dişi sıçanların opiyat reseptör agonistlerinin etkilerine duyarlılığını ZÇ'nin değiştirmediği raporlanmıştır (Smith ve ark. 2008). Diğer yandan, bağımlılığa ve tutkunluğa yol açan bazı ilaç ya da maddelerin akut ve kronik etkilerini ZÇ'nin baskıladığı gösterilmiştir (Bardo ve ark. 1997; Green ve ark. 2003; Solinas ve ark. 2008). Böylelikle, ZÇ'de MOR'in etkilerine duyarlılığın erkek sıçanlarda arttığı görülürken, tez projesi ile elde edilen bulgularla MOR yoksunluk sendromu şiddetini ZÇ'nin anlamlı değiştirmediği saptanmıştır. Bardo ve ark. çalışmasında (1997) mü opiyat reseptör yoğunluğu ve MOR'in dopamin sentezini mezolimbik ve nigrostriatal yollaklarda uyarması üzerine ZÇ ve SÇ grupları arasında fark bulunmazken, MOR'in uyardığı lokomotor aktivite, ZÇ'de daha az gerçekleşmiş ancak MOR'e bağlı koşullu yer tercihinin ZÇ grubuna daha fazla geliştiği saptanmıştır. Bu sonuçlara göre MOR'in lokomotor ve ödüllendirici etkilerinin farklı nöral yapılarla ilgili olabileceği düşünülmüştür. Burada olduğu gibi bazı çalışmaların SÇ koşullarının tez projesi SÇ

koşullarından ayıran bir özellik de hayvanların, ZÇ kafeslerinde çalışmamızda olduğu gibi çoklu gruplar halinde olmalarına karşın SÇ’de tek tek tutulmalarıdır. Hayvanların kafesde tek olarak tutulması depresyon oluşturduğundan (Kuramochi ve Nakamura 2009), depresyonun sonuçlar üzerine etkilerini dışlamak için sunulan çalışmada SÇ kafeslerinde sıçanlar 5’li gruplar halinde barındırılmıştır. ZÇ’nin, MOR yoksunluk sendromu üzerine etkisini sıçanlarda inceleyen bir çalışmada, ZÇ’nin yoksunluk sendromu parametrelerini baskıladığı, bu sırada görülen anksiyete ve depresyon ilişkili davranışları azalttığı gösterilmiştir (Hammami-Abrand Abadi ve ark. 2016). Çelişkili sonuçlardan ZÇ’nin ve SÇ’nin nasıl oluşturulduğu, ZÇ’de geçen süre ve hayvanların yaş grubu, türü gibi değişkenlerin etkileri sorumlu olabilir. Hammami-Abrand Abadi ve ark. çalışmasında (2016) ZÇ, çok sayıda cisim ile ve sıkça cisimler ya da cisimlerin yeri değiştirilerek oluşturulmuş, hayvanlar 14 gün ZÇ’de tutulmuşlardır. Bu çalışma, tez projesinden, kullandığımız ZÇ’nin daha sade olması ve çalışma boyunca aynı kalması ve hayvanların bir ay boyunca ZÇ’de kalmaları ile ayrılmaktadır. Diğer yandan, MOR bağımlılığı oluşturma yöntemleri de her iki çalışmada farklıdır. Çalışmamızda sürekli yenilik stres kaynağı olabileceği (Moncek ve ark. 2004) için zenginleştirilmiş ortam sabit tutulmuştur. Önceki çalışmalarımızda da kullandığımız benzer ZÇ ortamı ile genç ve yaşlı sıçanların öğrenme-bellek performanslarının arttığı saptanmış, böylelikle fizyolojik sinaptik plastisitenin gelişmesinin uyarıldığı yönünde bulgulara ulaşılmıştır (Yamantürk-Çelik ve ark. 2011; Uğur ve Yamantürk-Çelik 2006).

Tez çalışması sonuçlarına göre hipokampusta dPA mRNA düzeyi, NAL ile başlatılan MOR yoksunluk sendromu gruplarında azalmış, her iki kafes koşullarında ise birbirine yakın değerlerde bulunmuştur. Başka bir deyişle, hipokampusta dPA mRNA düzeyi, yoksunluk sendromunda çevre koşullarından bağımsız olarak azalır görünmektedir. Bu azalma, NAL uygulanan SÇ-plasebo grubuna kıyasla SÇ-MOR yoksunluk grubunda anlamlı olup, NAL uygulanan ZÇ-plasebo grubuna kıyasla ZÇ-MOR yoksunluk grubunda anlamlı bulunmamıştır. Bu durum ZÇ grubundaki hayvan sayısının az olmasından kaynaklanabilir. Madde etkisi altında olmadan ZÇ’de yetişen sıçanlarda dPA hipokampusta artmaktadır (Hori-Hayashi ve ark. 2011). Çalışmamızda, ZÇ’nin bu etkisi doğrudan incelenmemiştir ancak NAL uygulanan SÇ ve ZÇ plasebo grupları arasında hipokampus dPA mRNA düzeyleri karşılaştırılması anlamlı olarak farklı bulunmamıştır. Bu sonuç, gruplardaki hayvan sayısının azlığı ile ilgili olabilir. Öte yandan, Nemoto ve ark. (2013), farelerin prefrontal kortekslerinde dPA anlatımının

(ekspresyonu) MOR etkisi altında ve NAL ile başlatılan MOR yoksunluk sırasında arttığını göstermişlerdir. Beyin bölgesi ve tür farkı uyumsuz sonuçlardan sorumlu olabilir.

MOR'in, farelere tek doz uygulanması ile nukleus akumbensde dPA mRNA düzeyinin ve protein anlatımının NAL duyarlı bir şekilde arttığı, MOR'in yinelenen uygulamalarında ise bu etkisinin azaldığı saptanmıştır (Nagai ve ark. 2004). Sözkonusu çalışmada, NAL, MOR'in akut olarak artırdığı tPA'yı düşürmüştür. Aynı çalışmada, MOR'e bağlı koşullu yer tercihinin ve lokomotor aktivite artışının, dPA taşımayan genetik oynanmış farelerde belirgin azaldığı ve buna MOR'nin nukleus akumbensde dopamin salıverdiren etki kaybının eşlik ettiği görülmüştür.

MEM ya da SKF82958 uygulanan MOR yoksunluk gruplarında ise hipokampus dPA mRNA düzeyleri MOR yoksunluk kontrol grubuna göre anlamlı değişmemiştir. Her iki maddenin MOR yoksunluk sendromunun diğer bazı parametrelerini anlamlı etkilediği saptanırken, yoksunluk sırasında azaldığı saptanan hipokampus dPA mRNA düzeyini etkilememeleri, dPA'nın yoksunluk sırasında glutamaterjik ve dopaminerjik sırası ile NMDA ve D1 reseptörlerden başka alt reseptörler ile ilişkili mekanizmalar ile azaldığını düşündürebilir. Zira, hipokampal nöronlarda glutamat uyarımından sonra metabotropik glutamat reseptörleri aracılığı ile dPA'nın arttığı gösterilmiştir (Shin ve ark. 2004). MOR yoksunlukta dPA değişimi bu sistemlerden bağımsız olarak da gelişmiş olabilir. Diğer yandan, kullanılan MEM ve SKF82958 dozlarının dPA üzerine etkileri için yetersiz kaldığı da düşünülebilir.

Memantin genel olarak yoksunluk parametrelerini baskılamışken MEM etkisi altında hipokampal dPA değerlerinde anlamlı farklılık elde edilmemiştir. Davranış parametrelerinden sıçrama, dış gıcırdatma, şahlanma ve ptozis değerleri MEM grubunda belirgin azalmış, bunlardan dış gıcırdatma ve ptozisteki azalma istatistiksel anlamlı bulunmuştur. Yoksunluğun diğer bulgularından diyare ve vücut ağırlığı kaybı da istatistiksel anlamlı olarak azalmıştır. Genel olarak baskılama yönünde elde edilen bulgular NMDA antagonistlerinin MOR yoksunluk sendromunu baskıladığı diğer çalışmalarla uyumludur (Koyuncuoğlu ve ark. 1992; Koyuncuoğlu ve ark. 1994; Trujillo ve Akil 1994). MEM'in farelerde koşullanmış yer tercihi testinde morfine ve ilaç dışı yiyecek ve cinsel pekiştirici faktörler üzerine etkileri araştırılmış morfinin ve cinsel pekiştiricinin etkisini baskıladığı gösterilmiş ve baskılayıcı etkisinin böylece

yiyecek dışında ilaç pekiştiricilerle sınırlı olmayabileceği ileri sürülmüştür (Popik ve ark. 2003). Bunun yanı sıra, koşullanmış yer tercihi testinde farelerin MOR'e karşı sönümlenmiş yer tercihinin tekrar kazanılmasını MEM'in önlediği, böylelikle madde alımı nükslerini önleyebileceği ileri sürülmüştür (Popik ve ark. 2006). Söz konusu çalışmada, MEM'in olası nüks önleyici etkisinin bu dozlarda öğrenmeyi bozmadığından buna bağlanamayacağı belirtilmiştir. Bir başka çalışmada, erişkin sıçanlarda öğrenmeyi delikli kutu testinde bozmadığı ancak bellek performansını aynı düşük dozlarda bozduğu gösterilmiştir (Creeley ve ark. 2006). Öte yandan, MEM aynı dozda yaşlı sıçanlarda üç-panelli pist testinde bellek performansını artırmaktadır (Uğur ve Yamantürk-Çelik 2006). Tüm bu sonuçlar, MEM'in diğer bilinen NMDA antagonistlerinden farklı olarak düşük dozlarda santral sinir sistemi üzerine ciddi istenmeyen etkiler göstermediğini düşündürmektedir. MOR bağımlılığı gelişimi ve MOR yoksunluğu üzerine MEM ve MK-801'in etkilerinin incelendiği bir çalışmada, koşullanmış alan kaçınmada her ikisinin ve MOR yoksunluğu üzerine ise yalnız MEM'in baskılayıcı etkileri saptanmış, her iki NMDA antagonisti ile eş-zamanlı MOR uygulanmasının ise güçlü bir şekilde bağımlılık gelişimini önlediği sıçanlarda gösterilmiştir (Maldonado ve ark. 2003). Bununla birlikte, MEM'in deneysel etkilerini bir klinik çalışma destekler görünmektedir. Şöyle ki; MEM'in eroin bağımlısı yedi kişide naloksonla başlatılan yoksunluk belirtilerini baskıladığı bildirilmiştir (Bisaga ve ark. 2001). Tek olan bu çalışmanın sonucu daha geniş, kontrollü klinik çalışmalarla incelenmelidir. Deneysel çalışmalara göre de MEM'in, MOR bağımlılarının detoksifikasyonu sırasında kullanılması yönünde öneriler vardır (Popik ve Skolnick. 1996; Harris ve ark 2008).

SKF82958, kontrol grubuna göre sıçrama ve ptozisi anlamlı olarak baskımlarken diyare ve vücut ağırlığı kaybını anlamlı olarak şiddetlendirmiştir. Şahlanmayı ise belirgin olarak artırmaya karşın bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Ayrıca bu grupta lokomotor aktivite ve hipokampus dPA değerleri hafif yüksek bulunmuş, ancak istatistiksel olarak anlamlı elde edilmemiştir. Dopaminerjik etkinlik MOR yoksunluk sırasında azalmaktadır (Adinoff 2004; Radke ve Gewirtz 2012). Bu nedenle dopaminerjik etkinliğin artırılması yoksunluk şiddetini baskılayabilir, çalışmanın bulgularından sıçrama ve ptozisin anlamlı azalması bu öngörüye karşılamaktadır. Diyare ve dolayısı ile vücut ağırlığı kaybının anlamlı artması ve şahlanma ve lokomotor aktivitenin istatistik anlamlı olmayarak artışı ise bu öngörüye

ters bulgularlardır. Bu bulgular, SKF82958'in sıçanlarda lokomotor aktiviteyi artırdığını bildiren çalışma ile uyumlu bir sonuçtur (Kim ve ark. 2001). Yine kısmen uyumlu olarak SKF82958'in, MOR yoksunluk belirtilerini baskıladığı gösterilmiştir (Chartoff ve ark. 2006). Öte yandan SKF82958, kendine verme etkisi olduğu gösterilmiştir (Self ve ark. 1996).

Diğer yandan, SKF82958, memantin baskıladığı parametreleri geriye çevirmiştir. SKF82958'in MEM öncesi uygulanması ile dış gıcırdatma, şahlanma, lokomotor aktivite, diyare ve vücut ağırlığı kaybı tek başına MEM uygulanan gruba göre anlamlı olarak daha fazla gerçekleşmiştir. Bu sonuç, çalışmamızda saptanan SKF82958'in tek başına bazı yoksunluk parametrelerini şiddetlendirme eğilimi ile uyumlu görünmektedir. Glutamaterjik ve dopaminerjik sistemler arasında anatomik ve fonksiyonel olarak karşılıklı bir etkileşimin bulunduğu bilinmektedir (Christie ve ark 1987; Gorelova ve Yang 1997; Kim ve ark 2001; Floresco ve ark. 2001). Bu etkileşim sonucu, MOR bağımlılığı gelişimi ve karşı mekanizmalarla yoksunluğun nörobiyolojik zemini oluşur görünmektedir.

5.1. SONUÇ

Elde edilen sonuçlar,

- 1) Morfin bağımlılığı tedavisinde NMDA reseptör antagonisti MEM'in etkili bir detoksifikasyon ilacı olabileceğini,
- 2) MEM ve geliştirilebilecek başka etkili ve güvenli NMDA reseptör antagonistlerinin MOR bağımlılığı ve tutkunluğunda nöksleri önleme olası etkilerinin ileri araştırmalarla incelenmesi gerektiğini,
- 3) Dopamin D1 reseptör agonisti SKF82958'in, MOR yoksunluğu sırasındaki dopaminerjik etkinliğin azalmasını karşılayarak yoksunluk şiddetini hafifletebileceği varsayımının geçerli olabileceğini ancak bazı yoksunluk belirtilerini şiddetlendirebileceğinin göz önüne alınması gerektiği, daha etkili başka dopaminerjik reseptör agonistleri geliştirilmesinin uygun olabileceği ve bu agonistlerin bağımlılık yapma potansiyelinin test edilmesi gerektiğini,
- 4) Hipokampusun MOR bağımlılığı gelişiminde önemli bir beyin bölgesi olduğunu ve sinaptik plastisite ilişkili dPA'nın MOR bağımlılığı ve tutkunluğu gelişiminin ve yinelenen madde arayışının altındaki mekanizmalardan sorumlu olabileceğini, yoksunluk sırasında azalmasının ileri

araştırmalarla incelenmesi gerektiğini, ayrıca dPA'ne yönelik etkili maddelerin MOR bağımlılığındaki etkilerinin araştırılması gerektiğini,

- 5) İleri çalışmaların daha geniş deney gruplarında ve doz-yanıt ilişkisi sorgulanarak yapılması gerektiğini,
- 6) Glutamaterjik ve dopaminerjik sistemlerin morfin bağımlılık mekanizmalarında birbirleri ile etkileşimli olarak rol aldıklarını, bu etkileşim üzerinden MOR bağımlılığı etkili tedavi yollarının aranması gerektiğini düşündürmektedir.



6. KAYNAKLAR

Adinoff, B. (2004). Neurobiologic processes in drug reward and addiction. *Harvard Review of Psychiatry* **12**, 305-320.

Allahverdiyev, O., Nurten, A. ve Enginar, N. (2011). Assesment of rewarding and reinforcing properties of biperiden in conditioned place preference in rats. *Behavrioral Brain Research* **225**, 642-645.

Aracava, Y., Pereira, E.F., Maelicke, A. ve Albuquerque, E.X. (2005). Memantine blocks $\alpha 7^*$ nicotinic acetylcholine receptors more potently than N-methyl-D-aspartate receptors in rat hippocampal neurons. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **312**, 1195-1205.

Bardo, M.T., Robinet, P.M. ve Hammer, R.F. Jr. (1997). Effect of differential rearing environments on morphine-induced behaviors, opioid receptors and dopamine synthesis. *Neuropharmacology* **36**, 251-259.

Bart, G. (2012). Maintenance medication for opiate addiction: The foundation of recovery. *Journal of Addictive Diseases* **31**, 207-225.

Bhalla, S., Andurkar, S.V. ve Gulati, A. (2016). Neurobiology of opioid withdrawal: Role of the endothelin system. *Life Sciences* **159**, 34-42.

Bisaga, A., Comer, S.D., Ward, A.S., Popik, P., Kleber, H.D. ve Fischman, M.W. (2001). The NMDA antagonist memantine attenuates the expression of opioid physical dependence in humans. *Psychopharmacology* **157**, 1-10.

Bliss, T.V. ve Lomo, T. (1973). Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *Journal of Physiology* **232**, 331-356.

Bormann, J. (1989). Memantine is a potent blocker of N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor channels. *European Journal of Pharmacology* **166**, 591-592.

Boyce-Rustay, J.M., ve Cunningham, C.L.(2004) The role of NMDA receptor binding site in ethanol place conditioning. *Behavioral Neuroscience* **118**, 822-834.

Bruinink, A. ve Bischoff, S. (1986). Detection of dopamine receptors in homogenates of rat hippocampus and other brain areas. *Brain Research* **386**, 78-83.

Burton, S.M. ve Tiffany, S.T. (1997). The effect of alcohol consumption on craving to smoke. *Addiction* **92**, 15-26.

Bustin, S.A., Benes, V., Nolan, T. ve Pfaffl, M.W. (2005). Quantitative real-time RT-PCR--a perspective. *Journal of Molecular Endocrinology* **34**, 597-601.

Chartoff, E.H., Mague, S.D., Barhight, M.F., Smith, A.M. ve Carlezon, W.A. Jr. (2006). Behavioral and molecular effects of dopamine D1 receptor stimulation during naloxone-precipitated morphine withdrawal. *Journal of Neuroscience* **26**, 6450-6457.

Chartoff, E.H., Papadopoulou, M., Konradi, C. ve Carlezon, W.A. Jr. (2003). Dopamine-dependent increases in phosphorylation of cAMP response element binding protein (CREB) during precipitated morphine withdrawal in primary cultures of rat striatum. *Journal of Neurochemistry* **87**, 107-118.

Chen, H.S. ve Lipton, S.A. (2006). The chemical biology of clinically tolerated NMDA receptor antagonists. *Journal of Neurochemistry* **97**, 1611-1626.

Cho, G.S., Lee, J.C., Ju, C., Kim, C. ve Kim, W.K. (2013). N-methyl-D-aspartate receptor antagonists memantine and MK-801 attenuate the cerebral infarct accelerated by intracorpous callosum injection of lipopolysaccharides. *Neuroscience Letter* **538**, 9-14.

Christie, M.J., Summers, R.J., Stephenson, J.A., Cook, C.J. ve Beart, P.M. (1987). Excitatory amino acid projections to the nucleus accumbens septi in the rat: a retrograde transport study utilizing D[3H]aspartate and [3H]GABA. *Neuroscience* **22**, 425-439.

Collingridge, G.L. ve Singer, W. (1990). Excitatory amino acid receptors and synaptic plasticity. *Trends in Pharmacological Sciences* **11**, 290-296.

Collins, A.C., Burch, J.B., De Fiebre, C.M. ve Marks, M.J. (1988). Tolerance to and cross tolerance between ethanol and nicotine. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, **292**, 365-373.

Corrigall, W.A. ve Linseman, M.A. (1980). A specific effect of morphine on evoked activity in the rat hippocampal slice. *Brain Research* **192**, 227-238.

Creeley, C., Wozniak, D.F., Labruyere, J., Taylor, G.T. ve Olney, J.W. (2006). Low doses of memantine disrupt memory in adult rats. *Journal of Neuroscience* **26**, 3923-3932.

Crow, J.M. (2017). Addicted to the cure. İnternet Erişim 05.05.2017 <https://www.chemistryworld.com/feature/new-opioid-drugs/2500163.article>

Danysz, W., Parsons, C.G., Mobius, H.J., Stoffler, A. ve Quack, G. (2000). Neuroprotective and symptomatological action of memantine relevant for Alzheimer's disease: A unified glutamatergic hypothesis on the mechanism of action. *Neurotoxicity Research* **2**, 85-7

Ditzler, K. (1991). Efficacy and tolerability of memantine in patients with dementia syndrome. *Arzneimittel-Forschung* **41**, 773-780.

Djang, D.S., Janssen M.J., Bohnen N., Booij, J., Henderson , T.A., Herholz, K. ve ark. (2012). SNM practice guideline for dopamine transporter imaging with 123I-ioflupane SPECT 1.0. *Journal of Nuclear Medicine* **53**, 154-163.

Espejo, E.F., Serrano, M.I., Caillé, S. ve Stinus, L. (2001). Behavioral expression of opiate withdrawal is altered after prefrontocortical dopamine depletion in rats: monoaminergic correlates. *Neuropsychopharmacology* 25, 204-212.

Everitt, B.J, ve Wolf, M.E. (2002). Psychomotor stimulant addiction: a neural systems perspective. *Journal of Neuroscience* 22, 3312-3320.

Floresco, S.B., Blaha, C.D., Yang, C.R. ve Phillips, A.G. (2001). Modulation of hippocampal and amygdalar-evoked activity of nucleus accumbens neurons by dopamine:cellular mechanisms of input selection. *Journal of Neuroscience*, 21, 2851-2860.

Francis, D.L. ve Schneider, C. (1971). Jumping after naloxone precipitated withdrawal of chronic morphine in the rat. *British Journal Pharmacology* 41, 424-425.

Ghasemi, M. ve Schachter, S.C. (2011). The NMDA receptor complex as a therapeutic target in epilepsy: a review. *Epilepsy Behavior* 22, 617-640.

Gellert, V.F. ve Holtzman, S.G. (1978). Development and maintenance of morphine tolerance and dependence in the rat by scheduled access to morphine drinking solutions. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 205, 536-546.

Gibson, R.D. ve Tingstad, J.E. (1970). Formulation of a morphine implantation pellet suitable for tolerance-physical dependence studies in mice. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 59, 426-427.

Gorelova, N. ve Yang, C.R. (1997). The course of neural projection from the prefrontal cortex to the nucleus accumbens in the rat. *Neuroscience* 76, 689-706.

Green, T.A., Cain, M.E., Thompson, M. ve Bardo, M.T. (2003). Environmental enrichment decreases nicotine-induced hyperactivity in rats. *Psychopharmacology (Berlin)* 170, 235-241.

Hammami-Abrand Abadi, A., Miladi-Gorji, H. ve Bigdeli, I. (2016). Effect of environmental enrichment of physical and psychological dependence signs and voluntary morphine consumption in morphine-dependent and morphine-withdrawn rats. *Behavioural Pharmacology* **27**, 270-278.

Harris, A.C., Rothwell, P.E. ve Gewirtz, J.C. (2008). Effects of the NMDA receptor antagonist memantine on the expression and development of acute opiate dependence as assessed by withdrawal-potentiated startle and hyperalgesia. *Psychopharmacology* (Berlin). **196**, 649-660.

Harris, G.C. ve Aston-Jones, G. (2003). Critical role for ventral tegmental glutamate in preference for a cocaine-conditioned environment. *Neuropsychopharmacology* **28**, 73-76.

Himmelsbach, C.K., Gerlach G.H. ve Stanton E.J. (1935). A method for testing addiction, tolerance and abstinence in rats. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **53**, 179-188.

Horii-Hayashi, N., Yoshikawa, M., Matsusue, Y., Ishizaka, S., Nishi, M. ve Wanaka, A. (2011). Environmental stimulation changes tissue-type plasminogen activator activity in the adult mouse hippocampus. *Neurochemistry International* **58**, 1-4.

Hyman, S. E., Malenka, R.C. ve Nestler, E. J. (2006). Neural mechanisms of addiction: the role of reward-related learning and memory. *Annual Review of Neuroscience* **29**, 565-598.

Jones S. ve Bonci, A. (2005). Synaptic plasticity and drug addiction. *Current Opinion in Pharmacology* **5**, 20-25.

Kalant, H. (2007). Opioid analgesics and antagonists. İçinde Kalant, H., Grant, D.M. ve Mitchell, J. (editörler), *Principles of Medical Pharmacology*, (7. baskı), Elsevier; Kanada, pp. 236-251.

Kalant, H. ve Grupp, L. (2007). Drug abuse and drug dependence. İçinde Kalant, H., Grant, D.M. ve Mitchell, J. (editörler). *Principles of Medical Pharmacology* (7. baskı), Elsevier: Kanada:Saunders, pp. 945-958.

Kalivas, P.W. ve Alesdatter, J.E. (1993). Involvement of NMDA receptor stimulation in the ventral tegmental area and amygdala in behavioral sensitization to cocaine. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **267**, 486-495.

Kayaalp, S.O. (2012). Opioid analjezikler. İçinde Kayaalp, S.O. (editör). *Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji* Ankara: Pelikan Yayıncılık, pp. 826-845.

Kayaalp, S.O. ve Uzbay, T. (2012). İlaç kötüye kullanımı ve ilaç bağımlılığı. İçinde Kayaalp SO (editör). *Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji* Ankara: Pelikan Yayıncılık, pp. 846-868.

Kelley, A.E. (2004). Memory and addiction: shared neural circuitry and molecular mechanisms. *Neuron* **44**, 161-179.

Kempermann, G., Kuhn, H.G. ve Gage, F.H. (1997). More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment. *Nature* **386**, 493-495.

Kew, J.N. ve Kemp, J.A. (2005). Ionotropic and metabotropic glutamate receptor structure and pharmacology. *Psychopharmacology (Berlin)* **179**, 4-29.

Kim, J., Ham, S., Hong, H., Moon, C. ve Im, H.I. (2016). Brain reward circuits in morphine addiction. *Molecules and Cells* **39**, 645-653.

Kim, J.H., Perugini, M., Austin, J.D. ve Vezina, P. (2001). Previous exposure to amphetamine enhances the subsequent locomotor response to a D1 dopamine receptor agonist when glutamate reuptake is inhibited. *The Journal of Neuroscience* **21**, RC133.

Koob, G.F. ve Le Moal, M. (2001). Drug addiction, dysregulation of reward and allostasis. *Neuropsychopharmacology* **24**, 97-129.

Kornhuber, J. ve Weller, M. (1997). Psychotogenicity and N-methyl-D-aspartate receptor antagonism: implications for neuroprotective pharmacotherapy. *Biological Psychiatry* **41**, 135-144.

Koyuncuoğlu, H. Dizdar Y., Arıcıoğlu, F ve Sayın Ü. (1992). Effects of MK-801 on morphine physical dependence:attenuation and intensification. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* **43**, 487-490.

Koyuncuoğlu, H., Hatipoğlu, I. ve Sarıca, O. (1994). Morphine physical dependence intensification by hypoglycemia: NMDA receptor involvement. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* **48**, 571-574.

Koyuncuoğlu, H., Nurten, A., Yamantürk, P. ve Nurten, R. (1999). The importance of the number of NMDA receptors in the development of supersensitivity or tolerance to and dependence on morphine. *Pharmacological Research* **39**, 311-319.

Kuramochi, M. ve Nakamura, S. (2009). Effect of postnatal isolation rearing and antidepressant treatment on the density of serotonergic and noradrenergic axons and depressive behavior in rats. *Neuroscience* **163**, 448-455.

Lee, S.M., Yang, Y. ve Mailman, R.B. (2014). Dopamine D1 receptor signaling: does GαQ-phospholipase C actually play a role? *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **351**:9-17.

Leshner, A.I. (1997). Addiction is a brain disease and it matters. *Science* **278**, 45-47.

Livak, K.J. ve Schmittgen, T.D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* **25**, 402-408.

Lochner, J.E., Honigman, L.S., Grant, W.F., Gressford, S.K., Hansen, A.B., Silverman, M.A., ve ark. (2006). Activity-dependent release of tissue plasminogen activator from the dendritic spines of hippocampal neurons revealed by live-cell imaging. *Journal of Neurobiology* **66**, 564-577.

Luby, E.D., Cohen, B.D., Rosenbaum, G., Gottlieb, J.S. ve Kelley, R. (1959). Study of a new schizophrenomimetic drug - Sernyl. *AMA Archives Neurology and Psychiatry* **81**, 363-369.

Luisada, P.V. (1978). The phencyclidine psychosis: phenomenology and treatment. *NIDA Research Monographs* **21**, 241-253.

Lüscher, C. (2015). Drugs of abuse. İçinde Katzung, B.G. ve Trevor, A.J. (editörler), *Basic and Clinical Pharmacology*. (13. baskı), USA; McGraw-Hill Education; 552-566.

Maldonado, C., Cauli, O., Rodríguez-Arias, M., Aguilar, M.A. ve Miñarro, J. (2003). Memantine presents different effects from MK-801 in motivational and physical signs of morphine withdrawal. *Behavioral Brain Research* **144**, 25-35.

Maldonado, R., Stinus, L., Gold, L.H. ve Koob, G.F. (1992). Role of different brain structures in the expression of the physical morphine withdrawal syndrome. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **261**, 669-677.

Malenka, R.C. ve Bear, M.F. (2004). LTP and LTD: an embarrassment of riches. *Neuron* **44**, 5-21.

Martin, W.R. (1967). Opioid antagonists. *Pharmacological Reviews* **19**, 463-521.

Molinoff, P.B. (2011). Neurotransmission and the central nervous system. İçinde Brunton, L.L, Chabner, B.A. ve Knollmann, B.C. (editörler), *Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics* (12. baskı). McGrawHill, pp. 363-395

Moncek, F., Duncko, R., Johansson, B.B. ve Jezova, D. (2004). Effect of environmental enrichment on stress related systems in rats. *Journal of Neuroendocrinology* **16**, 423-431.

Morris, R.G. (2006). Elements of a neurobiological theory of hippocampal function: the role of synaptic plasticity, synaptic tagging and schemas. *European Journal of Neuroscience* **23**, 2829-2846.

Nagai, T., Yamada, K., Yoshimura, M., Ishikawa, K., Miyamoto, Y., Hashimoto, K. ve ark. (2004). The tissue plasminogen activator-plasmin system participates in the rewarding effect of morphine by regulating dopamine release. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **101**, 3650-3655.

Nemoto, W., Sato, T., Nakagawasai, O., Yaoita, F., Silberring, J., Tadano, T. ve ark. (2013). Phenylmethanesulfonyl fluoride, a serine protease inhibitor, suppresses naloxone-precipitated withdrawal jumping in morphine-dependent mice. *Neuropeptides* **47**, 187-191.

Nesse, R.M. ve Berridge, K.C. (1997). Psychoactive drug use in evolutionary perspective. *Science* **278**, 63-66.

Nestler, E.J. (2001). Molecular basis of long-term plasticity underlying addiction. *Nature Reviews Neuroscience* **2**, 119-128.

Nestler, E.J., Hyman, S.E. ve Malenka, R.C. (Editörler) (2009). *Molecular Neuropsychopharmacology: A foundation for clinical Neuroscience*. (2. baskı) New York:McGrawHill.

Nicole, O., Docagne, F., Ali, C., Margaill, I., Carmeliet, P., MacKenzie, E. ve ark. (2001). The proteolytic activity of tissue-plasminogen activator enhances NMDA receptor-mediated signaling. *Nature Medicine* **7**, 59-64.

Noda, Y., Miyamoto, Y., Mamiya, T., Kamei, H., Furukawa, H., ve Nabeshima, T. (1998) Involvement of dopaminergic system in phencyclidine-induced place preference in mice pretreated with phencyclidine repeatedly. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **286**, 44-51.

O'Brien, C.P. (2011). Drug Addiction. İçinde Brunton L.L, Chabner B.A. ve Knollmann B.C. (editörler). *Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics* (12. baskı). McGrawHill, 249-668.

Otani, S., Daniel, H., Roisin, M.P. ve Crepel, F. (2003). Dopaminergic modulation of long-term synaptic plasticity in rat prefrontal neurons. *Cerebral Cortex* **13**, 1251-1256.

Pandey, P., Mersha, M.D. ve Dhillon, H.S. (2013). A synergistic approach towards understanding the functional significance dopamine receptor interactions. *Journal of Molecular Signaling* **8**, 13-21.

Parker, J.D., Calver, D.M., Zilkha, K.J. ve Knill-Jones, R.P. (1970). Controlled trial of amantadine hydrochloride in Parkinson's disease. *Lancet* **1**, 259-262.

Parsons, C.G., Danysz, W. ve Quack, G. (1999). Memantine is a clinically well tolerated N-methyl-D-aspartate receptor antagonist (NMDA) – a review of preclinical data. *Neuropharmacology* **38**, 735-767.

Pfeiffer, F.R., Wilson, J.M., Weinstock, J., Kuo, G.Y., Chambers, P.A., Holden, K.G. ve ark. (1982). Dopaminergic activity of substituted 6-chloro-1-phenyl-2,3,4,5-tetrahydro-1H-3-benzazepines. *Journal of Medicinal Chemistry* **25**, 352–358.

Pleasure, D. (2008). Diagnostic and pathogenic significance of glutamate receptor autoantibodies. *Archives of Neurology* **65**, 589-592.

Popik, P. ve Skolnick, P. (1996). The NMDA antagonist memantine blocks the expression and maintenance of morphine dependence. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* **53**, 791-797.

Popik, P., Wrobel, M. ve Bisaga, A. (2006). Reinstatement of morphine-conditioned reward is blocked by memantine. *Neuropsychopharmacology* **31**, 160-170.

Popik, P., Wrobel, M., Rygula, R., Bisaga, A. ve Bepalov, A.Y. (2003). Effects of memantine an NMDA receptor antagonist on place preference conditioned with drug and nondrug reinforcers in mice. *Behavioral Pharmacology* **14**, 237-244.

Popoli, M., Yan, Z., McEwen, B.S. ve Sanacora, G. (2011). The stressed synapse: the impact of stress and glucocorticoids on glutamate transmission. *Nature Reviews Neuroscience* **13**, 22-37.

Rabey, J.M., Nissipeanu, P. ve Korczyn, A.D. (1992). Efficacy of memantine, an NMDA receptor antagonist, in the treatment of Parkinson's disease. *Journal of Neural Transmission* **4**, 277-282.

Radke, A.K. ve Gewirtz J.C. (2012). Increased dopamine receptor activity in the nucleus accumbens shell ameliorates anxiety during drug withdrawal. *Neuropsychopharmacology* **37**, 2405-2415.

Rammes, G. Rupprecht, H., Ferrari, U., Zieglgansberger, W. ve Parsons, C.G. (2001). N-methyl-D-aspartate receptor channel blockers memantine, MRZ 2/579 and other amino-alkyl-cyclohexanes antagonise 5-HT (3) receptor currents in cultured HEK-293 and N1E-115 cell systems in a non-competitive manner. *Neuroscience Letters* **306**, 81-84.

Rampon, C., Tang, Y.P., Goodhouse, J., Shimizu, E., Kyin, M. ve Tsien, J.Z. (2000). Enrichment induces structural changes and recovery from nonspatial memory deficits in CA1 NMDAR1-knockout mice. *Nature Neuroscience* **3**, 238-244.

Rasmussen. K., Beitner-Johnson, D.B., Krystal, J.H., Aghajanian, G.K. ve Nestler, E.J. (1990). Opiate withdrawal and the rat locus coeruleus: behavioral, electrophysiological and biochemical correlates. *Journal of Neuroscience* **10**, 2308-2317.

Refsgaard, L.K., Pickering, D.S. ve Andreasen, J.T. (2017). Investigation of antidepressant-like and anxiolytic-like actions and cognitive and motor side effects of

four N-methyl-D-aspartate receptor antagonists in mice. *Behavioural Pharmacology* **28**, 37-47.

Rema, V., Armstrong-James, M., Jenkinson, N. ve Ebner, F.F. (2006). Short exposure to an enriched environment accelerates plasticity in the barrel cortex of adult rats. *Neuroscience* **140**, 659-672.

Robinson, S.D., Lee, T.W., Christie, D.L. ve Birch, N.P. (2015). Tissue plasminogen activator inhibits NMDA-receptor-mediated increases in calcium levels in cultured hippocampal neurons. *Frontiers in Cellular Neuroscience* **9**, 404.

Rogawski, M.A. ve Wenk, G.L. (2003). The neuropharmacological basis for the use of memantine in the treatment of Alzheimer's disease. *CNS Drug Reviews* **9**, 275-308.

Rosenzweig, M.R. ve Bennett, E.L. (1972). Cerebral changes in rats exposed individually to an enriched environment. *Journal of Comparative and Physiological Psychology* **80**, 304-313.

Rosenzweig, M.R., Bennett, E.L., Hebert, M. ve Morimoto, H. (1978). Social grouping cannot account for cerebral effects of enriched environments. *Brain Research* **153**, 563–576.

Samson, A.L. ve Medcalf, R.L. (2006). Tissue-type plasminogen activator: A multifaceted modulator of neurotransmission and synaptic plasticity. *Neuron* **50**, 673-678.

Sanders-Bush, E. ve Hazelwood, L. (2011). 5-Hydroxytryptamine (serotonin) and dopamine. İçinde Brunton, L.L, Chabner, B.A. ve Knollmann, B.C. (editörler), *Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics* (12. baskı). McGrawHill, pp. 335-361.

Sappino, A.P., Madani, R., Huarte, J., Belin, D., Kiss, J.Z., Wohlwend, A. ve ark. (1993). Extracellular proteolysis in the adult murine brain. *Journal of Clinical Investigation* **92**, 79-685

Schenk, S., Valadez, A., McNamara, C., House, D.T., Higley, D., Bankson, M.G. ve ark. (1993). Development and expression of sensitization to cocaine's reinforcing properties: role of NMDA receptors. *Psychopharmacology (Berl)*.**111**, 332-338

Schwab, R.S., England, A.C. Jr, Poskanzer, D.C. ve Young, R.R. (1969). Amantadine in the treatment of Parkinson's disease. *JAMA* **208**, 1168-1170.

Seeman, P., Caruso, C. ve Lasaga, M. (2008). Memantine agonist action at dopamine D2High receptors. *Synapse*. **62**, 149-153.

Self, D.W., Belluzzi, J.D., Kossuth, S. ve Stein, L. (1996). Self-administration of the D1 agonist SKF 82958 is mediated by D1, not D2, receptors. *Psychopharmacology* **123**, 303-306.

Shin, C.Y., Kundel, M. ve Wells, D.G. (2004). Rapid activity-induced increase in tissue plasminogen activator is mediated by metabotropic glutamate receptor-dependent mRNA translation. *Journal of Neuroscience* **24**, 9425-9433.

Smith, J.K., Neill, J.C. ve Costall, B. (1998). The influence of postweaning housing conditions on drug-induced conditioned taste aversion. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* **59**, 379-386.

Smith, M.A., Cole, K.T., Gergans, S.R., Iordanou, J.C., Lyle, M.A. ve Schmidt, K.T. (2008). Effects of environmental enrichment on sensitivity to mu, kappa, and mixed-action opioids in female rats. *Physiology & Behavior* **94**, 563-568.

Solinas, M., Chauvet, C., Thiriet, N., El Rawas, R. ve Jaber, M. (2008). Reversal of cocaine addiction by environmental enrichment. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **105**, 17145-17150.

Spijker, S. (2011). Neuromethods:Dissection of rodent brain regions. İçinde Li, K.W. (editör) *Neuroproteomics* Springer:New York **57**, pp. 13-26

Spoelder, M., Baars, A.M., Rotte, M.D., Vanderschuren, L.J. ve Lesscher, H.M. (2016). Dopamine receptor agonists modulate voluntary alcohol intake independently of individual levels of alcohol intake in rats. *Psychopharmacology* **233**, 2715-2725.

Stevens, K.E., Shiotsu, G. ve Stein, L. (1991). Hippocampal mu-receptors mediate opioid reinforcement in the CA3 region. *Brain Research* **545**, 8-16.

Tehrani, S.P., Daryaafzoon, M., Bakhtiarian, A., Ejtemaemehr, S. ve **Sahraei H.** (2009). The effects of lamotrigine on the acquisition and expression of morphine-induced place preference in mice. *Pakistan journal of Biological Sciences* **12**, 33-39

Trujillo, K.A. ve Akil, H. (1994). Inhibition of opiate tolerance by non-competitive N-methyl-D-aspartate receptor antagonists. *Brain Research* **633**, 178-188.

Tzschentke, T.M. ve Schmidt, W.J. (1995). N-methyl-D-aspartic acid-receptor antagonists block morphine-induced conditioned place preference in rats. *Neuroscience Letters* **193**, 37-40.

Tzschentke, T.M. ve Schmidt, W.J. (2003). Glutamatergic mechanisms in addiction. *Molecular Psychiatry* **8**, 373-382.

Uğur, E. (2006). Zenginleştirilmiş çevreye alınan yaşlı sıçanlarda kronik memantin uygulamasının etkileri. Yüksek lisans tez çalışması.

Uğur, E. ve Yamantürk-Çelik, P. (2006). The effect of enriched environment on reference memory performance in aged rats. *Neuroanatomy (Suppl. 1)* **5**, 28.

Ursin, R. Ursin, H. ve Olds, J. (1966). Self-stimulation of hippocampus in rats. *Journal of Comparative and Physiological Psychology* **61**, 353-359.

Van Praag, H., Kempermann, G. ve Gage, F.H. (2000). Neural consequences of environmental enrichment. *Nature Reviews Neuroscience*. **1**, 191-198.

Wanka, L., Iqbal, K. ve Schreiner, P.R. (2013). The lipophilic bullet hits the targets: medicinal chemistry of adamantane derivatives. *Chemical Reviews* **113**, 3516-3604.

Way, E.L., Loh, H.H. ve Shen, F. (1969). Simultaneous quantitative assessment of morphine tolerance and physical dependence. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **167**, 1-8.

Wei, E., Loh, H.H. ve Way, E.L. (1973). Quantitative aspects of precipitated abstinence in morphine-dependent rats. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **184**, 398-403.

WHO, *ICD-10 Classification of mental and behavioral disorders: clinical descriptions and diagnostic guidelines. F10-F19.* (İnternette) Erişim 05.05.2017, http://www.who.int/substance_abuse/terminology/ICD10ClinicalDiagnosis.pdf

Wible, C.G. (2013). Hippocampal physiology, structure and function and the neuroscience of schizophrenia: a unified account of declarative memory deficits, working memory deficits and schizophrenic symptoms. *Behavioral Science (Basel)* **3**, 298-315.

Wise, R.A. (1989). Opiate reward: Sites and substrates. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* **13**, 129-133.

Wise, R.A. ve Bozarth, M.A. (1987). A Psychomotor stimulant theory of addiction. *Psychological Review* **94**, 469-492.

Xu, N.J., Bao, L., Fan, H.P., Bao, G.B., Pu, L., Lu, Y.J. ve ark. (2003). Morphine withdrawal increases glutamate uptake and surface expression of glutamate transporter GLT1 at hippocampal synapses. *Journal of Neuroscience* **23**, 4775-4784.

Yamada, K., Nagai, T. ve Nabeshima, T. (2005). Drug dependence, synaptic plasticity, and tissue plasminogen activator. *Journal of Pharmacological Sciences* **97**, 157-161.

Yamantürk-Çelik, P., Akkaya, A., Aslan, A. ve Ak, N. (2011). Behavioural test responses of rats reared in enriched environment. 3rd East Mediterranean International Council for Laboratory Animal Science (ICLAS) Symposium & XV. General Assembly. Istanbul, Symposium Book, 57.

Yamantürk-Çelik, P., Çağlayan, B. ve Güngör, M. (2011). Effects of propylthiouracil-induced hypothyroidism on naloxone-precipitated abstinence in morphine-dependent rats. 3rd Annual International Drug Abuse Research Society (IDARS) Meeting, İstanbul.

Zhang, M.Q., Ji, M.H., Zhao Q.S., Jia, M., Qiu L.L. ve Yang, J.J. (2015). Neurobehavioural abnormalities induced by repeated exposure of neonatal rats to sevoflurane can be aggravated by social isolation and enrichment deprivation initiated after exposure to the anaesthetic. *British Journal of Anaesthesia* 115, 752-760.

Zhong, W., Dong, Z., Tian, M., Cao, J., Xu, T., Xu, L. ve ark. (2006). Opiate withdrawal induces dynamic expressions of AMPA receptors and its regulatory molecule CaMKII alpha in hippocampal synapses. *Life Sciences* **79**, 861-869.

T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
DENEYSEL TIP ARAŞTIRMA ENSTİTÜSÜ
(DETAE)
DENEY HAYVANLARI ETİK KURULU

Doktora Öğ. Abdurrahman Aslan , İ. Ü. İstanbul Tıp Fak. Farmakoloji Anabilim Dalı

Karar No: 30

İlgi:11.03.2007 tarihli yazınız.

Sorumluluğunu üstlendiğiniz “Zenginleştirilmiş çevre, memantin ve SKF82958’in sıçanlarda nalokson ile başlatılan morfin yoksunluk sendromuna etkileri: hipokampal doku plazminojen aktivatörü mRNA düzeyleri” isimli projeniz Etik Kurulumuz tarafından incelenmiş ve Etik Kurul İlkeleri’ne uygun bulunmuştur.



Yard. Doç. Dr. Mutlu KÜÇÜK
Deney Hayvanları Etik Kurulu
Başkanı



Prof. Dr. Mehmet KAYA
Üye



Prof. Dr. Müzeyyen MAMAL TORUN
Üye



Doç. Dr. Asiye NURTEN
Üye



Uzm. Dr. Mehmet ÖZEK
Üye

Doç. Dr. Bülent AHISHALI
Üye



Vet. Hek. Fatma TEKELİ
Raportör

