



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
MARMARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**SANTRAL SİNİR SİSTEMİNE AKUT UYGULANAN
TOPİRAMATIN MORFİN YOKSUNLUK SENDROMUNA VE
BEYİN KAYNAKLI NÖROTROFİK FAKTÖRE ETKİSİ**

Dr. SONGÜL ÖZKULA
DOKTORA TEZİ

TIBBİ FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN

Doç.Dr. HASAN RACİ YANANLI

2020-İSTANBUL

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 çalışmasıyla 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.

Dr. Songül Özkula

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim boyunca yanında çalışmaktan mutluluk ve onur duyduğum, bilgisi ve yüksek öngörüsüyle bana her daim yol gösterip yardımcı olan, desteğini her zaman hissettiren değerli danışman hocam Doç. Dr. Hasan Raci YANANLI'ya;

Farmakoloji eğitimim boyunca yanında çalışmaktan onur duyduğum, her konuda göstermiş olduğu katkı ve hoşgörülü yaklaşımından dolayı çok değerli hocam Prof. Dr. Filiz ONAT'a;

Eğitimim süresince desteğini ve ihtiyaç duyduğum anlarda yardımlarını esirgemeyen, engin bilgi birikimlerini her daim içtenlikle paylaşan, her türlü konuda görüşlerini aldığım değerli hocalarım Prof. Dr. Rezzan GÜLHAN'a, Prof. Dr. Zafer GÖREN'e, Prof. Dr. Ahmet AKICI'ya, Prof. Dr. Atila KARAALP'e, Doç. Dr. Medine Gülcebi İDRİSOĞLU'na;

Tez çalışma sürecinde yardımlarını esirgemeyen değerli Dr. Öğr. Üyesi Banu Aydın'a ve Dr. Öğr. Üyesi Mahluga Jafarova DEMİRKAPU'ya;

Hayatıma girmelerinden mutluluk duyduğum, yardımları ve arkadaşlıklarını benden esirgemeyen değerli çalışma arkadaşlarıma;

Bugüne kadar her konuda beni destekleyen, her zaman yanımda olan eşime ve aileme teşekkür ediyorum.

Dr. Songül ÖZKULA

Bu tez Marmara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu Başkanlığı tarafından SAG-C-DRP-200318-0098 numaralı proje ile desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	i
İÇİNDEKİLER	ii
TABLolar LİSTESİ	v
ŞEKİLLER LİSTESİ	vi
KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ	viii
EKLER LİSTESİ	ix
1. ÖZET	1
2. SUMMARY	2
3. GİRİŞ VE AMAÇ	3
4. GENEL BİLGİLER	6
4.1. Opioidler	6
4.1.1. Opioid reseptörleri	7
4.1.2. Morfin	16
4.1.3. Opioid bağımlılığı ve yoksunluğu	18
4.2. Topiramet	24
4.3. BDNF	26
5. GEREÇ ve YÖNTEM	31
5.1. Deney Hayvanlarının Özellikleri	31
5.2. Stereotaksik Cerrahi Yöntemi	31
5.3. Lokomotor Aktivite Ölçümleri	32

5.4. Morfin Bağımlılığı Oluşturma Yöntemi	35
5.5. Yoksunluk Tablosu Oluşturma Yöntemi	35
5.6. Yoksunluk Bulgularının Değerlendirilmesi	36
5.7. Frontal Korteks Diseksiyonu	38
5.8. Deney Protokolü	39
5.9. Maddeler ve Mikroenjeksiyon	41
5.10. BDNF ve proBDNF İçin Western Emdirimi Analizi	42
5.10.1. Hücre lizatlarının hazırlanması	42
5.10.2. Protein miktar tayini	42
5.10.3. Elektroforez	42
5.10.4. Elektroforetik transfer düzeneği ile elektroforetik transfer	43
5.10.5. Western emdirimi analizi	43
5.11. Verilerin Analizi	44
6. BULGULAR	45
6.1. ICV ve Nac'a Uygulanan Topiramatin Naloksonla İndüklenen Morfin Yoksunluğunda Yoksunluk Bulgularına ve Lokomotor Aktivite Üzerine Etkisi	45
6.1.1. ICV ve NAc'a uygulanan topiramatin naloksonla indüklenen morfin yoksunluğunda yoksunluk bulgularına etkisi	46
6.1.1.1. ICV ve NAc'a uygulanan topiramatin nalokson ile indüklenen morfin yoksunluğunda sıçrama sayısı üzerine etkisi	46
6.1.1.2. ICV ve NAc'a uygulanan topiramatin nalokson ile indüklenen morfin yoksunluğunda dış gıcırdatma davranışı üzerine etkisi	47
6.1.1.3. ICV ve NAc'a uygulanan topiramatin nalokson ile indüklenen morfin yoksunluğunda ağırlık kaybı üzerine etkisi	48

6.1.1.4. ICV ve NAc'a uygulanan topiramatin nalokson ile indüklenen morfin yoksunluğunda pitozis skoru üzerine etkisi	49
6.1.1.5. ICV ve NAc'a uygulanan topiramatin nalokson ile indüklenen morfin yoksunluğunda ıslak köpek silkinme hareketi üzerine etkisi	50
6.1.2. ICV ve NAc'a uygulanan topiramatin naloksonla indüklenen morfin yoksunluğunda lokomotor aktivite üzerine etkisi	51
6.1.2.1. ICV ve NAc'a uygulanan topiramatin naloksonla indüklenen morfin yoksunluğunda stereotipik davranışların yüzde değişimine etkisi	51
6.1.2.2. ICV ve NAc'a uygulanan topiramatin naloksonla indüklenen morfin yoksunluğunda vertikal hareketlerin yüzde değişimine etkisi	52
6.1.2.3. ICV ve NAc'a uygulanan topiramatin naloksonla indüklenen morfin yoksunluğunda ambulator davranışların yüzde değişimine etkisi	53
6.1.2.4. ICV ve NAc'a uygulanan topiramatin naloksonla indüklenen morfin yoksunluğunda kat edilen mesafenin yüzde değişimine etkisi	54
6.2. Morfin Bağımlılığı, Morfin Yoksunluğu ve Morfin Yoksunluğunda ICV veya NAc'a Uygulanan Topiramatin BDNF /proBDNF Oranı Üzerine Etkisi	55
6.2.1. Morfin bağımlılığı ve yoksunluğunun BDNF/proBDNF oranı üzerine etkisi	56
6.2.2. Morfin yoksunluğunda ICV ve NAc'a uygulanan topiramatin BDNF/proBDNF oranı üzerine etkisi	57
7. TARTIŞMA VE SONUÇ	58
8. REFERANSLAR	71
9. EKLER	92
9.1. Ek-1. Etik Kurul Onayı	92
9.2. Ek-2. Deney Hayvanları Kullanım Sertifikası	93

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 1. Opioid reseptörlerin bulundukları yapılar	13
Tablo 2. Yoksunluk tablosu geliştirilen hayvanlarda 15 dakika süre ile gözlemlenen ve skorlanan yoksunluk bulguları	37
Tablo 3. Deney grupları ve gruplardaki sıçanların dağılımları	39

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1. 7- transmembran yapılı opioid-G-protein kenetli reseptör	15
Şekil 2. Nörotrofinler ve bağlandıkları reseptörleri	27
Şekil 3. BDNF ve proBDNF'nin öncül molekülden sentezi	28
Şekil 4. Lokomotor aktivite görüntüleme sistemi	33
Şekil 5. Deney protokolü ve akış planının grafik ile gösterimi	34
Şekil 6. ICV-T (n=6) ve NAc-T (n=7) gruplarına bilateral mikroenjeksiyon ile uygulanan topiramatin, nalokson (3mg/kg, i.p.) ile indüklenen morfin yoksunluğundaki sıçrama sayısı üzerine etkisi	46
Şekil 7. ICV-T (n=6) ve NAc-T (n=7) gruplarına bilateral mikroenjeksiyon ile uygulanan topiramatin, nalokson (3mg/kg, i.p.) ile indüklenen morfin yoksunluğundaki diş gıcırdatma davranışı üzerine etkisi	47
Şekil 8. ICV-T (n=6) ve NAc-T (n=7) gruplarına bilateral mikroenjeksiyon ile uygulanan topiramatin, nalokson (3mg/kg, i.p.) ile indüklenen morfin yoksunluğundaki ağırlık kaybı üzerine etkisi	48
Şekil 9. ICV-T (n=6) ve NAc-T (n=7) gruplarına bilateral mikroenjeksiyon ile uygulanan topiramatin, nalokson (3mg/kg, i.p.) ile indüklenen morfin yoksunluğundaki pitozis skoru üzerine etkisi	49
Şekil 10. ICV-T (n=6) ve NAc-T (n=7) gruplarına bilateral mikroenjeksiyon ile uygulanan topiramatin, nalokson (3mg/kg, i.p.) ile indüklenen morfin yoksunluğundaki ıslak köpek silkinme hareketi üzerine etkisi	50

Şekil 11. ICV-T (n=6) ve NAc-T (n=7) gruplarına bilateral mikroenjeksiyon ile uygulanan topiramatin, nalokson (3mg/kg, i.p.) ile indüklenen morfin yoksunluğundaki stereotipik davranışların yoksunluk öncesine göre yüzde değişimi üzerine etkisi 51

Şekil 12. ICV-T (n=6) ve NAc-T (n=7) gruplarına bilateral mikroenjeksiyon ile uygulanan topiramatin, nalokson (3mg/kg, i.p.) ile indüklenen morfin yoksunluğundaki vertikal hareketlerin yoksunluk öncesine göre yüzde değişimi üzerine etkisi 52

Şekil 13. ICV-T (n=6) ve NAc-T (n=7) gruplarına bilateral mikroenjeksiyon ile uygulanan topiramatin, nalokson (3mg/kg, i.p.) ile indüklenen morfin yoksunluğundaki ambulator davranışların yoksunluk öncesine göre yüzde değişimi üzerine etkisi 53

Şekil 14. ICV-T (n=6) ve NAc-T (n=7) gruplarına bilateral mikroenjeksiyon ile uygulanan topiramatin, nalokson (3mg/kg, i.p.) ile indüklenen morfin yoksunluğundaki kat edilen mesafenin yoksunluk öncesine göre yüzde değişimi üzerine etkisi 54

Şekil 15. Morfin bağımlılığı (n=4) ve morfin yoksunluğunun (n=4) sıçanların frontal korteks örneklerindeki BDNF/proBDNF oranı üzerine etkisi 56

Şekil 16. ICV-T (n=4) ve NAc-T (n=4) gruplarına mikroenjeksiyon ile uygulanan topiramatin, nalokson (3mg/kg) ile indüklenen morfin yoksunluğunda frontal korteks örneklerinde BDNF/proBDNF oranı üzerine etkisi 57

KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ

AMPA : α -amino-3-hidroksi-5-metil-4-izoksazolepropionik

BDNF: Beyin Kaynaklı Nörotrofik Faktör

GABA : Gamma-aminobütirik asit

ICV : İntraserebroventriküler

i.p. : İntraperitoneal

LC: Lokus Sereleus

LMA : Lokomotor Aktivite

N/OFQ: Nosiseptin/orfanin FQ

NAc: Nükleus Akumbens

NMDA: N-metil-D-aspartik asit

SSS: Santral Sinir Sistemi

VTa : Ventral Tegmental Alan

δ : Delta

κ : Kappa

μ : Mü

EKLER LİSTESİ

Ek-1. Etik Kurul Onayı	92
Ek-2. Deney Hayvanları Kullanım Sertifikası	93

Santral Sinir Sistemine Akut Uygulanan Topiramatin Morfin Yoksunluk Sendromuna ve Beyin Kaynaklı Nörotrofik Faktöre Etkisi

Öğrencinin adı: Dr. SONGÜL ÖZKULA

Danışman: Doç. Dr. HASAN RACİ YANANLI

Anabilim Dalı: Tıbbi Farmakoloji

1. ÖZET

Amaç: Mezolimbik sistemde yer alan nükleus akumbensin(NAc) opioid kullanımına bağlı bağımlılıkta rolü olduğu bilinmektedir. Topiramat, postsinaptik gama-aminobütirik asit reseptörü aracılı inhibisyonu artıran, glutamaterjik α -amino-3-hidroksi-5-metil-4-izoksazolepropionik/kainat reseptörlerini ise antagonize eden yeni nesil bir antiepileptik ilaçtır. Beyin kaynaklı nörotrofik faktör(BDNF) sinaptik plastisitede, bunun öncülü proBDNF ise apopitozda rol oynayan nörotrofinlerdir. Bu çalışmada, intraserebroventriküler(ICV) yol ile lateral ventiküle ve NAc'a lokal uygulanan topiramatin naloksonla tetiklenen morfin yoksunluk sendromunda yoksunluk bulgularına ve BDNF/proBDNF oranı üzerine etkisi incelendi.

Gereç ve Yöntem: Bu çalışmada toplam 38 Wistar sıçana stereotaksik cerrahi yöntemi ile lateral ventriküle veya NAc bölgesine bilateral klavuz kanüller yerleştirildi. Morfin bağımlılığı oluşturmak için 75 mg baz morfin içeren toplamda üç pelet cilt altına implante edildi. Deney gününde 100 μ M topiramat ICV(2 μ L) veya NAc'a(500 nL) uygulandı, ardından nalokson(3mg/kg, i.p.) ile yoksunluk tablosu tetiklendi. Yoksunluk bulguları ve lokomotor aktiviteleri kaydedilen hayvanların deney sonunda beyinleri çıkarılarak frontal korteks bölgelerinde Western Blot yöntemi kullanılarak BDNF/proBDNF oranı incelendi.

Bulgular: NAc'a ve ICV uygulanan topiramat nalokson ile tetiklenen morfin yoksunluğunda dış gıcırdatma, ağırlık kaybı, pitozis ve ıslak köpek silkinmesini etkilemezken sıçrama sayısını anlamlı olarak baskıladı. NAc'a uygulanan topiramat nalokson ile tetiklenen morfin yoksunluğunda stereotipik davranışı anlamlı olarak azaltırken, diğer lokomotor aktivite değişkenlerinde anlamlı bir değişim görülmedi. ICV uygulanan topiramatin BDNF/proBDNF oranını anlamlı olarak düşürdüğü, buna karşılık NAc'a uygulanan topiramat BDNF/proBDNF oranını anlamlı olarak artırdığı görüldü.

Sonuç: Bu bulgular ICV ve NAc'a uygulanan topiramatin naloksonla indüklenen morfin yoksunluk semptomlarını ve lokomotor aktivite belirtilerini azalttığı ve sinaptik plastisite/apopitozda rol oynayan BDNF/proBDNF oranını değiştirdiğini gösterdi.

Anahtar sözcükler: Morfin, nükleus akumbens, topiramat, BDNF, proBDNF

The Effect of Acute Topiramate Administration on Morphine Withdrawal Syndrome and Brain-derived Neurotrophic Factor in Central Nervous System

Student's Name: SONGÜL ÖZKULA, research assistant

Advisor: HASAN RACİ YANANLI, associate professor

Department: Medical Pharmacology

2. SUMMARY

Objectives: Nucleus accumbens(NAc) is known to have a role in the addiction caused by the use of opioids. Topiramate is a new generation antiepileptic drug that increases postsynaptic gamma-aminobutyric acid receptor activity and antagonizes glutamatergic receptors. Brain-derived neurotrophic factor(BDNF) that play a role in synaptic plasticity, and proBDNF in apoptosis. In this study, the effect of topiramate on naloxone-induced morphine abstinence syndrome and the effects on the levels of BDNF/proBDNF were investigated.

Materials and Methods: In this study 38 Wistar rats were implanted stereotaxically with cannulas bilaterally into lateral ventricle(ICV) or NAc region. After stereotaxic surgery three pellets containing 75 mg of base morphine were implanted subcutaneously. Topiramate(100 µM/site) was administered ICV(2µL) or into the NAc(500nL), and the abstinence has been triggered by naloxone(3mg/kg, i.p.). At the end of the experiments brains were removed and the frontal cortex were isolated and the BDNF/proBDNF levels were examined using the Western Blot method.

Results: In the morphine abstinence triggered by naloxone, the ICV or NAc administration of topiramate has significantly suppressed the number of jumps. Topiramate administered to NAc, has significantly decreased stereotypical behavior, while no change in the locomotor activity were observed. Topiramate administered ICV, significantly reduced BDNF/proBDNF ratio, whereas topiramate administered to NAc significantly increased BDNF/proBDNF ratio.

Conclusion: These findings showed that topiramate administered ICV and into the NAc reduced naloxone-induced morphine abstinence symptoms and stereotypic locomotor activity and changed the ratio of BDNF/proBDNF, which plays a role in synaptic plasticity/apoptosis.

Key Words: Morphine, nucleus accumbens, topiramate, BDNF, proBDNF

3. GİRİŞ VE AMAÇ

Opioid bağımlılığı, fizyolojik, davranışsal ve bilişsel belirtiler bütünü olup ilacın kullanımı sonucu problemlere yol açmasına rağmen istemli olarak kullanımının sürdürüldüğü bir durumdur. Bağımlılık oluşturan ilacın kullanıma başlanma, sürdürülme ve kullanımının tekrarlanma süreçleri sosyal, çevresel, farmakolojik, psikolojik, genetik gibi faktörlerden etkilenmektedir (Dilbaz, 2012). Opioid bağımlılığı karmaşık bir olay olduğu için meydana gelme ve nüks etme mekanizmaları tam olarak anlaşılabilmiş değildir (Lu ve ark., 2001).

Opioidlere tekrarlanan maruz kalma, ödül süreci ve motivasyonu içeren beyin bölgelerinde uzun süreli değişikliklere neden olduğu için opioid bağımlısı olan bireyler yaşam boyu süren ilaç arayışı ve ilaç kullanımı mücadelesi içinde kendini bulmaktadır (Browne ve ark., 2019).

Limbik sistemde, nosiseptif yollarda ve hipotalamik-hipofiz-adrenal eksen boyunca sentez edilen opioid reseptör [μ (μ), delta (δ), kappa (κ)] ve peptidler, bağımlılıkta, duygusal davranışların düzenlenmesinde, öğrenme ve hafızada, ağrı ve strese verilen yanıtlarda rol almaktadır (Kieffer, 2019; Demirkapu ve Yananli, 2020).

Doğal bir kaynaktan elde edilen ilk ilaçlardan biri olan morfin, opiumun en aktif bileşenidir (Kieffer, 2019). Morfin, orta ila şiddetli ağrının hafifletilmesinde oldukça etkili olmasının yanı sıra, ameliyat öncesi anksiyeteyi azaltmak, sedasyon elde etmek için de kullanılmaktadır. Ayrıca nitratlara cevap vermeyen ağrıyı kesmenin yanında vazodilatör ve bradikardik etkileri ile miyokard enfarktüsünün tedavisinde (Dewey, 2007; Lu ve ark., 2015), anksiyolitik ve vazodilatör etkileri ile pulmoner ödem tedavisinde kullanılmaktadır (Ellingsrud ve Agewall, 2016).

Morfin, tekrarlayan kullanımına bağlı tolerans ve fiziksel bağımlılık geliştirdiği için istismara tabidir. Morfinin μ reseptör üzerine agonist etkisinin sonucunda, özellikle bağımlılıktan sorumlu olan mezokortikolimbik sistemde dopaminerjik aktivite artar ve bu durum bağımlılık ve tolerans ile sonuçlanır (Katzung ve ark., 2014).

Bağımlılık oluşturan bütün ilaçların aslında esas olarak hedeflerinde ödül mekanizmasında da etkisi olduğu bilinen mezolimbik dopaminerjik sistem vardır ve bu sistemi aktive ederler. Mezolimbik dopaminerjik sistemde esas olarak ventral tegmental alan (VTA) kaynaklı dopaminerjik nöronlar amigdala, nükleus akümbens (NAc), hipokampus ve prefrontal kortekse uzanır. VTA'daki dopaminerjik nöronların aktivasyonu ile bu bölgelerde ve özellikle de NAc'da dopamin seviyesi artar (Katzung ve ark., 2014).

Topiramet yeni jenerasyon bir antiepileptik ilaçtır (Mao ve ark., 2015). Topiramet'in birden fazla hücresel hedefi bulunmaktadır. Voltaj kapılı sodyum akımlarının azaltılması, hiperpolarizan potasyum akımlarının aktivasyonu, glutamaterjik reseptör alttiplerinden AMPA-kainat reseptör inhibisyonu, postsinaptik GABA_A reseptör aracılı klorür akımlarının artması topiramatin şu ana kadar bilinen farmakolojik etkileridir. Topiramet ayrıca karbonik anhidraz enziminin zayıf bir inhibitörüdür (Brunton ve ark., 2009). Topiramatin geniş yelpazedeki mekanizması bağımlılık ve yoksunluk gibi çeşitli SSS patolojilerinde araştırılmasına neden olmaktadır.

BDNF (beyin kaynaklı nörotrofik faktör) veya matür BDNF (mBDNF, 14 kDa) nörotrofin ailesinin bir üyesidir (Hempstead, 2014) ve öncülü olan proBDNF (32 kDa) proteininden oluşmaktadır (Cunha ve ark., 2010).

BDNF, sinaptik plastisitede önemli bir yere sahiptir (Allen ve Dawbarn, 2006). Sinapslardaki moleküler yapıların gen ekspresyonlarını düzenleyen BDNF, daha birçok mekanizma ile ilaca bağlı uzun süreli nöroadaptasyonların mekanizmalarına katkıda bulunmaktadır (McGinty ve ark., 2010). proBDNF ise apoptozda rol oynamaktadır (Teng ve ark., 2005; Woo ve Lu, 2009; McGinty ve ark., 2010).

BDNF'nin SSS'de yaygın dağılıma sahip olması ve nöronlarda sinaptik plastisite modülasyonunda görev almasından dolayı, öğrenme-bellek gibi fizyolojik olaylarda ve bağımlılık ve yoksunluk gibi daha birçok SSS patolojilerinde karşımıza çıkmaktadır (Binder, 2003; Heberlein ve ark., 2011).

Bu çalışmada morfin bağımlılığı ve yoksunluğunda önemli yeri olan mezolimbik sistemde NAc'a stereotaksik cerrahi yöntem ile lokal uygulanan topiramatin, naloksonla tetiklenen morfin yoksunluk sendromunda lokomotor aktivite ve

yoksunluk bulgularına ve morfin arama davranışında önemli bir bölge olan frontal kortekste BDNF/proBDNF oranı üzerine etkisinin incelenmesi amaçlanmıştır.

4.GENEL BİLGİLER

4.1. Opioidler

Tarihi kaynaklara bakıldığında, afyon bitkisinin üretimi ve kullanımına Sümerler tarafından M.Ö. 4000’li yıllarda başlanmış, daha sonra Çin, Hint ve Mısır uygarlıklarına yayılmıştır (Dilbaz, 2012; Demirkapu ve Yananlı, 2020). Yunanca ‘opion’ kelimesinden türetilen ve haşhaş suyu anlamına gelen ‘opium’, *Papaver somniferum* kapsüllerinin çizilmesi sonucu elde edilen koyu kıvamlı bir ekstredir (Fields ve Wiegand, 2014; Knapp, 2017). Uzun yıllar geniş bir klinik endikasyon skalası olan opium, analjezinin yanı sıra ishal tedavisinde de kullanıldı (Knapp, 2017). 1805 yılında Friedrich Serturmer tarafından ayrıntılı incelenen opiumdan, morfin izole edildi (Aragon-Poce ve ark., 2002). 1832 yılında, kimyasal yapısı morfine çok benzeyen kodein bulundu. 1874 yılında ise eczacı Alder Wright tarafından ilk keşfedilen semi-sentetik opiat olan eroïn (diasetilmorfin) bulundu (Knapp, 2017).

20 alkaloidden oluşan opiumda asıl farmakolojik etkilerden sorumlu olan maddeler yaklaşık % 10 konsantrasyonda bulunan morfin ve kodein, tebain, papaverindir (Fields ve Wiegand, 2014; Katzung ve ark., 2014). Opioidler doğal yollarla elde edilen alkaloidler (morfin, kodein, papaverin ve tebain), semi-sentetik bileşikler (diamorfin, oksikodon, buprenorfin) ve sentetik bileşikler (fentanil, alfentanil, metadon) olarak sınıflandırılabilir (Pathan ve Williams, 2012). Endojen opioid sistemi, sentez edilen proopiomelanokortin, proenkefalin, prodinorfin gibi öncül peptidlerden ve bunların enzimatik tepkimesi sonucu ortaya çıkan nöropeptidlerden oluşmaktadır (Tomek and Olive, 2018).

Opioid alkaloidler, opioid-benzeri farmakolojik özelliklere sahip endojen opioid peptidler diye adlandırılan endojen peptidlerin etkilerine aracılık eden reseptörleri uyarak etki etmektedir (Katzung ve ark., 2014).

Endojen opioid peptidler Proopiomelanokortin (POMK), Proenkefalin, Prodinerfin ve Nosisseptin/Orfanin FQ (N/OFQ) olmak üzere dört grupta incelenmektedir:

(1) POMK sistemi: Bu grupta β -endorfin bulunur ve opioid reseptörlerinden μ reseptörlerine yüksek afinite gösterir.

(2) Proenkefalin sistemi: Met-enkefalin, lö-enkefalin gibi başlıca enkefalinler bu grupta bulunur, μ_1 ve delta (δ) opioid reseptörlerine yüksek afinite gösterir.

(3) Prodinerfin sistemi: Bu grupta bulunan peptidler dinorfin A, dinorfin B, alfa-neoendorfin ve β -neoendorfindir. Kappa (κ) opioid reseptörlerine yüksek afinite gösterir.

(4) N/OFQ sistemi: μ , δ ve κ opioid reseptörlerini etkilemeyen, 1990'larda keşfedilen opioid peptid sistemidir ve N/OFQ reseptörlerine afinite gösterir (Kayaalp, 2012).

4.1.1. Opioid reseptörleri

1970'li yıllarda opioid reseptörlerinin santral sinir sisteminde (SSS) varlığı radyoligand bağlama çalışmaları ile gösterildi. Bunu, opioid nöromediyatörlerin SSS'de varlığının tespiti takip etti. Opioid nöromediyatörlerin SSS'de varlığı ise, SSS'deki bazı bölgelerde elektriksel stimülasyon ile analjezi meydana gelmesi ve bu analjezik etkinin opioid antagonistleri ile antagonize edilme yöntemi ile gösterildi (Kayaalp, 2012).

1975 yılında iki pentapeptid, Met- ve Leu-enkefalin opioid reseptörleri için ilk endojen ligandlar olarak izole edildi. Bunu, opioid peptid ailesini oluşturan birçok peptid izledi. Bu peptidleri kodlayan üç farklı gen ise 1970'lerin sonu ve 1980'lerin başında izole edildi. 1990'ların ortasına gelindiğinde ise şu an geçerli olan tüm endojen opioid reseptörleri moleküler düzeyde tanımlanmış oldu (Kieffer, 2019).

Klasik olarak, farmakolojik profilleri açısından karakterize edilen üç (μ , δ ve κ) opioid reseptörü bulunmaktadır. Bu reseptörlerin tümü G-protein ile kenetli

reseptörlerdir (Şekil 1), ilk keşfedildikleri eksojen ligand veya izole edildikleri yere göre isimlendirilmiştir (Pathan ve Williams, 2012; Raffa ve ark., 2017).

Opioid reseptör ailesinde klasik üç reseptörün yanı sıra N/OFQ reseptörünü kodlayan dördüncü bir üye bulunmaktadır. N/OFQ reseptörü ve endojen ligandı diğer opioid reseptörleri ve peptidler ile yüksek yapısal homolojiyi paylaşıp da N/OFQ reseptörüne kendi ligandı dışında başka opioid bağlanamamakta, N/OFQ peptidi ise klasik opioid reseptörlerine afinite göstermemektedir. Dört reseptör geninin tümü, benzer bir genomik organizasyon sergilemektedir (Kieffer, 2019).

International Union of Basic and Clinical Pharmacology (IUPHAR)'ın 2019 yılında açıklanan raporuna göre; "opioid" veya 'opiat' olarak adlandırılan ilaçlar endojen opioidlerin reseptörlerini kullanan sentetik ilaçlardır (Beckett ve Casy, 1954). 1970'lerde opiat ilaçların beyinde bağlanma yerlerinin bulunması, opioid alkaloid içeren ilaçlar için spesifik reseptörlerin ve bu reseptörler için enkefalinlerin, beta-endorfin, dinorfinlerin gibi endojen ligandların keşfini sağladı (Hughes ve ark., 1975; Cox ve ark., 1976; Goldstein ve ark., 1979). Reseptörler için önerilen adlandırma Yunan alfabesinden alındı ve reseptörlerin isimleri prototip ilaçlar veya reseptörün keşfedildiği dokuya göre; μ (morfin) reseptörü ve κ (ketosiklazosin) reseptörü, δ (vas deferens) olarak adlandırıldı (Lord ve ark., 1977). Bu üç reseptörün keşfedilmesinden sonra, o ana kadar bilinen endojen opioid peptidlerin bağlanmadığı, fakat sekans homolojisi olarak diğer opioid reseptörlerine benzeyen, bu yüzden yetim (*orphan*) olarak adlandırılan N / OFQ reseptörü bulundu (Meunier ve ark., 1995; Reinscheid ve ark., 1995). μ , δ ve κ opioid reseptörlerinin isimleri NC-IUPHAR (*Nomenclature and Standards Committee of the International Union of Basic and Clinical Pharmacology*) ilkelerine ve bulunma kronolojisine göre 1996 yılında OP3, OP1 ve OP2 olarak güncellendi. Fakat terminoloji değişikliğinin kafa karıştırıcı olabileceği ve araştırma literatüründeki atıfların ortadan kalkabileceği endişesi ile Yunan sembolü isimlendirme uzun yıllar boyunca kullanılmaya devam etti. Bunun üzerine NC-IUPHAR, opioid reseptör alt komitesini 1999 yılının sonlarında tekrar topladı ve komiteyi NC-IUPHAR'ın genel kılavuz ilkeleriyle uyumlu olan opioid reseptörlerinin isimlendirilmesi için gözden geçirilmiş öneriler geliştirmek için görevlendirdi. Buradan çıkan raporda μ , κ ve δ reseptörlerinin isimlerinin Yunan harfleri olarak kullanılabileceği yönünde karar alındı. Opioid reseptörlerinin korunan Yunan harfli

isimlerine ‘OR’ kısaltmasının eklenerek MOR, DOR, KOR ve NOR şeklinde yeniden isimlendirilmesine, ilave edilen kısaltmanın opioid reseptörü gibi bir anlam ortaya çıkarabileceği ileri sürülerek IUPHAR tarafından karşı çıktı. Bunun yerine ‘OP’ kısaltması eklenerek MOP, DOP, KOP ve NOP şeklinde isimlendirilmesinin daha uygun olacağı dile getirildi (Borsodi ve ark., 2019).

Opioid reseptörleri, hücre zarlarının üzerinde bulunan, zarın iç ve dış yüzeyi arasında yedi kez döngü yapan heptahelik yapıda bir protein olan G-proteinine kenetlidir (Knapp, 2017). μ , δ ve κ reseptörleri genel olarak % 60 amino asit sekans özdeşliği göstermektedir (Kieffer, 2019). Moleküler düzeyde opioid reseptörleri Go/Gi proteinleriyle kenetli bir reseptör ailesini oluşturmaktadır (McDonald ve Lambert, 2005; Katzung ve ark., 2014; Kieffer, 2019).

Opioid reseptörleri iyon kanallarına etki ederek hücre içi kalsiyum dağılımını modüle etmekte ve protein fosforilasyonunu değiştirmektedir. Opioidler nöronlar üzerine direkt etki ile presinaptik sinir uçlarında voltaj bağımlı kalsiyum kanallarını kapatarak transmitter salıverilmesini azaltmakta ve potasyum kanallarını açarak postsinaptik nöronları hiperpolarize etmekte bunun sonucunda nöronal uyarılabilirlik azalmaktadır (Katzung ve ark., 2014). Opioidler ayrıca sitoplazmik olayları ve hücrenin transkripsiyon aktivitesini etkileyen siklik adenosin monofosfat (cAMP) yolağını inhibe etmekte, mitojenle aktive edilmiş protein kinaz (MAPK) kaskadlarını ise aktive etmektedir. Opioid reseptörleri hem eksitator hem de inhibitör nöronlar üzerinde sentezlendiğinden nöral devrelerde inhibisyon veya disinhibisyon uygulayabilir (Kieffer, 2019).

Limbik sistemde, nosiseptif yollarda ve hipotalamik-hipofiz-adrenal eksen boyunca sentez edilen opioid reseptör ve peptidler bağımlılıkta, duygusal davranışların düzenlenmesinde, öğrenme ve hafızada, ağrı ve strese verilen yanıtlarda rol almaktadır (Kieffer, 2019; Demirkapı ve Yananli, 2020).

μ veya MOP reseptörü

İki alttipi μ -1 ve μ -2 olan μ reseptörünün, endojen liganları endomorfın-1 ve endomorfın-2'dir (Katzung ve ark., 2014; Kaye, 2018). Selektif agonistleri, morfin, DAMGO ([D-Ala(2)-mephe(4)-gly-ol(5)]enkephalin), fentanil, sufentanil, metadon ve dermorfin olup, CTOP (H-D-Phe-Cys(1)-Tyr-D-Trp-Orn-Thr-Pen(1)-Thr-NH₂) ise selektif antagonistidir (Hyytia ve Kiianmaa, 2001; Kayaalp, 2012).

MOP reseptörleri, klasik opioid reseptörlerinden kronolojik olarak en son klonlanan reseptörlerdir. SSS'de serebral korteks, amigdala başta olmakla limbik sistemde yaygın olarak bulunur, duyuşal ve motor fonksiyonların entegrasyonu ile ilişkilidir. MOP reseptörleri yüksek yoğunlukta kaudat ve putamen bazal ganglionlarında bulunur (Tablo 1). MOP reseptörleri, omuriliğin dorsal boynuzu içindeki primer afferent nöronlarda presinaptik olarak dağılım göstermektedir. Bu bölgede glutamat salınımını inhibe ederek ağrı iletiminde rol oynayan hızlı iletimden sorumlu miyelinli A δ lifleri ve yavaş iletimden sorumlu miyelinsiz C liflerinden nosiseptif uyarıların iletimini engeller. MOP reseptörleri nosiseptif iletimde önemi bilinen periaqueductal grey (PAG) bölgesinde de yüksek yoğunlukta bulunmaktadır (McDonald ve Lambert, 2005). Erkek sıçanların ventrolateral PAG bölgesinde dişi sıçanlara göre anlamlı derecede yüksek düzeyde MOP reseptör ekspresyonu bulunmakta olup, bu bölgenin lezyonu ile morfinin sistemik etkilerinde önemli bir azalma görüldüğü belirtilmektedir (Loyd ve ark., 2008).

MOP agonistleri merkezi ve periferik kemoreseptörlerin hiperkapni duyarlılığında bir azalma meydana getirerek solunum depresyonuna, gastrointestinal sistem sekresyon ve peristaltizm inhibisyonu sonucu kabızlığa neden olma potansiyeli taşımaktadır. Ayrıca MOP opioidlerinin kardiyovasküler sistem, immün sistem, hormon salgısı ve termoregülasyon fonksiyonları üzerine de etkileri bulunmaktadır (McDonald ve Lambert, 2005).

δ veya DOP reseptörü

DOP reseptörünün, metkefamid, DPDPE ([D-Pen2,D-Pen5]enkephalin) ve DSLET ([D-Ser2,Leu5,Thr6]-enkephalin) selektif agonistleri olup, naltrindol ise selektif antagonistidir (Kayaalp, 2012). Diğer opioid reseptörlerine kıyasla daha az dağılım göstermektedir. En yüksek yoğunlukta olfaktör bulbus, serebral korteks, NAc ve kaudat putamende bulunmaktadır (Tablo 1) (Demirkapu ve Yananli, 2020). Primer afferent nöronlar üzerinde presinaptik yerleşimli DOP reseptörleri, nörotransmitterlerin salınımını inhibe ederek opioidlerin antinosiseptif ve analjezik etkilerine hem spinal hem de supraspinal düzeyde aracılık etmektedir (McDonald ve Lambert, 2005).

κ veya KOP reseptörü

κ reseptörünün κ-1, κ-2 ve κ-3 olmak üzere üç alttipi bulunmaktadır (Katzung ve ark., 2014). KOP agonistleri güçlü disforik etki göstermektedir (Kieffer, 2019). Dinorfin A ve spiradolin selektif agonistleri, etilketosiklazosin, etorfin ve levorfanol non-selektif agonistleri, nor-binaltorfimin ise selektif antagonistidir (Kayaalp, 2012). Serebral korteks, NAc, hipotalamus, omurilik ve beyin sapında bulunan KOP reseptörlerinin spinal analjezi, sedasyon, dispne, bağımlılık, disfori, solunum depresyonu vb etkilerden sorumlu olduğu düşünülmektedir (Trescot ve ark., 2008; Demirkapu ve Yananli, 2020) (Tablo 1).

KOP reseptörleri, opioid reseptör ailesinden ikinci klonlanan reseptörlerdir. Prototipik agonisti ismini ilk harfinden aldığı, non-peptid yapılı benzomorfan ketosiklazosindir. Analjezik etkileri için klinik denemeleri yapılan spiradolin ve enadolin gibi sentetik agonistlerinin klinik kullanımları diürezis ve sedasyon gibi yan etkileri nedeniyle sınırlandırıldı. KOP agonisti olan enadolinin postiskemik glutamat salınımını inhibe ederek nöroprotektif etki sergilediği gösterilmiştir (McDonald ve Lambert, 2005). KOP agonistlerinin solunum depresyonuna neden olmaması diğer

opiooid ligandlara bir üstünlüğüdür. KOP agonistleri ayrıca, *midbrain*'de yer alan nükleus *raphe magnus* bölgesindeki primer hücrelerde konumlanan KOP reseptörlerini uyarak MOP agonistlerinin neden olduğu analjezik etkiyi zayıflatmakta, böylece anti-opiooid etki göstermektedir (McDonald ve Lambert, 2005).

Nosiseptin/Orfanin FQ veya NOP reseptörü

Nosiseptin/Orfanin FQ (N/OFQ veya NOP) reseptörünün endojen ligandı N/OFQ peptididir ve önceden tanımlanmış endojen opiooidlerden hiçbiri bu reseptörde anlamlı afiniteye veya etkinliğe sahip değildir (Borsodi ve ark., 2019; Kieffer, 2019). NOP reseptörleri ve endojen ligandı, diğer opiooid reseptörleri ve peptidleri ile yüksek yapısal benzerlik göstermektedir. Fakat kendi ligandı dışındaki opiooidler bu reseptöre bağlanmaz ve endojen ligandı da μ , δ veya κ reseptörlerine karşı afinite göstermez. NOP reseptörü opiatların analjezik etkilerine katkıda bulunmamaktadır (Knapp, 2017; Kieffer, 2019). Serebral korteks, anterior olfaktor nükleus, lateral septum, ventral önbeyin, hipokampus, hipotalamus, amigdala, substansia nigra, VTA ve lokus seruleus (LC) bölgelerinde nispeten yüksek yoğunlukta bulunmaktadır (Tablo 1). N/OFQ motor ve agresif davranışlar, pekiştirme ve ödüllendirme, nosisepsiyon, stres yanıtı, otonom ve bağışıklık fonksiyonlarının kontrolü gibi birçok fonksiyonda rol oynamaktadır (Borsodi ve ark., 2019). Belki de en az incelenen opiooid reseptörü olduğu için N/OFQ reseptörlerinin fonksiyonel rolleri en az bilinmektedir.

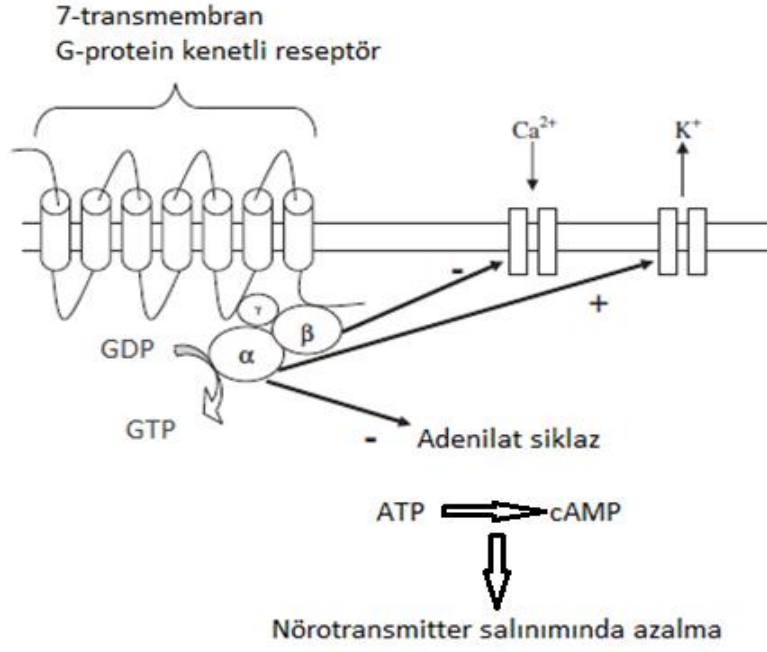
Tablo 1. Opioid reseptörlerin bulundukları yapılar (Demirkapu ve Yananlı, 2020'den uyarlanmıştır)

Opioid reseptörler	μ reseptör	δ reseptör	κ reseptör	N/OFQ reseptör
Bulundukları yapılar	Talamus, Kaudat putamen, Neokorteks, NAc, Amigdala, İnferior/superior kollikulun interpedinküler kompleksi	Olfaktor bulbus, Neokorteks, Kaudat putamen, NAc, Amigdala	Serebral korteks, NAc, Hipotalamus	Serebral korteks, Anterior olfaktor nükleus, Lateral septum, Ventral önbeyin, Hipokampus, Hipotalamus, Amigdala, Substansia nigra, VTA, LC

Diğer opioid reseptörler

1976 yılında, klasik opioid reseptörleri gibi G proteini ile kenetli olmayan yeni bir opioid reseptörü, sigma (σ ; SKF10047 için) reseptörünün varlığı gösterildi (Martin ve ark., 1976). Sonraki çalışmalarda ise naloksonun bu reseptöre antagonist olarak bağlanmadığı bildirildi (McDonald ve Lambert, 2005). Klasik opioid reseptörleri ile heterojenite olmasından dolayı günümüzde σ reseptörleri OP reseptör ailesinin üyesi olarak kabul edilmemektedir (Borsodi ve ark., 2019).

σ reseptörlerinin yanı sıra β -endorfine duyarlı epsilon (ϵ) reseptörlerinin (Wüster ve ark., 1979), zeta (ζ) reseptörlerinin (Zagon ve ark., 1991) ve lambda (λ) bölgesi olarak adlandırılan yüksek afiniteli bir bağlanma yerinin varlığı da gösterildi (Grevel ve ark., 1985). Bunlardan yeni bir reseptör olmaya en yakın olanı (Met5) enkefalinin yüksek afinite gösterdiği, ayrıca yüksek konsantrasyonda naltrekson ile inhibe edilebilen ζ reseptörleridir. Fakat ζ reseptörleri ile μ , δ ve κ opioid reseptörleri arasında herhangi bir sekans benzerliği bulunamamıştır. ϵ reseptörleri ve λ bölgesi bugüne kadar klonlanamadı. Sonuç olarak, farmakolojik açıdan bakıldığında, opioid reseptör ailesini iki başlıkta incelemek gerekmektedir: naloksonun bir antagonist olarak etki ettiği μ , δ ve κ reseptörlerini içeren ana reseptör ailesi ve nalokson için ihmal edilebilir afiniteye sahip N/OFQ reseptörleri (Borsodi ve ark., 2019).



Şekil 1. 7- transmembran yapılı opioid-G-protein kenetli reseptör (McDonald ve Lambert, 2005'den uyarlanmıştır)

4.1.2. Morfin

Çok sayıda alkaloid içeren opiumdan Sertürner tarafından 1800'lü yılların başlarında izole edilen morfin, opiumda yaklaşık %10 konsantrasyonunda bulunmaktadır (Aragon-Poce ve ark., 2002; Katzung ve ark., 2014). 1973 yılında morfinin beyinde bağlandığı bölgelerin 'morfin reseptörleri' olarak adlandırılmasını 1975 yılında 'endojen morfinler' veya 'endorfinler'in keşfi takip etti (Trescot ve ark., 2008).

Günümüzde morfin solunum depresyonu, kabızlık, tolerans ve bağımlılık gibi çeşitli olumsuz etkilere rağmen, ağrı kesici etkisi de bulunmaktadır (Katzung ve ark., 2014; Kieffer, 2019). Morfin, orta-şiddetli ağrının hafifletilmesinde oldukça etkili olmasının yanı sıra ameliyat öncesi anksiyeteyi azaltmak ve sedasyon elde etmek için de kullanılmaktadır. Ağrıkesici etkisinin yanı sıra vazodilatör ve bradikardik etkileri ile miyokard enfarktüsünün tedavisinde (Dewey, 2007; Lu ve ark., 2015), anksiyolitik ve vazodilatör etkileri ile pulmoner ödem tedavisinde tercih edilmektedir (Ellingsrud ve Agewall, 2016). Morfin intestinal motiliteyi baskılayarak fekal materyalin kolondan geçiş hızını azaltmakta ve kabızlığa yol açabilmektedir (Trescot ve ark., 2008). Bu etkisinden dolayı diyare tedavisinde kullanılmıştır. Ayrıca morfin ve diğer opiatların güçlü antitusif etkileri vardır. Antitusif mekanizmada, öksürük merkezi inhibisyonu esas etkileri olup, omurilik arka boynuzunda ve beyin sapında afferent-C-liflerinin akson uçlarından P maddesi salınımının inhibisyonu, antitusif etkilerine katkıda bulunur (Kayaalp, 2012, Brunton ve Ark 2019).

Morfinin yan etkileri arasında histamin salınımına bağlı bronkospazm ve hipotansiyon da yer almaktadır. Solunum depresyonu, arteriyel karbondioksit gerilimine yanıtın azalması ile sonuçlanır. Morfin, 4. ventrikül tabanındaki kemoreseptör triger zon bölgesini uyararak bulantı ve kusmaya neden olabilir. Sülfat alerjisi olan kişilerde morfin sülfat kullanımı anafilaktik reaksiyona yol açabilir (Trescot ve ark., 2008; Knapp, 2017). Mezensefalonda bulunan *Edinger-Westphall* çekirdeği üzerindeki disinhibisyon etkisi ile pupillerde daralmaya (miyozis) neden olur (Kayaalp, 2012). Morfin ayrıca sempatik sinir sisteminin tonusunu baskılayarak

periferik damar direncini azaltmakta, böylece venöz göllenme ve ortostatik hipotansiyona neden olmaktadır. Morfin sindirim sisteminde biliyer düz kaslarının ve safra kanalındaki Oddi sfinkterinin spazmına neden olarak hem safra kesesi içinde hem de safra kanalında basınç artışına yol açar. Ayrıca intestinal motiliteyi baskılayarak fekal materyalin kolondan geçiş hızını azaltıp kabızlığa yol açabilmektedir. Genitoüriner sistemde ise mesane trigon kasında spazm oluşturarak idrar retansiyonuna yol açar (Trescot ve ark., 2008; Knapp, 2017).

Morfin ve diğer opiatlar beyindeki solunum kontrol merkezlerine etki ederek solunumu inhibe ederler. Yüksek doz morfin hem solunum hızını hem de solunum sırasında değiştirilen hava hacmini azaltarak solunum depresyonuna neden olmaktadır, bu da yüksek doz morfin kaynaklı ölümlerin en sık görülen sebebidir (Knapp, 2017).

Morfin ve diğer opiatların tekrar tekrar uygulanmaları sonucu etkilerinin azalması şeklinde gelişen tolerans, bu ilaçların analjezik, sedatif, bulantı, kusma ve solunum depresyonu etkilerine karşı gelişebilir, fakat pupil daraltıcı etkisine karşı gelişmez. Klinikte miyozise karşı tolerans gelişmemesi opiat kaynaklı toksisite tanısı koymak için kullanılabilir. Ayrıca opiatların kabızlık etkisine de tolerans sınırlı olma eğilimindedir (Knapp, 2017). Morfinin tekrarlayan kullanımına bağlı tolerans ve fiziksel bağımlılık gelişir ve kullanımının kesilmesi durumunda ise yoksunluk sendromu meydana gelir (Kieffer, 2019; Morgan ve Christie, 2011)

Mukoza zarlarından iyi emilen morfin, esas olarak üst bağırsakta ve rektal mukozada neredeyse tama yakın emilir ve hemen hemen tüm uygulama yollarıyla kullanılabilir. Karaciğer tarafından ilk geçiş metabolizmasına uğrar. Glukuronik asit ile konjüge edilerek morfin-3-glukuronid ve morfin-6-glukuronid metabolitleri oluşur. Metabolitlerinin atılımı esas olarak idrar yolu ile olur (Kayaalp, 2012).

Morfin farmakolojik etkilerini, G proteini ile kenetli opioid reseptörlerine bağlanarak üretir (Şekil 1). Farmakolojik etkilerini büyük ölçüde μ opioid reseptörleri üzerinden gerçekleştirir. Morfinin bu reseptörlere bağlanması ile adenilat siklaz aktivitesinde, hücre içi cAMP ve kalsiyum düzeyinde azalma meydana gelir, bu da serotonin, dopamin ve P maddesi de dahil olmak üzere çeşitli nörotransmitterlerin salınmasında bir azalmaya yol açar (Dewey, 2007).

4.1.3. Opioid bağımlılığı ve yoksunluğu

DSM (*Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*) Amerika Birleşik Devletleri'nde Amerikan Psikiyatri Birliği tarafından 1952 yılında ruhsal bozukluklar ile ilgili bilgilerin toplandığı bir kitap olarak yayınlandı. Daha sonra bunu 1968 yılında DSM-II, 1980 yılında DSM-III, 1994 yılında DSM-IV, 2000 yılında DSM-IV-TR takip etti. DSM-V ise bazı psikiyatrik bozukluklar için değişiklikler yapılarak 2013 yılında yayınlandı. DSM-V'in DSM-IV'ten bağımlılık konusu ile ilgili en önemli farkı, DSM-IV'te yer alan 'Madde Bağımlılığı ve Madde Kötüye Kullanımı' isimlendirilmesi, DSM-V'te 'Madde Kullanım Bozuklukları' çatısı altında toplandı (Güleç ve ark., 2015).

DSM-V'e göre opioid kullanım bozukluğu, meşru bir tıbbi amaç için kullanılmayan yada opioid tedavisi gerektiren bir tıbbi durum varlığında gereken miktarın çok üzerindeki dozlarda kullanılan opioid maddelerin kompulsif ve uzun süreli kendi kendine uygulanmasını yansıtan semptomları içeren tıbbi bir durumdur (O'Brien ve ark., 2013). Ayrıca DSM V'e göre dünyada ortalama bir yıllık opioid kullanım bozukluğunun prevalansı, 18 yaş ve üstü yetişkin popülasyonunda yaklaşık % 0.37 olmakla birlikte oranlar erkeklerde (% 0,49) kadınlardan (% 0,26) daha yüksektir (O'Brien ve ark., 2013).

Opioid kullanım bozukluğu olan bireylerin günlük opioid kullanım davranışları, kompulsif ilaç kullanım kalıpları olma eğilimindedir. Opioid kullanım bozukluğunda sıklıkla belirgin düzeylerde tolerans gelişmekte ve ilaç kullanımı kesilince yoksunluk tablosu meydana gelmektedir. Bununla birlikte ilaç arama davranışına neden olabilecek birçok fizyolojik değişiklikler de bu bireyde görülebilir (O'Brien ve ark., 2013).

Opioidlerin terapötik dozlarının tekrarı sonucu etkilerine karşı tolerans gelişir, yani aynı terapötik dozda meydana getirdikleri etki şiddeti aşamalı olarak azalır. Tolerans ile birlikte fiziksel bağımlılık da meydana gelebilir. Fiziksel bağımlılıkta tekrarlayan ilaç kullanımına bağlı homeostatik mekanizmalarda adaptif değişiklikler meydana gelmektedir. Fiziksel olarak bağımlı birey artık belli bir zamandan sonra ilacın sürekli uygulanmasına ihtiyaç duyar. İlacın kesilmesi veya vücuda ilgili ilacın bir antagonistinin uygulanması durumunda ise kesilme sendromu, başka bir deyişle

yoksunluk sendromu meydana gelir. Yoksunluk sendromu fiziksel bağımlılığın en iyi göstergelerindendir (Katzung ve ark., 2014; Dandan ve Brunton, 2017).

Opioidlere maruz kalma, ödül prosesi ve motivasyonu içeren beyin bölgelerinde uzun süreli değişikliklere neden olduğu için opioid bağımlısı olan bireyler yaşam boyu süren ilaç arayışı ve ilaç kullanımı mücadelesi içinde kendini bulmaktadır (Browne ve ark., 2019).

Opioid peptidler Gi/Go gibi G-protein ile kenetli opioid reseptörlerini aktive ettikleri zaman ikincil ve üçüncül mekanizmalar ile nöronal aktivitede azalma meydana getirirler. Hücresel aktivitedeki bu azalma *midbrain* dopaminerjik nöronlar gibi bazı nöronların aktivitesinde artışla sonuçlanır. (Tomek and Olive, 2018).

Bağımlılık bir bakıma öğrenme ve hafıza sürecinde çok çeşitli mekanizmalar, moleküller ve reseptörlerin rol oynadığı sinapik bir plastisitedir. Bunlara glutamaterjik AMPA (α -amino-3-hidroksi-5-metil-4-izoksazolepropionik) ve NMDA (N-methyl-D-aspartic acid) reseptörleri örnek verilebilir. Bağımlılık ve hafıza farklı beyin bölgelerinin aktivasyonu sonucu ortaya çıkar. Bağımlılık mezokortikolimbik dopaminerjik sistemi hedef alırken, hafızada hipokampus ve amigdala önemli rol oynar. Bu farklılığa rağmen, addiktif ilaç kullanımı sonucu gelişen öğrenme paternlerinde, hipokampus, amigdala ve dorsal striatum ile ilişkili hafıza sistemlerinin de rol oynadığı söylenebilir (Carmack ve ark., 2017). Bağımlılıkta bağımlı bireylerin stres, ilacı hatırlatan bir uyarı veya tedavi olmuş olsa bile ilaç ile karşılaşması sonucu ilaca yeniden başlama riski yüksektir. Burada altta yatan en önemli mekanizma mezokortikolimbik sistemdeki özellikle mezolimbik dopaminerjik ve kortikal glutamaterjik afferentlerin kesiştiği ventral striatumdaki NAc'de meydana gelen nöronal plastisite sonucu öğrenme ve hatırlanan ödül beklentisidir. (Katzung ve ark., 2014).

Aşırı alım/intoksikasyon, yoksunluk ve ilaç arama davranışı olmak üzere üç aşamadan oluşan bağımlılık, tekrarlayan bir döngü olarak düşünülebilir. Kötüye kullanılan ilaçlar beynin ödül sistemini de aktive ederler. Ödül sisteminin gelişim mekanizması bağımlılığın mekanizmalarının anlaşılmasında bir anahtar rolündedir. Kötüye kullanılan ilaçların ödül etkisine neden olmalarındaki en önemli mekanizma mezokortikostriyal dopamin sistemindeki dopamin seviyesindeki artıştır. Dopamindeki hızlı ve ani artış, ödül etkisini oluşturan düşük-afiniteli D1 dopamin

reseptörünü uyarmaktadır. Buna karşın, dopaminin yüksek-afiniteli D2 reseptörünü aktive etmesi ödül sisteminin oluşmasında yeterli olmamakta, hatta ödül etkisini sınırlayabilmektedir (Koob ve Volkow, 2016).

Yoksunluk kronik irritabilite, emosyonel ağrı, disfori, ödül için motivasyon kaybı vs gibi semptomları içerir. Kronik ilaç maruziyeti, ilaca hücrel yanıt olarak ödül sisteminde bazı nöroadaptif değişiklikleri meydana getirir ki, bunlar da yoksunluk sendromunun oluşmasında önem arz etmektedir. Bu değişikliklere NAc'de dopaminerjik ve serotonerjik transmisyonunda azalma, μ opioid reseptör yanıtında artış, GABAerjik transmisyonunda azalma ve NMDA glutamaterjik transmisyonunda artış örnek verilebilir (Koob ve Volkow, 2016). Tolerans ve yoksunluk durumunda beynin stres sistemlerinin göstergelerinden biri olan CRF (kortikotropin salgılatıcı faktör), norepinefrin ve dinorfin düzeyi amigdalada artarak yoksunlukta görülen negatif emosyonel duyguların oluşmasına, ayrıca yoksunluğun uzamasına neden olur. NAc'de dopamin salınımının azalması, VTA'da CRF'nin artmasına neden olabilir, bu da yoksunlukta negatif duygudurumla ilişkili olabileceğini düşündürmüştür (Koob ve Volkow, 2016).

Opioid yoksunluğunda dopamine ek olarak veya dopamin salınımını modüle ederek, noradrenalin, GABA, P maddesi, adenosin, nöropeptit Y ve nitrik oksit gibi farklı nörotransmitterlerin ve nöromodulatorların opioid yoksunluğunun gelişiminde rol oynadığı düşünülmektedir (Yananlı ve ark., 2007; Topkara ve ark., 2017; Jafarova ve ark., 2020).

Opioid ilaçların kesilmesinden sonra ortaya çıkan yoksunluk sendromunun semptomları şu sırayla ortaya çıkar; ilk önce burun akıntısı, esneme ve göz yaşarması semptomlarını, huzursuzluk, titreme ve pupil dilatasyonu izler, son aşamada ise ishal, kusma, kas spazmları ve depresif ruh hali meydana gelir (Knapp, 2017). Opioid ilaçlara bağlı gelişen yoksunluk sendromunun gelişme hızı ve şiddeti, ilgili ilacın yarılanma ömrüne bağlıdır. İlacın yarılanma ömrü ne kadar kısa ise semptomların ortaya çıkması o kadar çabuk olur (Knapp, 2017; O'Brien ve ark., 2013).

DSM V'e Göre Opioid Kullanım Bozukluğu Tanı Kriterleri (O'Brien ve ark., 2013)

A. Aşağıdakilerden en az ikisi ile kendini gösteren ve 12 aylık bir süre içinde ortaya çıkan, klinik açıdan önemli bir bozukluğa veya sıkıntıya yol açan opioid kullanımı paterni:

1. Opioidlerin genellikle ama lanandan daha büyük miktarlarda veya daha uzun bir sürede alınması,

2. Opioid kullanımını azaltmak veya kontrol etmek için kalıcı bir istek veya başarısız çabaların olması,

3. Opioid elde etmek, kullanmak veya etkilerinden kurtulmak için gerekli aktivitelerde çok zaman harcanması,

4. Özlem (*craving*) ya da kuvvetli bir opioid kullanma arzusu ya da isteğinin olması,

5. İç, okul veya evde büyük rol yükümlülüklerini yerine getirememeye neden olan tekrarlayan opioid kullanımı,

6. Opioidlerin etkilerinden kaynaklanan veya şiddetlenen kalıcı veya tekrarlayan sosyal veya kişilerarası sorunlara rağmen sürekli opioid kullanımı,

7.  nemli sosyal, mesleki veya eğlence faaliyetlerinden opioid kullanımı nedeniyle vazgeçilmesi veya azaltılması,

8. Fiziksel olarak tehlikeli olduğu durumlarda tekrarlayan opioid kullanımı,

9. Maddenin yol açtığı veya şiddetlendirdiği inatçı veya tekrarlayan fiziksel veya psikolojik bir soruna sahip olmasına rağmen, devam eden opioid kullanımı,

10. Aşağıdakilerden herhangi biri ile tanımlanan tolerans:

a. Zehirlenme veya istenen etkiyi elde etmek için belirgin miktarda artan opioid ihtiya ı,

b. Aynı miktarda bir opioidin sürekli kullanımı ile belirgin şekilde azalmış bir etki,

11. Aşağıdakilerden herhangi birinde gösterildiği gibi yoksunluk gelişimi:

a. Karakteristik opioid yoksunluk sendromu,

b. Opioidlerin (veya yakından ilişkili bir madde) yoksunluk semptomlarını hafifletmek veya önlemek için alınması.

DSM V'e Göre Opioid Yoksunluğu Tanı Kriterleri (O'Brien ve ark., 2013)

A. Aşağıdakilerden birinin varlığı:

1. Ağır ve uzun süreli (birkaç hafta veya daha uzun) opioid kullanımının kesilmesi (veya azaltılması),

2. Bir opioid kullanım peryodundan sonra opioid antagonistinin uygulanması,

B. Aşağıdakilerden en az üçünün A kriterinden sonra birkaç dakika - gün içinde gelişmesi:

1. Disforik ruh hali,
2. Bulantı veya kusma,
3. Kas ağrıları,
4. Lakrimasyon veya rinore,
5. Pupillerde dilatasyon, piloereksiyon veya terleme,
6. İşhal,
7. Esneme,
8. Ateş
9. Uykusuzluk

C. B kriterindeki belirti veya bulguların sosyal, mesleki veya diğer önemli fonksiyonel alanlarda klinik olarak önemli sıkıntılara veya bozulmalara neden olması,

D. Belirti veya semptomların başka bir tıbbi duruma atfedilememesi ve zehirlenme veya başka bir maddeden çekilme dahil olmak üzere başka bir zihinsel bozukluk ile bu durumun açıklanamaması.

4.2. Topiramate

Topiramate (2,3:4,5-bis-o-(1-methylethylidene) β -D-fructo-pyranose sulfamate), D-fruktoz monosakkaritinin bir türevi olup, sülfamat grubu içeren ve molekül ağırlığı 339.36 g olan yeni jenerasyon bir antiepileptik ilaçtır (Shank ve ark.,2000; Mao ve ark., 2015). Geniş etki spektrumuna sahip olan topiramate Lennox-Gastaut sendromu, parsiyel ve jeneralize tonik-klonik nöbetlerin tedavisinin yanı sıra migren baş ağrılarının profilaksisinde de kullanılmaktadır (Porter ve ark., 2012; Katzung, 2018).

Topiramate, fruktoz-1,6-difosfatın yapısal analoglarının araştırıldığı bir projede, hipoglisemik aktiviteden yoksun bir ara madde olarak sentezlendi. Yapısında bulunan o-sülfamat parçasının asetazolamidin sülfonamid parçasına benzerliğinin saptanması üzerine topiramate antikonvülsan olarak değerlendirildi (Shank ve ark.,2000).

Oral uygulamadan sonra kolay emilmekte ve plazma pik seviyelerine yaklaşık 2 saatte ulaşmaktadır (Davies, 2007). Biyoyararlanımı yaklaşık % 80, plazma proteinlerine bağlanma oranı % 15'tir. Topiramate % 20-50 gibi bir oranla orta düzeyde metabolize olmaktadır. Yarılanma ömrü 20-30 saat olan topiramate öncelikli olarak değişmeden ve % 50-80 oranında idrarla atılmaktadır (Katzung, 2018).

Topiramate kullanımına bağlı baş dönmesi, uyku hali, psikomotor yavaşlama, parestezi, ataksi, vücut ağırlığında azalma, depresyon ve psikoz gibi yan etkiler görülebilmektedir. Bu yan etkiler genellikle hafif-orta şiddette olup, tedavinin geri çekilmesi veya uygulamanın hızlı titrasyonu sonucu meydana gelmektedir (Langtry ve ark., 1997).

İn-vitro glutamat ile oluşturulan eksitotoksite modeli çalışmasında, topiramatin, glutamat toksisitesine karşı hipokampal nöronlar üzerine nöroprotektif etkisi gösterildi (Mao ve ark., 2015). Sıçanlarda metilfenidatın yol açtığı oksidatif stres ve inflamasyona karşı farklı dozlarda topiramatin koruyucu etkisinin araştırıldığı bir in-vivo çalışmada hipokampal hücre kaybını, oksidatif hasarı ve inflamasyonu azaltarak nöroprotektif etkinlik oluşturduğu gösterildi (Motaghinejad ve ark., 2016). Serebral iskemiye karşı koruyucu etkisinin araştırıldığı bir çalışmada ise wistar sıçanların sağ orta serebral arter embolizasyonundan iki saat sonra intraperitoneal (i.p.) uygulanan topiramatin doza bağımlı olarak nöroprotektif etki gösterdiği bildirildi (Yang ve ark.,

1998). Serebral iskemide artan glutamat seviyeleri hücre içine sodyum ve kalsiyum akımına ve membran depolarizasyonuna neden olur. Bu mekanizma nöronal ölüme neden olan kaskadları başlattığı için eksitotoksisteden sorumlu tutulmaktadır. İskemide glutamatın hücre dışına çıkışı sodyum-bağlı glutamat transportu ile olduğundan sodyum kanal blokerlerinin hücre dışına glutamat salınımını azaltması yoluyla iskemiye karşı nöroprotektif etkili olabileceği düşünülebilir. Ayrıca glutamatın etkilerini dengeleyen bir mediatör olan gamma-aminobütirik asit (GABA) nörotransmitteri de glutamatın toksik etkilerini sınırlayabilir. Özet olarak topiramatin sodyum kanal blokajı ve/veya GABA aktivasyonu yolu ile iskemide nöroprotektif etki sergileyebileceği düşünülmüştür (Yang ve ark., 1998).

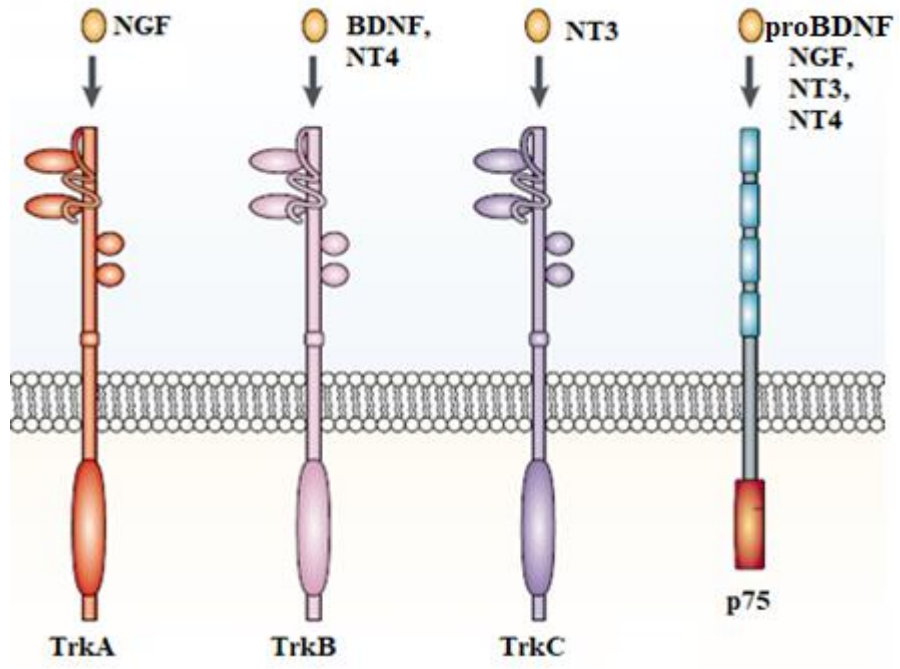
Topiramat ile bağımlılık çalışmaları nöroprotektif çalışmalardan daha önce başlamıştır. Alkol bağımlılığı üzerine etkilerinin araştırıldığı çalışmalarda topiramatin içme günü başına içki tüketimini (Johnson ve ark.,2003), ağır içki içilen gün oranını (Johnson ve ark., 2007) ve alkol tüketim günlerini azalttığı gösterilmiştir (Cohen 2014). Sıçanlarda naltrekson ile indüklenen morfin yoksunluk sendromunda topiramatin doza bağımlı olarak toplam davranışsal yoksunluk skorunu azalttığı görülmüştür. Topiramat uygulamasına bağlı ortaya çıkan bu etkilerden mezokortikolimbik dopamin aktivitesindeki azalma ve/veya glutamaterjik AMPA/kainat reseptörlerinin antagonizması sorumlu tutulmuştur. (Medrano ve ark., 2015). Opiat detoksifikasyon programı uygulanan ve üç hastadan oluşan vaka serisinde topiramat tedavisinin yoksunluk bulgularını baskıladığı gösterilmiştir (Zullino ve ark., 2002). Topiramatin kokain bağımlılarında kokain kullanımını ve arzusunu azaltmadığı halde şiddetli yoksunluk bulgularını baskıladığı gösterilmiş, bunun topiramatin anksiyolitik etkisine bağlı olabileceği düşünülmüştür (Kampman ve ark., 2013).

4.3. Beyin Kaynaklı Nörotrofik Faktör (BDNF)

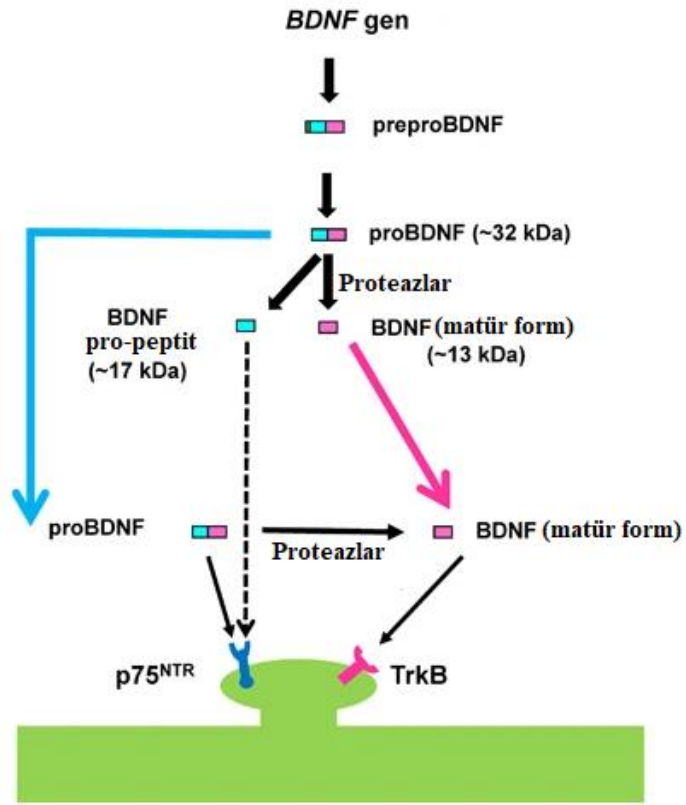
Nörotrofinler nöronların gelişimini, fonksiyonlarını ve hayatta kalmalarını sağlayan çok önemli proteinlerdir (Hempstead, 2006; Reichardt, 2006). Ayrıca nöronların ömür boyu korunmasına da katkıda bulunmaktadır (Allen ve Dawbarn, 2006). Nörotrofinler, beyin kaynaklı nörotrofik faktör (BDNF), sinir büyüme faktörü (NGF), nörotrofin-3 (NT-3) ve nörotrofin-4/5 (NT-4/5) olmak üzere dört üyeden oluşmaktadır (Billard ve Potier, 2009; Hempstead, 2014). Beşinci nörotrofin olan Nörotrofin-6 ise sadece balıklarda bulunmaktadır (Hempstead, 2014).

Nörotrofinlerin etkilerine aracılık eden iki sınıf reseptör tanımlanmıştır: p75 ve tirozin kinaz reseptörlerinin "Trk" ailesi (Şekil 2) (Allen ve Dawbarn, 2006). Nörotrofin reseptörlerinden Trk daha çok sinaptik plastisite ve nöronal yaşam ile, p75 ise hücre ölüm mekanizmaları ve hipokampal uzun dönem depresyonla ilişkilendirilmiştir (Hempstead, 2006).

Nörotrofin ailesinin önemli üyesi olan BDNF'nin merkezi ve periferik sinir sistemindeki varlığı 1980 yılında gösterildi (Hempstead, 2014). NT-3, NT-4/5 ve NGF ile yaklaşık % 50 oranında aminoasit bezerliği gösteren insan BDNF'nin matür formu (mBDNF) 11. kromozom tarafından kodlanmaktadır (Binder, 2003). BDNF veya mBDNF sinapslardaki moleküler yapıları değiştirerek, gen ekspresyonlarını etkileyerek vb yollarla ilaca bağlı uzun süreli nöroadaptasyon mekanizmaları düzenlemektedir (McGinty ve ark., 2010). BDNF, sinaptik plastisitenin yanı sıra hafızada da önemli bir yere sahiptir (Allen ve Dawbarn, 2006).



Şekil 2. Nörotrofinler ve bağlandıkları reseptörleri (Chao, 2003'ten uyarlanmıştır)



Şekil 3. BDNF ve proBDNF'nin öncül molekülden sentezi (Yang, 2017'den uyarlanmıştır)

BDNF sıklıkla nöronların dentrit, gövde ve aksonunda bulunur ve anterograd olarak taşınır. Özellikle amigdala, serebral korteks ve hipokampüste yoğun olarak sentezlenir. Erken postnatal dönemde artmaya başlayan üretimi yetişkin dönemine kadar devam eder (Binder, 2003). BDNF öncelikle preproBDNF prekürsör protein olarak sentezlenir. Daha sonra bu prekürsör protein proBDNF (32 kDa) proteinine, sonra ise proBDNF proteini intraselüler furin ya da pro-konvertaz enzimleriyle veya ekstraselüler metalloproteinaz ve purin gibi proteazlarla kesilerek mBDNF (14 kDa) proteine dönüşmektedir (Şekil 3) (Cunha ve ark., 2010).

mBDNF ve proBDNF genel olarak sinaptik plastisitede zıt yönde etki gösterirler. mBDNF TrkB reseptörüne yüksek afinite ile bağlanarak bu reseptörde dimerizasyonu tetikler, sitoplazmik tarafta tirozin fosforilasyonuna yol açarak, nöronal aktivite ve sinaptik plastisiteye katkıda bulunur. proBDNF ise p75NTR reseptörüne bağlanarak apoptotik olaylara neden olur (Teng ve ark., 2005; Woo ve Lu, 2009; McGinty ve ark., 2010).

BDNF ekspresyonu nöronal aktivite ile düzenlenmektedir. Görsel ve duyuşal uyarılar gibi birçok fizyolojik durumlar, ayrıca stres, Alzheimer ve depresyon gibi patolojik durumlar BDNF ekspresyonunu etkilemektedir (Woo ve Lu, 2009). BDNF ve yüksek afiniteli TrkB reseptörü sinaptik plastisitede önemli rol almaktadırlar. Ayrıca, eksitator ve inhibitör sinapslarda, hem presinaptik hem de postsinaptik lokalizasyonlarda görev alır. SSS’de bu kadar yaygın dağılıma sahip olması ve nöronlarda sinaptik plastisite modülasyonunda kritik roller üstlenmesi öğrenme-bellek gibi fizyolojik olaylarda ve depresyon, epilepsi, ağrı, bağımlılık ve yoksunluk gibi daha birçok SSS patolojilerinde BDNF’nin rol oynadığına işaret eder (Binder, 2003; Heberlein ve ark., 2011). Öğrenme ve hafıza, SSS’deki sinapsların modifikasyonuna bağlıdır, BDNF sinapslarda uzun dönem potansiasyonda rol almaktadır, bu yüzden öğrenme ve hafızada moleküler olarak rol oynadığı düşünülebilir. Ayrıca limbik sistemin önemli bir yapısı olan ve uzaysal hafızada önemli rolü olan hipokampüste BDNF yaygın bir ekspresyona sahiptir (Binder, 2003).

Sıçanlarda kokain yoksunluğunda BDNF düzeylerinin araştırıldığı bir çalışmada, kokain geri çekildikten sonra VTA, NAc ve amigdalada BDNF seviyelerinin kontrol grubuna göre arttığı gösterildi (Grimm ve ark., 2003). Opiat ‘*maintenance programme*’ kapsamında diasetilmorfin tedavisi alan 28 opiat bağımlı erkek hastada

serum BDNF düzeyleri kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde yüksek bulundu. Aynı çalışmada bağımlı hastalarda, serum BDNF düzeyleri ile opiata özlem duyma (*craving*) arasında pozitif bir korelasyon gösterildi (Heberlein ve ark., 2011). Ortabeyinde dopamin salınımının düzenlenmesinde rolü olan ve dopaminerjik nöronlara destek sağlayan BDNF, sinaptik iletimde uzun süreli potansiasyonda da rol oynamaktadır (Heberlein ve ark., 2011). Morfin bağımlılığı ve yoksunluğunun frontal kortekste BDNF ve proBDNF üzerine etkisinin incelendiği bir çalışmada, bağımlı sıçanlarda 5 gün süresince morfin subkütan (s.c.) enjeksiyonu yapıp, son morfin enjeksiyonundan 2 saat sonra, morfin yoksunluğu geliştirilenlerde ise son morfin enjeksiyonundan 60 saat sonra sıçanların beyinleri çıkarılmıştır. Frontal kortekste hem morfin yoksunluğunun hem de morfin tedavisinin BDNF seviyelerini kontrol gruplarına göre anlamlı olarak artırdığı gösterilmiştir. proBDNF seviyelerini kontrol gruplarına göre anlamlı olarak artırmış, üstelik morfin yoksunluğunda kronik morfin tedavisine göre daha anlamlı bir artış göstermiştir. Striatumda ise kronik morfin tedavisinin BDNF'yi artırdığı halde proBDNF'nin etkilenmediği; morfin yoksunluğunun proBDNF'yi anlamlı olarak artırırken, BDNF'yi değiştirmedeği gösterilmiştir (Bachis ve ark., 2017).

Bu çalışmada, morfin bağımlılığı ve yoksunluğunda önemli yeri olan NAc bölgesine lokal uygulanan topiramatin naloksonla indüklenen morfin yoksunluğu sendromu bulgularına etkisi nöroprotektif ve apoptotik etkisi bilinen BDNF ve prekürsörü olan proBDNF döngüsünün bu etkide ki rolü incelenmiştir.

5. GEREÇ VE YÖNTEM

Tez çalışmasında uygulanan çalışma protokolü MÜHDEK (Marmara Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu) tarafından onaylandı (83.2017.mar) (Ek-1). Araştırma süresince deneyler Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı ve Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyofizik Anabilim Dalında gerçekleştirildi. Çalışmanın desteklenmesi için Marmara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi (BAPKO; SAG-C-DRP-200318-0098)'ne başvuru yapılarak onay alındı.

5.1. Deney Hayvanlarının Özellikleri

Deneylerde 240-400 gram ağırlıkları arasında, 3-6 aylık erkek, 38 adet Wistar sıçan kullanıldı. Marmara Üniversitesi Deney Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezinden temin edilen sıçanlar, çalışma süresince nem kontrolü ve sabit ısının ($21\pm4^{\circ}\text{C}$) sağlandığı bir bakım odasında barındırıldı. 12 saat aydınlık-karanlık döngüsü sağlanan bakım odasında, sıçanların yem ve suya erişimleri kısıtlanmadı. Deney süresince her kafeste bir hayvan olacak şekilde barındırıldı.

Hayvanlar deney protokolü gereğince 7 gruba ayrıldılar: Kontrol, Bağımlı, Yoksun, ICV-T (intracerebroventriküler (ICV) topiramat tedavisi uygulanan grup), ICV-K (ICV SF uygulanan grup), NAc-T (NAc bölgesine topiramat uygulanan grup), NAc-K (NAc bölgesine SF uygulanan grup)

5.2. Stereotaksi Cerrahi Yöntemi

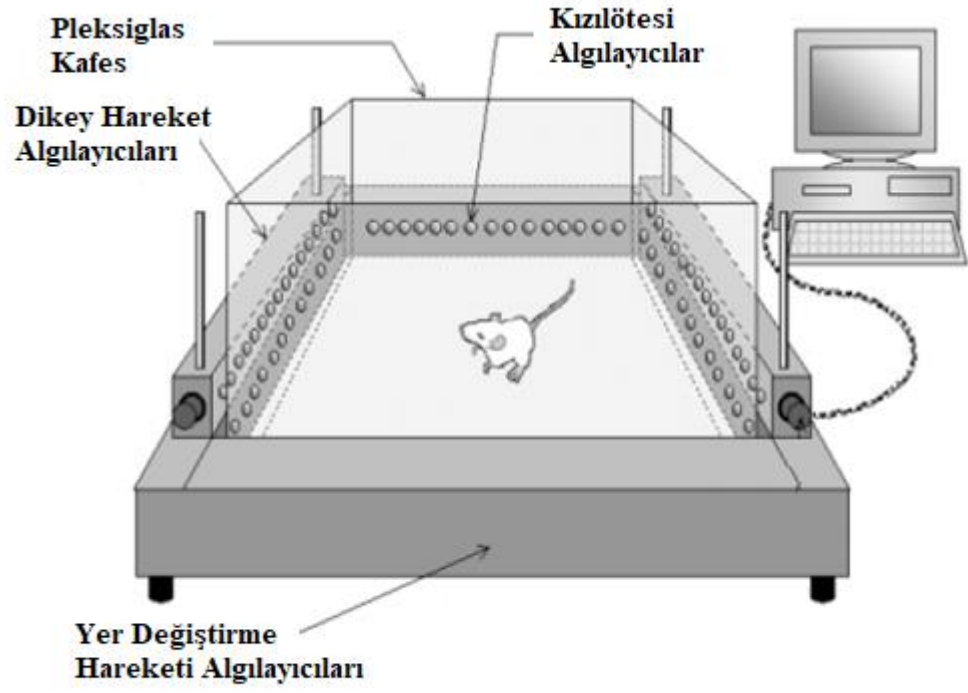
Çalışmada lateral ventriküle (ICV-T, ICV-K) ya da NAc bölgesine (NAc-K, NAc-T) madde uygulanacak, gruplara stereotaksi cerrahi işlemi yapıldı. Ketamin (100 mg/kg, i.p) ve ksilazin (10 mg/kg, i.p) anestezisi altındaki sıçanlar stereotaksi aletine

(Stoelting Model 51600, A.B.D.) yerleştirilmelerini takiben, kafa üzerindeki tüyler kesildi. Antiseptik solüsyonla temizlenen kafa derisine longitudinal insizyon açılıp, periost temizlenerek kafatası ortaya çıkarıldı. Sabitleme işlemi için hayvanların kafatasına sağ frontale 1 adet, sağ oksipitale 1 adet, sol oksipitale 1 adet olmak üzere toplam 3 adet sabitleme vidaları yerleştirildi.

NAC'a topiramet uygulanacak NAC-T ve serum fizyolojik (SF) uygulanacak NAC-K gruplarındaki sıçanlara sıçan beyin atlası (Paxinos ve Watson, 2007) kullanılarak ve bregma noktası referans alınarak AP: +1.7 mm, ML: ± 2 mm, 10° açıyla, V: -7.1 mm koordinatlarına bilateral çelik kılavuz kanüller yerleştirildi. İntraserebroventriküler (ICV) olarak topiramet uygulanacak ICV-T ve SF uygulanacak ICV-K gruplarındaki sıçanlara da sıçan beyin atlası (Paxinos ve Watson, 2007) kullanılarak ve bregma noktası referans alınarak AP: -1 mm, ML: - 1.5 mm, V: - 3.5 mm koordinatlarına ICV ipsilateral çelik kılavuz kanüller yerleştirildi. Kanüller soğuk dental akrilik ile kafatasına sabitlendi. Çelik kılavuz kanüllerin tıkanmaması için muhafaza (dummy) kanül içine yerleştirildi.

5.3. Lokomotor Aktivite Ölçümleri

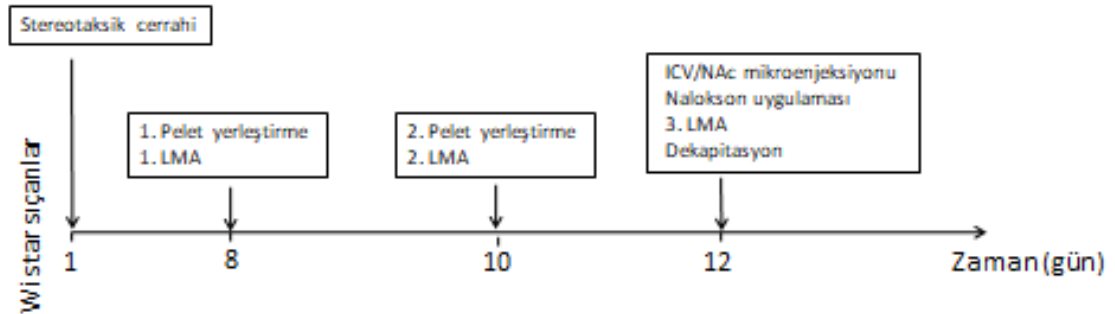
Deney süresince sıçanların lokomotor aktiviteleri AMS9701 (CommatLtd., Ankara/Türkiye) lokomotor aktivite görüntüleme sistemi ile ölçüldü. Locomotor aktivite (LMA) görüntüleme sistemi, deney hayvanlarının yatay ve dikey eksenindeki hareketlerini, hayvanların konumu ve yer değişikliğini algılayan kızıl ötesi sensörler bulunan LMA kafesi ve bu sensörleri kaydeden bir bilgisayardan meydana gelmektedir.



Şekil 4. Lokomotor Aktivite Görüntüleme Sistemi (Uzbay Tİ, 2009'dan uyarlanmıştır)

Deney süresince hayvanların lokomotor aktivite ölçümleri günün aynı saatlerinde ve 15 dk olacak şekilde yapıldı. Locomotor aktivite ölçümü sırasında her bir hayvan için horizontal, ambulator, stereotipik, vertikal hareket sayısı ve toplam kat edilen mesafe kaydedildi. Yoksunluk tablosu geliştirilen sıçanlarda ise lokomotor ölçümleri sırasında yoksunluk skorlaması uygulandı.

Stereotaksi cerrahisi uygulanan, morfin bağımlılığı ve yoksunluk tablosu geliştirilen sıçanlara yedi günlük iyileşme sürecini takiben lokomotor aktivite ölçümleri yapılarak morfin peletleri yerleştirildi. Deney süresince tüm sıçanlara toplam üç adet lokomotor aktivite ölçümü yapıldı. Birinci lokomotor aktivite ölçümü stereotaksik cerrahi sonrası 8.gün ilk morfin peleti takılmadan önce, ikinci ölçüm 10.gün ikinci morfin peleti takılmadan önce, üçüncü ölçüm ise 12.gün ICV ve NAc'a lokal ejeksiyonlardan sonra nalokson (3mg/kg, i.p.) uygulamalarının ardından yapıldı.



Şekil 5. Deney protokolü ve akış planının grafik ile gösterimi

5.4. Morfin Bağımlılığı Oluşturma Yöntemi

Morfin bağımlılığı 75 mg baz morfin içeren peletlerin sıçanların cilt altına hafif eter anestezisi altında yerleştirilmesiyle gerçekleştirildi.

Stereotaksi uygulanmayan Bağımlı ve Yoksun Gruplarındaki sıçanlarda, deneyin 1. gününde 1 adet (75 mg), deneyin 3. gününde 2 adet (150 mg) olmak üzere toplam 3 adet 75 mg baz morfin içeren yavaş salınımlı pelet yerleştirildi. Stereotaksi cerrahisi uygulanan ICV-T, ICV-K, NAc-K ve NAc-T Gruplarındaki sıçanlarda ise, bir haftalık iyileşme sürecinden sonra, deneyin 8. gününde 1 adet (75 mg), deneyin 10. gününde 2 adet (150 mg) olmak üzere toplam 3 adet 75 mg baz morfin içeren yavaş salınımlı pelet sıçanların sırt bölgesinde cilt altına hafif eter anestezisi altında yerleştirildi.

Kontrol grubunda morfin bağımlılığı geliştirilmediği için pelet yerleştirme işlemi yapılmadı.

5.5. Yoksunluk Tablosu Oluşturma Yöntemi

Yoksunluk tablosu Yoksun, ICV-T, ICV-K, NAc-K ve NAc-T Gruplarında oluşturuldu.

Morfin bağımlılığı oluşturulan ve stereotaksi cerrahisi yapılmayan sıçanlara ilk morfin peletinin yerleştirilmesinden sonra 5. günde nalokson (3mg/kg, i.p.) uygulanarak yoksunluk tablosu oluşturuldu. Morfin bağımlılığı oluşturulan ve stereotaksi cerrahisi yapılan sıçanlarda ise ilk morfin peletinin yerleştirilmesinden sonra 5. günde ICV ve NAc'a lokal tedavi uygulamalarından sonra, nalokson (3mg/kg, i.p.) uygulanarak yoksunluk tablosu oluşturuldu.

Sıçanların nalokson enjeksiyonundan sonra ICV-T, ICV-K, NAc-K ve NAc-T gruplarının lokomotor aktivite ölçümleri yapıldı ve bu ölçüm sırasında yoksunluk belirtileri skorlandı (Tablo 2).

5.6. Yoksunluk Bulgularının Değerlendirilmesi

Nalokson ile oluşturulan yoksunluk tablosunda sıçanların nalokson enjeksiyonundan sonra LMA ölçümleri yapıldı ve ıslak köpek silkinmesi, sıçrama, dış gıcırdatma, kanlı gözyaşı, pitozis, dokununca çığlık atma ve diyare gibi bulguları 15 dakika süreyle gözlemlenerek skorlandı (Pinelli and Trivulzio, 1998; El-Kadi ve Sharif, 1998). Yoksunluk sırasında ağırlık kayıplarının değerlendirilmesi amacıyla yoksunluk tablosu oluşturulmadan önce ve sonra sıçanların ağırlıkları ölçüldü (Tablo 2).

Tablo 2. Yoksunluk tablosu geliştirilen hayvanlarda 15 dakika süre ile gözlemlenen ve skorlanan yoksunluk bulguları (Pinelli and Trivulzio, 1998; El-Kadi ve Sharif, 1998)

Semptomlar	Hayvan no:
Tarih	
Yoksunluk tetiklenmeden önceki ağırlık (gram)	
Sıçrama no	
Islak köpek no	
Defekasyon no	
Diare skor (0-3)	
Diş gıcırdatma skor (0-10)	
Ptozis skor (0-3)	
Dokununca çığlık atma (var-yok)	
Eşeleme no	
Karın germe no	
Tremor no	
Kanlı gözyaşı (var-yok)	
Ağırlık kaybı (gram)	

5.7. Frontal Korteks Diseksiyonu

Deney sonunda hayvanlar dekapite edilip beyinleri çıkarılarak -80°C'de saklandı. Daha sonra frontal kortikal bölgeleri eksize edilmek üzere -80°C' den çıkarılan ve soğuk bir düzeneğe yerleştirilen beyin dokuları, sağ ve sol hemisfere ayrılacak şekilde kesildi. Daha sonra her bir hemisferden olfaktör bulbus bölgesi ayrıştırılarak uzaklaştırıldı. Kalan beyin dokularının, frontal bölgeleri eksize edilerek frontal korteks ayrıştırıldı (Chiu ve ark., 2007). Ayrıştırılan doku Western Emdirimi Analizi gününe kadar -80°C'de saklandı.

5.8. Deney Protokolü

Çalışmada kullanılan sıçanlar Tablo 3’de belirtilen şekilde deney gruplarına ayrıldı.

Tablo 3. Deney grupları ve gruplardaki sıçanların dağılımları

Deney Grupları	LMA Ölçümleri	Pelet Yerleşimi	Topiramat/SF Mikroenjeksiyonu	Nalokson Enjeksiyonu	Hayvan Sayısı	Western Emdirimi Analizi
Kontrol	-	-	-	-	4	4
Bağımlı	-	3 adet	-	-	4	4
Yoksun	-	3 adet	-	3mg/kg	4	4
ICV-T	3 kez	3 adet	Topiramat 100 µM 2µL/unilateral	3mg/kg	6	4
ICV-K	3 kez	3 adet	SF 2µL/unilateral	3mg/kg	6	4
NAC-T	3 kez	3 adet	Topiramat 100 µM 500 nL/bilateral	3mg/kg	7	4
NAC-K	3 kez	3 adet	SF 500 nL/bilateral	3mg/kg	7	4
Toplam					38	28

Kontrol grubunda morfin bağımlılığı ve yoksunluk tablosu geliştirilmedi

Bağımlı grubundaki sıçanlarda sadece morfin bağımlılığı geliştirildi, yoksunluk tablosu geliştirilmedi. Deneyin 1. günü sıçanların cilt altına, hafif eter anestezisi altında 75 mg baz morfin içeren bir adet morfin peleti yerleştirildi. 48 saat sonra her biri 75 mg baz morfin içeren 2 adet morfin peleti sıçanların cilt altına hafif eter anestezisi altında yerleştirildi.

Yoksun grubundaki sıçanlarda hem morfin bağımlılığı hem de yoksunluk tablosu geliştirildi. Deneyin 1. günü sıçanların cilt altına, hafif eter anestezisi altında 75 mg baz morfin içeren bir adet morfin peleti yerleştirildi. 48 saat sonra her biri 75 mg baz morfin içeren 2 adet morfin peleti sıçanların cilt altına hafif eter anestezisi altında yerleştirildi. Son peletin yerleştirilmesinden 48 saat sonra sıçanlara nalokson (3 mg/kg, i.p.) uygulanıp yoksunluk sendromu oluşturuldu.

ICV-T, ICV-K, NAc-T ve NAc-K gruplarındaki sıçanlara stereotaksi cerrahi işlemi uygulandı. Stereotaksi cerrahisi sonrası iyileşme dönemi olarak belirlenen 7 günün ardından deneyin 8. günü birinci lokomotor aktivite ölçümü yapıldı, sonrasında sıçanların cilt altına, hafif eter anestezisi altında 75 mg baz morfin içeren bir adet morfin peleti yerleştirildi. Deneyin 10. günü sıçanların ikinci lokomotor aktiviteleri ölçüldü ve takiben her biri 75 mg baz morfin içeren 2 adet morfin peleti sıçanların cilt altına hafif eter anestezisi altında yerleştirildi. Deneyin 12. günü sıçanların NAc bölgesine bilateral topiramat 100 μ M 500 nL (bilateral olarak toplam 1 μ L; 0,03 μ g/1 μ L) veya aynı hacimde SF, ICV olarak ise unilateral topiramat 100 μ M 2 μ L (0,03 μ g/1 μ L) veya aynı hacimde SF mikroenjeksiyonu uygulandı. Mikroenjeksiyonun ardından sıçanlara nalokson (3 mg/kg, i.p.) uygulanıp yoksunluk tablosu oluşturuldu ve sıçanların 3. lokomotor aktivite ölçümleri yapıldı. 3. lokomotor aktivite ölçümleri sırasında sıçanlarda geliştirilen yoksunluk tablosu değerlendirilerek skorlandı. Yoksunluk tablosu oluşturulmadan önce ve sonra sıçanların ağırlıkları ölçüldü ve ağırlık kayıpları değerlendirildi.

Deney sonunda hayvanlar dekapite edilip, çıkartılan beyinler frontal korteks bölgeleri eksize edilmek üzere -80°C'de saklandı (Chiu ve ark., 2007).

5.9. Maddeler ve Mikroenjeksiyon

Topiramat (Acros-456190010) ve nalokson hidroklorür dihidrat (Sigma-N7758) ilaçları kullanıldı. Topiramat ve nalokson serum fizyolojikte çözülerek hazırlandı. Mikroenjeksiyon stereotaksi cerrahisi ile yerleştirilen kılavuz kanüllerden, Hamilton (1 µL) mikroiğnesine bağlı polietilen tüp ve internal kanüller ile gerçekleştirildi.

Bilateral NAc bölgesine uygulanan mikroenjeksiyonlar 500 nL (bilateral olarak toplam 1µL) hacminde SF veya aynı hacimde SF solüsyonunda çözünmüş topiramat 100 µM'dan oluşmaktadır. ICV olarak unilateral uygulanan mikroenjeksiyonlar 2µL hacminde SF veya aynı hacimde SF solüsyonunda çözünmüş topiramat 100 µM'dan oluşmaktadır.

5.10. BDNF ve proBDNF İçin Western Emdirimi Analizi

5.10.1. Hücre lizatlarının hazırlanması

Eksize edilen ve -80 °C’ de saklanan frontal korteks örnekleri, bıçaklı homojenizatör ile RIPA (radioimmunoprecipitation assay buffer, Ripa-100, ECO-TECH) tamponunda proteaz inhibitörleri varlığında homojenize edildi. Protein rnekleri -80 °C’ de Lowry yöntemi (Lowry ve ark., 1951) ile protein miktar tayini yapılmak için saklandı.

5.10.2. Protein miktar tayini

Homojenatların protein miktar tayini bazık ortamda (pH=10-10,5) proteinlerin peptid bağlarındaki azotların bakır (II) iyonlarıyla mor renkte kompleks oluşturması ilkesine dayanan Lowry yöntemi ile yapıldı (Lowry ve ark., 1951). Ölçümler Synergy H1 spektrofotometrede (BioTEK) yapıldı. Protein miktarının kantitatif ölçümünde, kalibrasyon için BSA (bovin serum albümin) kullanılıp, 750 nm dalga boyunda ölçüldü. Daha sonra örnekler seyreltilip 30 g protein içerecek şekilde hazırlandı, Lowry reaktifleri eklendikten sonra 750 nm dalga boyunda ölçümlere devam edildi.

5.10.3. Elektroforez

Protein rnekleri (30 g), 4x örnek tamponu ile karıştırılarak 100°C’ de 3-5 dakika kaynatılarak denatüre edildi. Örnekler, elektroforez sıvısı içinde %12’ lik SDS-PAGE (Sodyum Dodesil Sülfat–Poliakrilamid Jel Elektroforezi) jeline yüklenerek, 1.5 saat 150 volt’ da yürütüldü.

5.10.4. Elektroforetik transfer düzeneği ile elektroforetik transfer

Transfer Iblot2 (ThermoFisher Scientific) transfer cihazı ve ona uygun transfer membranları (IB301002, ThermoFisher) ile yapıldı. Ponceau S boyası ile boyanan membranlarda transferin gerçekleşip gerçekleşmediği kontrol edildi.

5.10.5. Western emdirimi analizi

Homojenize edilen beyin dokularından BDNF ve proBDNF ekspresyonunun ilaçlarla değişimini gösterebilmek için Lowry yöntemi ile protein miktar tayini yapılan doku örneklerinden herbiri 30 µg protein içeren örnekler hazırlandı. Her bir örnek yükleme boyası ile kaynatılıp denatüre edildi. Örneklerin akrilik jelde dikey elektroforezde 80mA'de 1 saat yürütülerek moleküler büyüklüklerine göre ayrılması sağlandı. Örnekler jelde yürütüldükten sonra antikor ile muamele edebilmek için nitroselüloz membranlara aktarıldı. Aktarma işlemi Invitrogene ait iBlot2 düzeneği ile hazır membranlar kullanılarak yapıldı. Aktarım sonrası protein örneklerinin jelden membrana geçip geçmediği ponceau S boyası kullanılarak belirlendi. Boya, distile su ile yıkanarak membranlardan uzaklaştırıldı. Membranlar 1 gece BSA içeren blok solüsyonunda bekletildi. Blok solüsyonu uzaklaştırıldıktan sonra örnekler 1 gece 1:1000 konsantrasyonunda BDNF antikor (SantaCruz: sc20981) veya proBDNF antikor (Abcam: ab108319) ile muamele edildi. Membran 3 kere 15'er dakika TBS-T (tris-buffered saline-tween-20) solüsyonu ile yıkanıp görüntülemeyi sağlayabilmek için 1 saat alkalen fosfataz eşlenik tavşan anti-keçi IgG antikor (Sigma; a3812) ile muamele edildi. İkincil antikor muamelesi sonrası membranlar 3 kere 15'er dakika TBS-T ile yıkandı. Membranlar hücre içsel kontrolü için 1:1000 konsantrasyonunda beta-aktin (Novus; nb600-532) antikor ile muamele edildi ve TBS-T ile yıkama işlemleri yapıldı. Yıkama işlemi sonrası membranlar BCIP/NBT (5-bromo-4-chloro-3'-indolylphosphate p-toluidine salt/ nitro-blue tetrazolium chloride; ThermoFisher, 34042) solüsyonu ile muamele edildi, her bir bant için renk reaksiyonu başladığında reaksiyon su ile durduruldu. Membranların fotoğrafları çekilip bilgisayar ortamına aktarıldı. Her bir bantın optik dansitesi ImageJ programı ile belirlendi.

(<https://imagej.nih.gov/ij/download.html>). BDNF ve proBDNF'e ait her bir bantın optik dansitesi beta-aktin antikoruyla ait bantın optik dansitesine bölünerek değerlendirildi.

5.11. Verilerin Analizi

Deney gruplarından elde edilen veriler ortalama $\pm$ standart hata olarak verildi. Veriler GraphPAD Prism 8 yazılımı kullanılarak analiz edildi. Yoksunluk bulgularından parametrik olarak kabul edilen sıçrama, ıslak köpek silkinmesi, ağırlık kaybı değişkenleri yanında tüm lokomotor aktivite davranışları, BDNF/proBDNF oranının ICV-NAc gruplarındaki değişimleri two-tailed unpaired t-test ile değerlendirildi. Non-parametrik olarak kabul edilen yoksunluk bulgularından dış gıcırdatma ve pitozis değişkenleri ise Mann-Whitney U testi ile değerlendirildi. BDNF/proBDNF oranının kontrol, morfin bağımlısı ve yoksun gruplarında karşılaştırılmasında ise tek yönlü ANOVA post hoc Tukey yöntemi kullanılarak analiz edildi. $p < 0.05$ anlamlılık düzeyi olarak kabul edildi.

6. BULGULAR

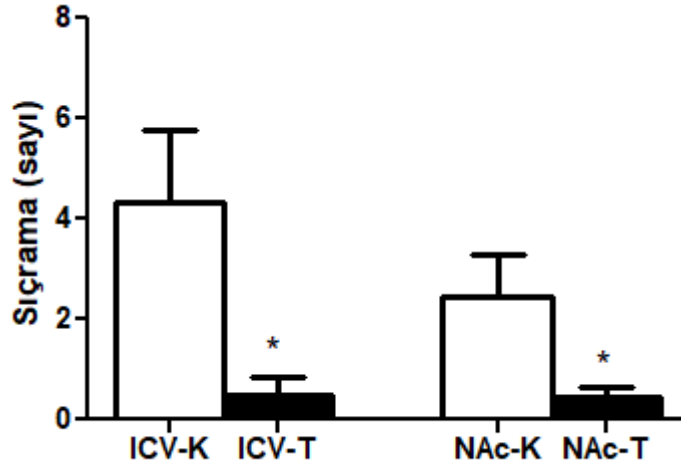
6.1. ICV ve NAc'a Uygulanan Topiramatin Naloksonla İndüklenen Morfin Yoksunluğunda Yoksunluk Bulgularına ve Lokomotor Aktivite Üzerine Etkisi

ICV-T (n=6), ICV-K (n=6), NAc-T (n=7) ve NAc-K (n=7) gruplarındaki sıçanların hepsinde morfin bağımlılığı geliştirildi ve naloksonla indüklenen yoksunluk belirtileri izlendi.

6.1.1. ICV ve NAc'a uygulanan topiramatin naloksonla indüklenen morfin yoksunluğunda yoksunluk bulgularına etkisi

6.1.1.1. ICV ve NAc'a uygulanan topiramatin nalokson ile indüklenen morfin yoksunluğunda sıçrama sayısı üzerine etkisi

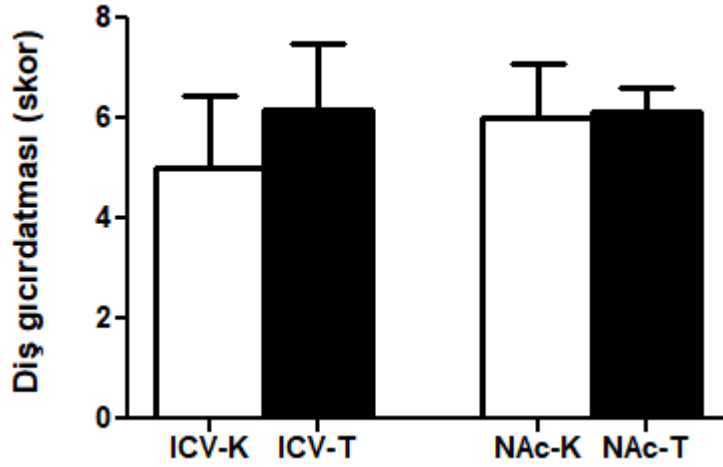
Nalokson uygulamasını takiben ICV-K grubunda $4,3 \pm 1,4$ olarak bulunan sıçrama sayısı ICV-T grubunda $0,5 \pm 0,3$ olarak azalmıştır. Bu azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p=0,026$; $t=2,61$; $df=10$; Şekil 6). Nalokson uygulamasını takiben NAc-K grubunda $2,4 \pm 0,9$ olarak bulunan sıçrama sayısı NAc-T grubunda $0,4 \pm 0,2$ olarak azalmıştır. Bu azalma istatistiksel olarak anlamlı farklı bulunmuştur ($p=0,04$; $t=2,24$; $df=12$; Şekil 6).



Şekil 6. ICV-T (n=6) ve NAc-T (n=7) gruplarına bilateral mikroenjeksiyon ile uygulanan topiramatin, nalokson (3mg/kg) ile indüklenen morfin yoksunluğundaki sıçrama sayısı üzerine etkisi. Kontrol gruplarına (ICV-K (n=6); NAc-K (n=7)) aynı hacim içerisinde taşıyıcı uygulanmıştır. Veriler ortalama $\pm$ standart hata olarak verilmiştir. * $p<0,05$ kontrol grubuna göre

6.1.1.2. ICV ve NAc'a uygulanan topiramatin nalokson ile indüklenen morfin yoksunluğunda diş gıcırdatma davranışı üzerine etkisi

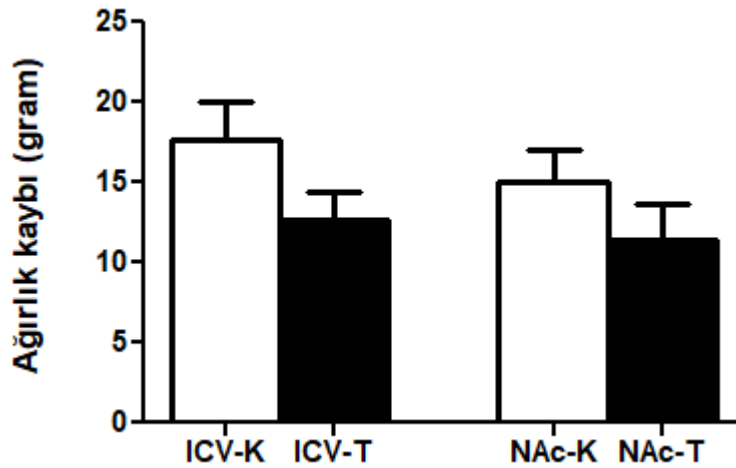
Nalokson uygulamasını takiben ortaya çıkan diş gıcırdatma davranışı ICV-K grubunda $5,0 \pm 1,4$; ICV-T grubunda ise $6,2 \pm 1,3$ olarak; NAc-K grubunda $6,0 \pm 1,1$; NAc-T grubunda $6,1 \pm 0,4$ olarak bulunmuştur. Bu sonuçlar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır (ICV grubunda $p=0,61$; Mann-Whitney $U=14,5$; NAc grubunda $p=0,68$; Mann-Whitney $U=21$; Şekil 7).



Şekil 7. ICV-T (n=6) ve NAc-T (n=7) gruplarına bilateral mikroadjektasyon ile uygulanan topiramatin, nalokson (3mg/kg) ile indüklenen morfin yoksunluğundaki diş gıcırdatma davranışı üzerine etkisi. Kontrol gruplarına (ICV-K (n=6); NAc-K (n=7)) aynı hacim içerisinde taşıyıcı uygulanmıştır. Veriler ortalama $\pm$ standart hata olarak verilmiştir.

6.1.1.3. ICV ve NAc'a uygulanan topiramatin nalokson ile indüklenen morfin yoksunluğunda ağırlık kaybı üzerine etkisi

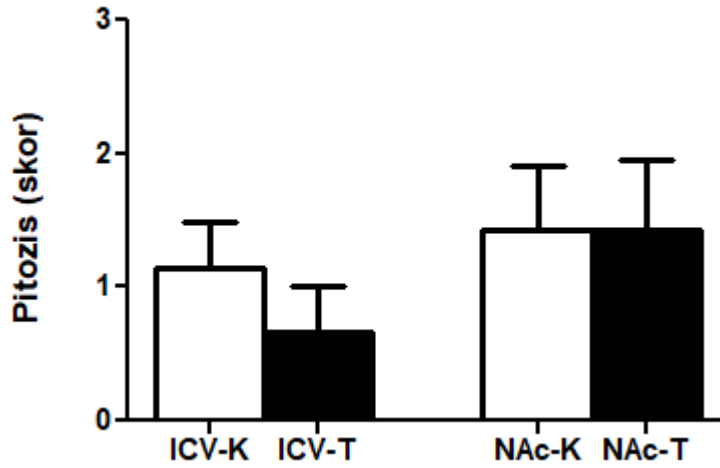
Nalokson uygulamasını takiben ortaya çıkan ağırlık kaybı ICV-K grubunda $17,7 \pm 2,3$; ICV-T grubunda ise $12,67 \pm 1,7$ olarak bulunmuştur. Bu sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p=0,1$; $t=1,74$; $df=10$; Şekil 8). Nalokson uygulamasını takiben ortaya çıkan ağırlık kaybı NAc-K grubunda $15,5 \pm 2,28$; NAc-T grubunda $11,4 \pm 2,2$ olarak bulunmuştur. Bu sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p=0,22$; $t=1,29$, $df=11$; Şekil 8).



Şekil 8. ICV-T (n=6) ve NAc-T (n=7) gruplarına bilateral mikroenjeksiyon ile uygulanan topiramatin, nalokson (3mg/kg) ile indüklenen morfin yoksunluğundaki ağırlık kaybı üzerine etkisi. Kontrol gruplarına (ICV-K (n=6); NAc-K (n=7)) aynı hacim içerisinde taşıyıcı uygulanmıştır. Veriler ortalama $\pm$ standart hata olarak verilmiştir.

6.1.1.4. ICV ve NAc'a uygulanan topiramatin nalokson ile indüklenen morfin yoksunluğunda pitozis skoru üzerine etkisi

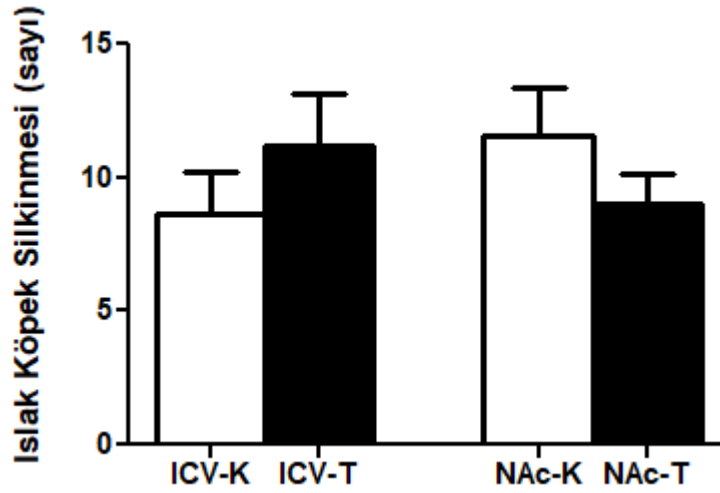
Nalokson uygulamasını takiben ortaya çıkan pitozis skoru ICV-K grubunda $1,1 \pm 0,3$; ICV-T grubunda ise $0,67 \pm 0,3$ olarak bulunmuştur. Bu sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p=0,36$; Mann-Whitney $U=14,5$; Şekil 9). Nalokson uygulamasını takiben ortaya çıkan pitozis skoru NAc-K grubunda $1,4 \pm 0,5$; NAc-T grubunda $1,4 \pm 0,5$ olarak bulunmuştur. Bu sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p=1$; Mann-Whitney $U=24$; Şekil 9).



Şekil 9. ICV-T (n=6) ve NAc-T (n=7) gruplarına bilateral mikroenjeksiyon ile uygulanan topiramatin, nalokson (3mg/kg) ile indüklenen morfin yoksunluğundaki pitozis skoru üzerine etkisi. Kontrol gruplarına (ICV-K (n=6); NAc-K (n=7)) aynı hacim içerisinde taşıyıcı uygulanmıştır. Veriler ortalama $\pm$ standart hata olarak verilmiştir.

6.1.1.5. ICV ve NAc'a uygulanan topiramatin nalokson ile indüklenen morfin yoksunluğunda ıslak köpek silkinme hareketi üzerine etkisi

Nalokson uygulamasını takiben ortaya çıkan ıslak köpek silkinme hareketi ICV-K grubunda $8,7 \pm 1,5$; ICV-T grubunda ise $11,2 \pm 1,9$ olarak bulunmuştur. Bu sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p=0,34$; $t=1,0$, $df=10$; Şekil 10). Nalokson uygulamasını takiben ortaya çıkan ıslak köpek silkinme hareketi NAc-K grubunda $11,6 \pm 1,8$; NAc-T grubunda $9,0 \pm 1,5$ olarak bulunmuştur. Bu sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p=0,25$; $t=1,21$, $df=12$; Şekil 10).



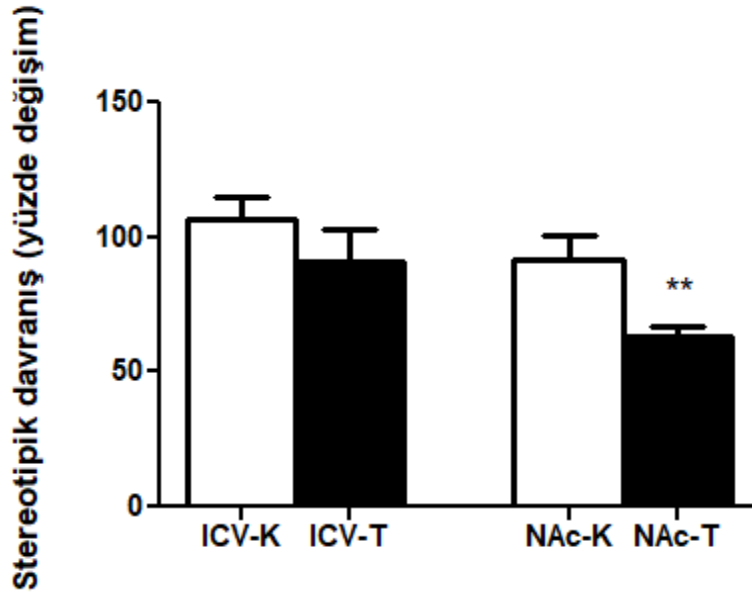
Şekil 10. ICV-T (n=6) ve NAc-T (n=7) gruplarına bilateral mikroenjeksiyon ile uygulanan topiramatin, nalokson (3mg/kg) ile indüklenen morfin yoksunluğundaki ıslak köpek silkinme hareketi üzerine etkisi. Kontrol gruplarına (ICV-K (n=6); NAc-K (n=7)) aynı hacim içerisinde taşıyıcı uygulanmıştır. Veriler ortalama $\pm$ standart hata olarak verilmiştir.

6.1.2. ICV ve NAc'a uygulanan topiramatin naloksonla indüklenen morfin yoksunluğunda lokomotor aktivite üzerine etkisi

6.1.2.1 ICV ve NAc'a uygulanan topiramatin naloksonla indüklenen morfin yoksunluğunda stereotipik davranışların yüzde değişimine etkisi

Değerlendirmede naloksonla tetiklenen morfin yoksunluğundaki stereotipik davranışların yoksunluk öncesine göre yüzde değişimi kullanıldı.

Nalokson uygulamasını takiben ortaya çıkan stereotipik davranışların yüzde değişimi ICV-K grubunda $106,9 \pm 8,26$; ICV-T grubunda ise $90,98 \pm 12,21$ olarak bulunmuştur. Bu sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p=0,31$; $t=1,08$; $df=10$; Şekil 11). NAc-K grubunda $91,8 \pm 8,6$ olarak bulunan stereotipik davranışların yüzde değişimi NAc-T grubunda $63,3 \pm 3,4$ olarak azalmıştır. Bu azalma istatistiksel olarak anlamlı farklı bulunmuştur ($p=0,009$; $t=3,07$; $df=12$; Şekil 11).

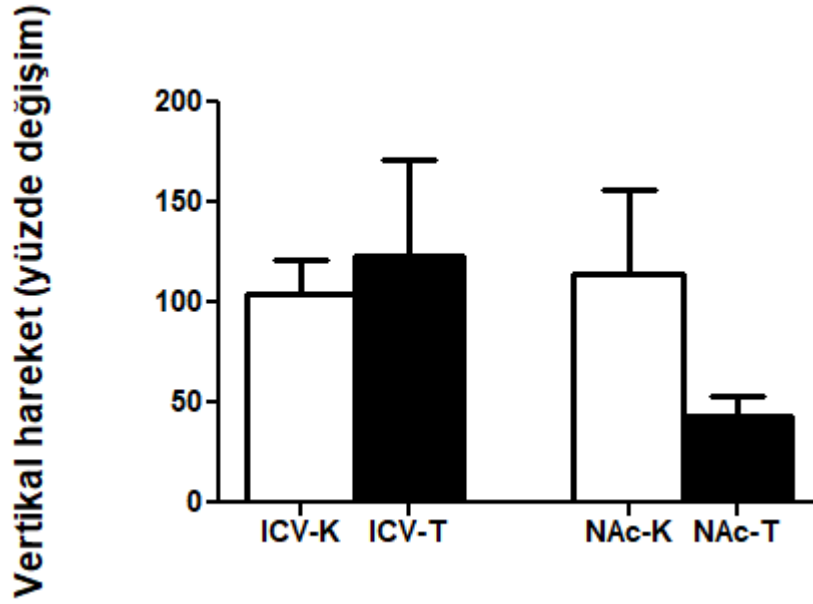


Şekil 11. ICV-T (n=6) ve NAc-T (n=7) gruplarına bilateral mikroenjeksiyon ile uygulanan topiramatin, nalokson (3mg/kg) ile indüklenen morfin yoksunluğundaki stereotipik davranışların yoksunluk öncesine göre yüzde değişimi üzerine etkisi. Kontrol gruplarına (ICV-K (n=6); NAc-K (n=7)) aynı hacim içerisinde taşıyıcı uygulanmıştır. Veriler ortalama $\pm$ standart hata olarak verilmiştir. ** $p<0,01$ kontrol grubuna göre

6.1.2.2. ICV ve NAc'a uygulanan topiramatin naloksonla indüklenen morfin yoksunluğunda vertikal hareketlerin yüzde değişimine etkisi

Değerlendirmede naloksonla indüklenen morfin yoksunluğundaki vertikal hareketlerin yoksunluk öncesine göre yüzde değişimi kullanıldı.

Nalokson uygulamasını takiben ortaya çıkan vertikal hareketlerin yüzde değişimi ICV-K grubunda $104,5 \pm 16,41$, ICV-T grubunda ise $123,3 \pm 48,30$ olarak bulunmuştur. Bu sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p=0,72$; $t=0,37$, $df=10$; Şekil 12). Nalokson uygulamasını takiben ortaya çıkan vertikal hareketlerin yüzde değişimi NAc-K grubunda $114,2 \pm 42,37$; NAc-T grubunda $42,77 \pm 10,38$ olarak bulunmuştur. Bu sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p=0,13$; $t=1,64$; $df=12$; Şekil 12).

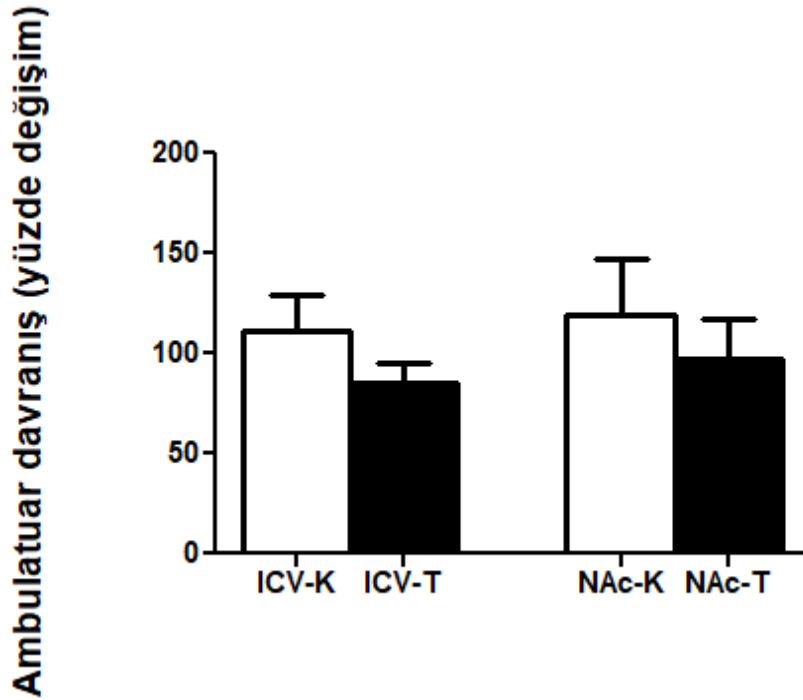


Şekil 12. ICV-T (n=6) ve NAc-T (n=7) gruplarına bilateral mikroenjeksiyon ile uygulanan topiramatin, nalokson (3mg/kg) ile indüklenen morfin yoksunluğundaki vertikal hareketlerin yoksunluk öncesine göre yüzde değişimi üzerine etkisi. Kontrol gruplarına (ICV-K (n=6); NAc-K (n=7)) aynı hacim içerisinde taşıyıcı uygulanmıştır. Veriler ortalama $\pm$ standart hata olarak verilmiştir.

6.1.2.3. ICV ve NAc'a uygulanan topiramatin naloksonla indüklenen morfin yoksunluğunda ambulator davranışların yüzde değişimine etkisi

Değerlendirmede naloksonla indüklenen morfin yoksunluğundaki ambulator davranışların yoksunluk öncesine göre yüzde değişimi kullanıldı.

Nalokson uygulamasını takiben ortaya çıkan ambulator davranışların yüzde değişimi ICV-K grubunda $111,2 \pm 17,78$, ICV-T grubunda ise $85,32 \pm 9,58$ olarak bulunmuştur. Bu sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p=0,23$; $t=1,28$; $df=10$; Şekil 13). Nalokson uygulamasını takiben ortaya çıkan ambulator davranışların yüzde değişimi NAc-K grubunda $119,4 \pm 27,70$, NAc-T grubunda $97,66 \pm 19,05$ olarak bulunmuştur. Bu sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p=0,53$; $t=0,65$; $df=12$; Şekil 13).

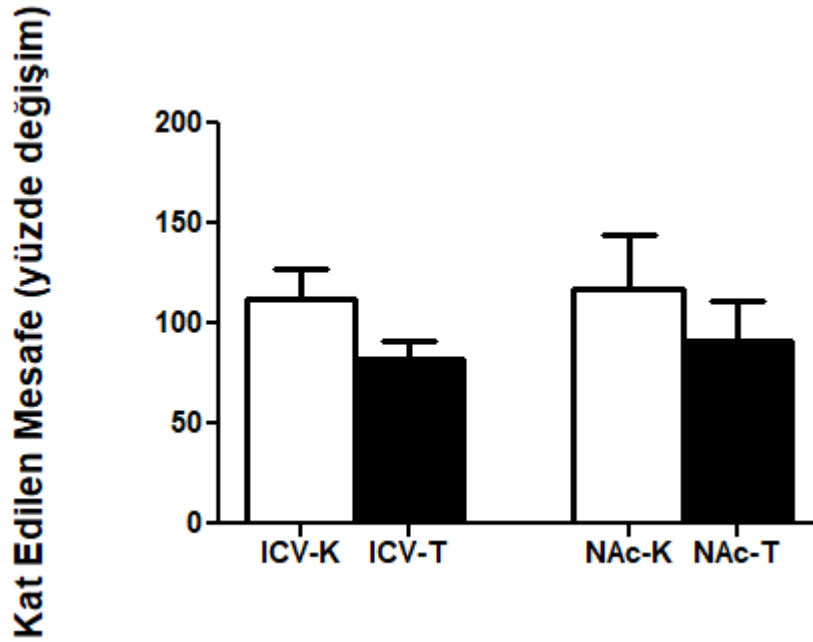


Şekil 13. ICV-T (n=6) ve NAc-T (n=7) gruplarına bilateral mikroenjeksiyon ile uygulanan topiramatin, nalokson (3mg/kg) ile indüklenen morfin yoksunluğundaki ambulator davranışların yoksunluk öncesine göre yüzde değişimi üzerine etkisi. Kontrol gruplarına (ICV-K (n=6); NAc-K (n=7)) aynı hacim içerisinde taşıyıcı uygulanmıştır. Veriler ortalama $\pm$ standart hata olarak verilmiştir.

6.1.2.4. ICV ve NAc'a uygulanan topiramatin naloksonla indüklenen morfin yoksunluğunda kat edilen mesafenin yüzde değişimine etkisi

Değerlendirmede naloksonla indüklenen morfin yoksunluğunda kat edilen mesafenin yoksunluk öncesine göre yüzde değişimi kullanıldı.

Nalokson uygulamasını takiben ortaya çıkan kat edilen mesafenin yüzde değişimi ICV-K grubunda $111,8 \pm 15,37$, ICV-T grubunda ise $82,3 \pm 8,4$ olarak bulunmuştur. Bu sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p=0,12$; $t=1,68$; $df=10$; Şekil 14). Nalokson uygulamasını takiben ortaya çıkan kat edilen mesafenin yüzde değişimi NAc-K grubunda $116,7 \pm 27,16$, NAc-T grubunda $91,45 \pm 19,35$ olarak bulunmuştur. Bu sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p=0,46$; $t=0,76$; $df=12$; Şekil 14).



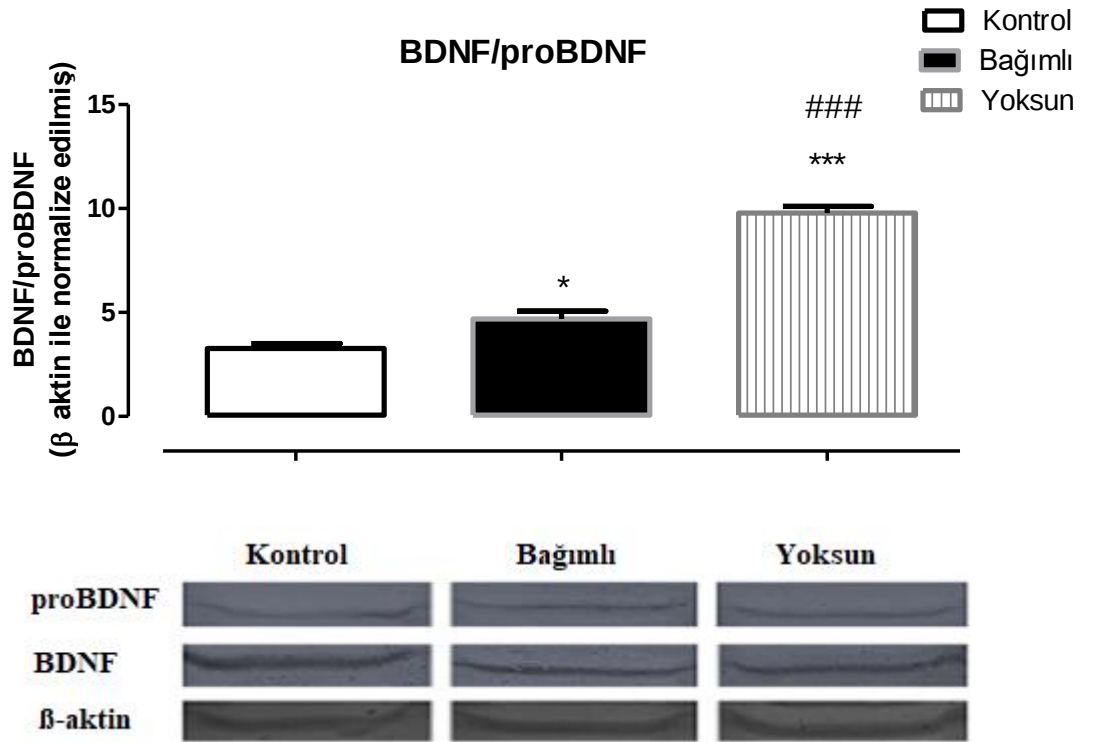
Şekil 14. ICV-T (n=6) ve NAc-T (n=7) gruplarına bilateral mikroenjeksiyon ile uygulanan topiramatin, nalokson (3mg/kg) ile indüklenen morfin yoksunluğundaki kat edilen mesafenin yoksunluk öncesine göre yüzde değişimi üzerine etkisi. Kontrol gruplarına (ICV-K (n=6); NAc-K (n=7)) aynı hacim içerisinde taşıyıcı uygulanmıştır. Veriler ortalama $\pm$ standart hata olarak verilmiştir.

6.2. Morfin Bağımlılığı, Morfin Yoksunluğu ve Morfin Yoksunluğunda ICV veya NAc'a Uygulanan Topiramatin BDNF /proBDNF Oranı Üzerine Etkisi

Deney sonunda dekapite edilen hayvanların servikal dislokasyon işlemi ile beyinleri çıkarılarak -80°C'de donduruldu. Daha sonra -80°C'den çıkarılan beyinlerden frontal korteks bölgeleri eksize edildi (Chiu ve ark., 2007). Eksize edilen frontal korteks örneklerinde BDNF ve proBDNF antikorları kullanılarak Western Emdirimi deneyi yapıldı ve deneyler 4 kere tekrarlandı. Beyin dokularından Western Emdirimi yöntemi ile BDNF ve proBDNF ekspresyonları belirlendi. Herbir bant 30 µg protein içeren homojenatlardaki BDNF, proBDNF ve beta-aktin (β-aktin) antikorlarına ait protein miktarını ifade etmektedir.

6.2.1. Morfin bağımlılığı ve yoksunluğunun BDNF/proBDNF oranı üzerine etkisi

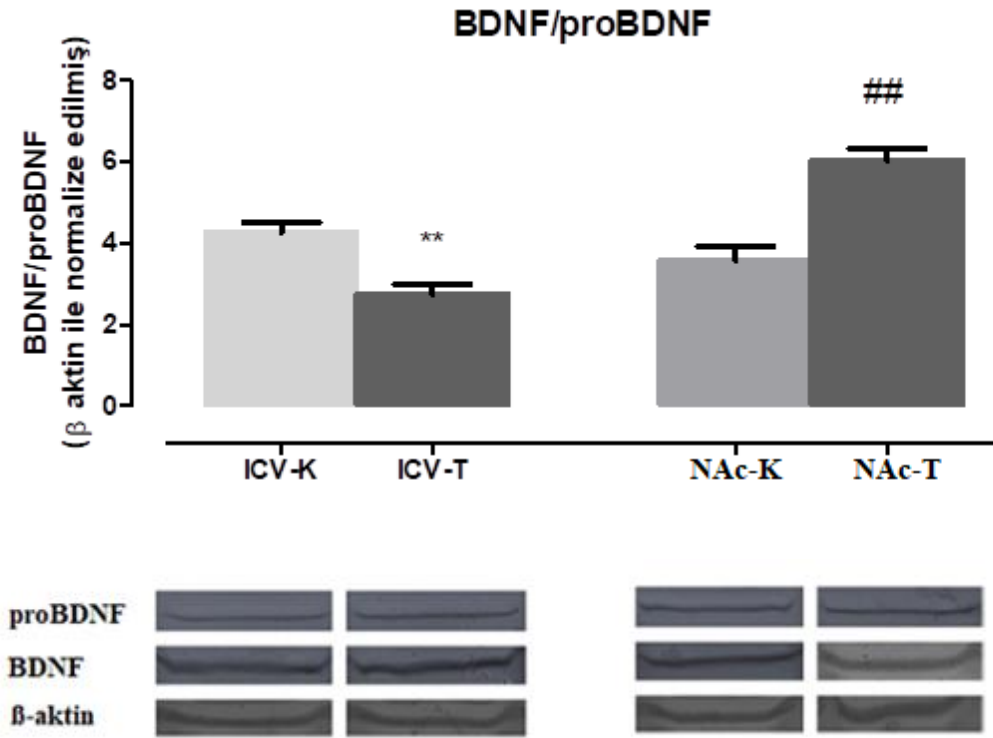
Kontrol grubunda $3,3 \pm 0,2$ olarak bulunan BDNF/proBDNF oranı morfin bağımlısı hayvanlarda $4,7 \pm 0,4$ olarak bulunmuş, naloksonla tetiklenen yoksunluk sendromu oluşturulan hayvanlarda ise $9,8 \pm 0,3$ olarak artmıştır. Bu sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı farklı bulunmuştur ($p < 0,0001$; $F = 118,9$; Şekil 15).



Şekil 15. Morfin bağımlılığı (n=4) ve morfin yoksunluğunun (n=4) sıçanların frontal korteks örneklerindeki BDNF/proBDNF oranı üzerine etkisi. Kontrol grubunda (n=4) morfin bağımlılığı oluşturulmamıştır. Herbir bant 30 μ g protein içeren homojenatlardaki BDNF, proBDNF ve β -aktin antikorlarına ait protein miktarını ifade etmektedir. Veriler ortalama $\pm$ standart hata olarak verilmiştir. * $p < 0,05$ kontrol grubuna göre, *** $p < 0,001$ kontrol grubuna göre, ### $p < 0,001$ bağımlı grubuna göre

6.2.2. Morfin yoksunluğunda ICV ve NAc'a uygulanan topiramatin BDNF/proBDNF oranı üzerine etkisi

ICV-K grubunda $4,26 \pm 0,25$ olarak bulunan BDNF/proBDNF oranı ICV-T grubunda $2,76 \pm 0,21$ olarak azalmıştır. Bu azalma istatistiksel olarak anlamlı farklı bulunmuştur ($p=0,0038$; $t=4,57$, $df=6$; Şekil 16). NAc-K grubunda $3,59 \pm 0,33$ olarak bulunan BDNF/proBDNF oranı ise NAc-T grubunda $6,04 \pm 0,29$ olarak artmıştır. Bu artış istatistiksel olarak anlamlı farklı bulunmuştur ($p=0,0014$; $t=5,58$, $df=6$; Şekil 16).



Şekil 16. ICV-T (n=4) ve NAc-T (n=4) gruplarına bilateral mikroyenjeksiyon ile uygulanan topiramatin, nalokson (3mg/kg) ile indüklenen morfin yoksunluğunda frontal korteks örneklerinde BDNF/proBDNF oranı üzerine etkisi. Kontrol gruplarına (ICV-K (n=6); NAc-K (n=7)) aynı hacim içerisinde taşıyıcı uygulanmıştır. Herbir bant 30 μ g protein içeren homojenatlardaki BDNF, proBDNF ve β -aktin antikörlerine ait protein miktarını ifade etmektedir. Veriler ortalama $\pm$ standart hata olarak verilmiştir. ** $p<0,01$ kontrol grubuna göre, ## $p<0,01$ kontrol grubuna göre

7. TARTIŞMA VE SONUÇ

Çalışmamızda ICV-T ve NAc-T gruplarına lokal uygulanan topiramet (100 µM) kontrol gruplarına göre, naloksonla tetiklenmiş morfin yoksunluğu sendromunda yoksunluk bulgularından sıçrama sayısını anlamlı olarak azaltmıştır (Şekil 6).

Sıçrama davranışı sıçanların kontrol edilemeyen yoksunluk davranışı olup bağımlılığın derecesinin önemli bir göstergesidir ve kendiliğinden ortaya çıkan yoksunluk belirtilerinden ziyade naloksonla tetiklenmiş morfin yoksunluğu sendromunda görülen bulgulardan biridir (Pinelli ve Trivulzio, 1997; El-Kadi ve Sharif, 1998) ve dopaminerjik sistem ile ilişkilendirilmiştir (El-Kadi ve Sharif, 1998; Zarrindast ve ark., 2002). Bağımlılık oluşturan ilaçların hedeflerinde mezolimbik dopaminerjik sistem vardır, bu sistemde VTA'dan NAc, amigdala, prefrontal korteks ve dorsal striatuma dopaminerjik nöronlar gider ve bu dopaminerjik nöronların aktivasyonu ile dopamin salınımı olur (Hopf ve ark., 2010; Koob ve Volkow, 2016; Carmack ve ark., 2017). Farelerde yapılan bir çalışmada, herhangi bir yoksunluk sendromu oluşturulmadan L-3,4-dihydroxyphenylalanine (DOPA, i.p.) ve amfetamin (i.p.) ilaçlarının sıçrama davranışı üzerindeki etkileri incelenmiştir. DOPA ve amfetaminin birlikte uygulanması ile yoksunluk sendromundakine benzer şekilde farelerde yüksek oranda sıçrama davranışı görülürken, bu ilaçlardan sadece birinin uygulanması ile sıçrama oranı %20 azalmış ve dopamin antagonistlerinden haloperidol ise DOPA-amfetamin kombinasyonu ile tetiklenen sıçrama davranışını inhibe etmiştir (Lal ve ark., 1975). Naloksonla tetiklenen morfin yoksunluk sendromu geliştirilen farelerde, nalokson (i.p.) enjeksiyonundan önce uygulanan dopamin agonistlerinden L-dopa ve düşük doz apomorfinin sıçrama davranışını artırdığı gösterilmiştir (El-Kadi ve Sharif, 1998). Bromokriptin ve L-DOPA'nın farelerde naloksonla tetiklenen morfin yoksunluğu sendromunda yoksunluk bulgularına etkisinin incelendiği başka bir çalışmada, hem L-DOPA'nın hem de düşük doz bromokriptinin sıçrama gibi yoksunluk semptomlarını potansiyalize ettiği gösterilmiştir. Ancak bromokriptin daha yüksek dozlarda yoksunluk

semptomlarını zayıflatmıştır. Dopamin D1 reseptör antagonisti SKF-83566 veya dopamin D2 reseptör antagonisti sulpirid ajanlarının ön tedavisi ise L-DOPA'nın yoksunluk semptomları üzerindeki potansiyalize edici etkisini anlamlı bir şekilde zayıflatmıştır (Samını ve ark., 2000). Farelerde naloksonla tetiklenen yoksunluk sendromunda selektif dopamin D4 reseptör antagonisti olan L-745870 ajanının yoksunluk semptomları üzerine etkisi incelenmiştir. Çalışmada L-745870 ajanının yoksunluk semptomlarını belirgin olarak azalttığı gösterilmiştir (Mamiya ve ark., 2004). Ödül sisteminde anahtar rolünde olan NAc, VTA'dan dopaminerjik projeksiyonlar alır (Koob ve Volkow, 2016; Bari ve ark., 2018). Hayvan çalışmalarının ışığında insanlara yapılan bir çalışmada stereotaksik cerrahi yöntemi ve elektrotlar aracılığı ile NAc bölgesinde bilateral radyofrekans lezyonlar oluşturularak yapılan NAc ablasyonu operasyonunun mezokortikolimbik dopamin yolağını engelleyeceğinden, ilaç arama arzusunu ve nüksetmeyi önleyeceği de belirtilmiştir (Li ve ark., 2013)

Yoksunluk sendromunda dopaminerjik sistem ile ilişkilendirilen sıçrama davranışının glutamaterjik reseptörlerle de ilişkisinin olduğu gösterilmiştir (Fundytus ve ark., 1997; Pinelli and Trivulzio, 1997; El-Kadi ve Sharif, 1998; Zarrindast ve ark., 2002; Kamali ve ark., 2016). AMPA reseptör upregülasyonu, yoksunluk ve bağımlılık gelişiminde önemli rol oynamaktadır (Hearing, 2019). Yapılan bir çalışmada, morfin bağımlılığı geliştirilen farelerde AMPA reseptör antagonisti LY293558 ve NMDA reseptör antagonistleri LY235959 ve MK-801 uygulamaları naloksonla tetiklenen sıçrama davranışını azaltmıştır (McLemore ve ark., 1997). Sıçanlarda yapılan bir çalışmada da metabotropik glutamat reseptörleri (mGluR)'nin alttiplerinden olan mGluR_{2,3} selektif antagonisti olan MCCG (2s, 1's, 2's-2-metil-2-(2'-karboksisiklopropil) glisin) ve non-selektif antagonisti olan MCPG (alfa-metil-4-karboksifenilglisin) ajanlarının ICV olarak infüzyonlarının yoksunluk semptomlarından sıçrama davranışını azalttıkları gösterilmiştir (Fundytus ve ark., 1997). Yapılan bir çalışmada non-kompetitif NMDA reseptör antagonisti olan memantin farelerde morfin bağımlılığı geliştirilmeden 3 gün önce i.p. olarak uygulanması, naloksonla tetiklenen yoksunluk sendromunda görülen sıçrama sayısını anlamlı olarak azalttığı gösterilmiştir (Kamali ve ark., 2016).

Morfin bağımlılığı ve yoksunluğunda glutamat nörotransmitterinin rol oynadığını gösteren çalışmalar da mevcuttur. Mikrodiyaliz yöntemi kullanılan bir çalışmada NAc bölgesindeki ekstraselüler sıvıda glutamat ve aspartat düzeylerinin morfin uygulamasını takiben azaldığı, morfin bağımlı sıçanlarda nalokson uygulamasından sonra ise arttığı gösterilmiştir (Sepulveda ve ark., 1998). Bir başka çalışmada, morfin uygulanan sıçanlarda naloksonla tetiklenerek ya da morfin alımının durdurulması sonucu gelişen yoksunluk sendromunda (spontan yoksunluk), NAc bölgesinde glutamat ve aspartat seviyesinin arttığı gösterilmiştir. Aynı çalışmada NAc bölgesinde glutamat ve aspartat seviyesindeki artışın nalokson enjeksiyonundan birkaç dakika sonra başladığı ve son opiat uygulanmasından 48 saat sonra dahi devam ettiği, nalokson olmadan gelişen yoksunlukta ise bu artışın son opiat uygulanmasında 96 saat sonrasında bile görülmeye devam ettiği, yoksunluk sendromunda olan sıçanlara antiglutamaterjik ilaçlardan riluzol veya akamprosate uygulanmasıyla ise artan bu nörotransmitter seviyelerinin azaldığı bildirilmiştir (Sepulveda ve ark., 2004).

NAc ve kortekste dopaminerjik sistemin diğer nörotransmitter sistemleri, diğer mediyatörlerin de dopaminerjik sistemi modüle ettiğini gösteren çalışmalar da mevcuttur. Bir hücre kültürü çalışmasında prefrontal korteks nöronlarında dopamin reseptörlerinden D1 reseptörünün uyarılması GluR1 içeren AMPA reseptörlerinin ekspresyonlarını artırırken, D2 reseptörlerinin uyarılması GluR1 içeren AMPA reseptörlerinin ekspresyonu azaltmış ve böylece prefrontal korteks nöronlarında dopamin reseptör stimülasyonu ile AMPA reseptör ekspresyonunun modüle edildiği gösterilmiştir (Sun ve ark., 2005). Başka bir hücre kültürü çalışmasında ise NAc nöronlarında dopamin reseptörlerinden D1 reseptörünün uyarılması ile GluR1 ekspresyonunda artış izlenmiştir (Chao ve ark., 2002).

Naloksanla indüklenen morfin yoksunluğu belirtilerinden sıçrama davranışında GABA nörotransmitterinin de rolünün bulunduğunu gösteren çalışmalar vardır (Dunbar ve ark., 2006; Bexis ve ark., 2001; Topkara ve ark., 2017). Morfin bağımlılığı geliştirilen sıçanlarda yapılan bir çalışmada nalokson uygulanmadan önce NAc kabuk ve çekirdek kısmına baklofen mikroenjeksiyonu, nalokson ile tetiklenen morfin yoksunluğu sendromunda kontrol grubuna kıyasla

sıçrama davranışını anlamlı olarak azaltmıştır. Makalede NAc bölgesinin hem kabuk hem de çekirdek kısmının ve NAc bölgesindeki GABAerjik iletinin yoksunluk sendromunda rolü olduğu vurgulanmıştır (Topkara ve ark., 2017). Kronik morfin (s.c.) tedavisi alan sıçanlarda, spinal mikrodializ yöntemi ile akut ve tekrarlayan yoksunluk sendromunun GABA salınımına etkisi incelenmiştir. Çalışmada kronik morfin tedavisi GABA salınımını inhibe etmiş ve tekrarlayan yoksunluk sendromu bu etkiyi tersine çevirmiştir. Akut yoksunluk sendromunun ise GABA salınımını stimüle ettiği gösterilmiştir (Dunbar ve ark., 2006). Morfin yoksunluğu sendromu geliştirilen sıçanların beyinlerindeki nörotransmitter sistemlerinin incelendiği bir başka çalışmada, yoksunluk sendromunun serebellumda GABA-transaminaz enzimlerinin aktivasyonuna, yoksunluk sendromunun uzaması ise talamusta GABA-katabolizan enzimlerin inhibisyonuna yol açmıştır. Bu değişiklikler farklı opioid reseptörleri taşıyan beyin bölgelerinin morfin uygulamasına adaptasyonu şeklinde yorumlanmıştır (Vinitskaia ve ark., 2007).

Morfin bağımlılığı geliştirilen farelerde yapılan bir çalışmada da, sistemik olarak uygulanan antikonvülzan ilaçlardan fenitoin, karbamazepin, sodyum valproat, lamotrigin ve topiramatin yoksunluk sendromuna etkileri incelenmiştir. Yoksunluk geliştirmek için uygulanacak olan nalokson enjeksiyonundan 45 dk önce antikonvülzan ilaç fare gruplarına i.p. enjekte edilmiştir. Çalışmada fenitoin, sodyum valproat ve lamotriginin yoksunluk sendromuna herhangi bir etkisi görülmemiştir. Karbamazepinin doza bağımlı bir şekilde, topiramatin yüksek dozda (100 mg/kg) sıçrama davranışını anlamlı şekilde azalttığı gösterilmiştir (Hajhashemi ve Abed-Natanzi, 2011). Ayrıca başka bir çalışma dasıçanlarda naltrekson ile indüklenmiş morfin yoksunluk sendromunda, naltrekson uygulamadan önce topiramat (40mg/kg, i.p.) tedavisinin sıçanlarda kontrol gruplarına göre anlamlı şekilde toplam davranışsal yoksunluk skorunu (sıçrama, ıslak köpek silkinme hareketi vb.) azalttığı gösterilmiştir. Topiramatin daha düşük dozda (20mg/kg, i.p.) uygulandığı sıçanlarda ise kontrol gruplarına göre toplam davranışsal yoksunluk skorunda (sıçrama, ıslak köpek silkinme hareketi vb.) anlamlı bir değişiklik görülmemiştir. Makalede topiramatin naltrekson ile indüklenmiş morfin yoksunluk sendromunda toplam davranışsal yoksunluk skorunu azaltması LC'ta glutamat salınımını azaltıcı etkisi ile ilişkilendirilmiştir (Medrano ve ark., 2015).

Topiramat, antiepileptik aktivitesine aracılık eden etki mekanizması için birden fazla hücresel hedef kullanır. Bunlara voltaj kapılı sodyum akımlarının azaltılması, hiperpolarizan potasyum akımlarının aktive olması, post-sinaptik GABA_A reseptörü aracılı akımların artması, glutamaterjik reseptörlerden AMPA-kainat alttıplerinin inhibisyonu örnek verilebilir (Brunton ve ark., 2009). Bu bilgiler ışığında, çalışmamızda hem ICV hem de NAc'a lokal uygulanan topiramatin kontrol gruplarına göre sıçrama davranışını azaltması, AMPA reseptör inhibisyonundan veya AMPA reseptör üzerinden dopaminerjik iletiyi modüle etmesinden kaynaklanıyor olabilir. Ayrıca GABA agonistlerinin morfin yoksunluğu sendromunda sıçrama davranışını azalttığı çalışmalar da göz önüne alındığında, topiramatin bizim çalışmamızdaki sıçrama davranışı üzerindeki azaltıcı etkisinin GABA reseptörleri üzerindeki aktive edici etkisinden kaynaklanması muhtemeldir.

Çalışmamızda hem ICV-T hem de NAc-T gruplarındaki sıçanlara lokal uygulanan topiramat kontrol grubuna göre, naloksonla tetiklenmiş morfin yoksunluğu sendromunda ortaya çıkan ıslak köpek silkinme hareketinde anlamlı bir değişikliğe neden olmamıştır (Şekil 10).

Yoksunluk sendrom bulgularından olan ıslak köpek silkinmesi hareketine serotonerjik sistemin aracılık ettiği gösterilmiştir (Drust ve ark., 1979). Sıçanlara intraventriküler olarak serotonin mikroenjeksiyonu ıslak köpek silkinme hareketine yol açtığı halde serotonin reseptör blokörü (mianserin, i.p.)'nün sistemik uygulanması aynı yoksunluk bulgusunun ortaya çıkmasına neden olmamıştır. İntraventriküler serotonin mikroenjeksiyonu işleminden 20 dakika önce serotonin reseptör blokörü olan mianserin i.p. uygulanması ıslak köpek silkinme hareketini inhibe etmiştir (Drust ve ark., 1979). Farelerde yapılan bir çalışmada, naloksonla indüklenen yoksunluk sendromu oluşturulmuş, serotonin 5-HT_{2c}R reseptörünün aktivasyonunun yoksunluk semptomlarını iyileştirdiği gösterilmiştir. Ayrıca tekrarlayan morfin uygulamaları ile VTA, NAc and LC bölgelerinde 5-HT_{2c}R reseptörünün ekspresyonu artmıştır (Zhang ve ark., 2016). Serotonin ve noradrenalin reuptake inhibitörü olan duloksetin ilacının, sıçanlarda naloksonla tetiklenen morfin yoksunluğu sendromunda yoksunluk bulgularını

azalttığı gösterilmiştir (Charkhpour ve ark., 2013). GABA reseptör agonistleriyle yapılan bir çalışmada ise GABA agonistlerinin NAc çekirdek ve kabuk bölgesine uygulanması naloksonla indüklenen yoksunluk belirtilerinden ıslak köpek silkinmesi davranışını anlamlı şekilde baskılamıştır (Topkara ve ark., 2017)

Çalışmamızda hem ICV-T hem de NAc-T gruplarına lokal uygulanan topiramatin, naloksonla tetiklenmiş morfin yoksunluğu sendromunda ortaya çıkan ıslak köpek silkinme hareketinde anlamlı bir değişikliğe neden olmaması, topiramatin morfin yoksunluğu sendromunda serotonerjik sistemi etkilemediğinin bir göstergesidir. Ayrıca GABA agonistlerinin baskıladığı yoksun hayvanlarda naloksonla indüklenen ıslak köpek silkinmesi davranışının topiramat uygulamasında görülmemesi, topiramatinin AMPA reseptörleri üzerine etkisinin GABA reseptörleri üzerine olan etkisinden ön planda olmasından kaynaklandığını düşündürmektedir.

Opioid reseptörler gastrointestinal sistemde de bulunmaktadır (Knap, 2017). Morfin gastrointestinal motiliteyi baskılayarak fekal materyalin kolondan geçiş hızını azaltmakta ve kabızlığa yol açabilmektedir (Trescot ve ark., 2008). Bu etkisinden dolayı morfin diyare tedavisinde kullanılmıştır (Brunton ve ark., 2009). Bir opioid antagonisti olan nalokson ise morfin yoksunluğunda, morfinin gastrointestinal sistem üzerindeki etkisini antagonize eder ve diyareye neden olarak (Knap, 2017) ağırlık kaybına yol açar (Sparber ve Meyer, 1978; Suzuki ve ark., 1992). Nitekim ağırlık kaybı nalokson ile indüklenen morfin yoksunluğu sendromunda görülen bulgulardan biridir (Bexis S ve ark., 2001). Her ne kadar diyare ve kilo kaybı morfin yoksunluğunun periferik bulgularından kabul edilse de, NAc'a lokal olarak uygulanan GABA agonistleri tıpkı sıçrama ve ıslak köpek silkinmesi davranışında olduğu gibi morfin yoksunluğunda görülen kilo kaybını da önlemiştir (Topkara ve ark., 2017).

Çalışmamızda hem ICV-T hem de NAc-T gruplarındaki sıçanlara lokal uygulanan topiramat kontrol grubuna göre, naloksonla tetiklenmiş morfin yoksunluğu sendromunda ağırlık kaybı üzerinde anlamlı bir değişikliğe neden olmamıştır. Topiramatin nalokson ile indüklenen morfin yoksunluğu sendromunda ağırlık kaybı ile ilgili periferik etkilere aracılık etmediği söylenebilse de, santral sinir sistemine lokal uygulanan GABA agonistlerinin aksine kilo kaybını düzeltmesi topiramatin morfin

yoksunluğundaki etkisinin GABA agonistleri üzerinden değil, ıslak köpek silkinmesi gibi AMPA reseptörlerinin modülasyonu ile meydana geldiğine işaret etmektedir.

Pitozis nalokson ile indüklenen morfin yoksunluğu sendromunda görülen bulgulardan biridir (Bexis S ve ark., 2001; Chen ve ark., 2003) ve yoksunluk sendromunda görülmesi opioid reseptörlerinden μ_2 reseptörleriyle ilişkilendirilmiştir (Suzuki ve ark., 1992). Daha sonra yapılan çalışmalarda imidazolin reseptörünün endojen ligandı olan agmatinin sistemik uygulamasının da pitozis skorunu düşürdüğü gösterildi (Yananlı ve ark., 2007). Adenozin reseptör alt-tipi olan A_{2A} reseptörü ortadan kaldırılan (*knockout*) ve normal (*wild-type*) hayvanlarda yapılan bir çalışmada ise A_{2A} reseptörünün ortadan kaldırması nalokson uygulaması sonrasında ortaya çıkan pitozis skorunda bir değişikliğe yol açmamış, bunun A_{2A} reseptör alt-tipinin dopamin D2 reseptörleri üzerine olan etkisinden kaynaklandığına vurgu yapılmıştır (Bailey ve ark., 2004).

Çalışmamızda hem ICV-T hem de NAC-T gruplarındaki sıçanlara lokal uygulanan topiramat kontrol grubuna göre, naloksonla tetiklenmiş morfin yoksunluğu sendromunda pitozis üzerinde anlamlı bir değişikliğe neden olmamıştır. Topiramatin nalokson ile indüklenen morfin yoksunluğu sendromundaki etkililiğininin μ reseptörü veya D2 reseptörü aracılığıyla ortaya çıkmadığının bir işareti olarak kabul edebiliriz.

Diş gıcırdatma, nalokson ile indüklenen morfin yoksunluğu sendromunda görülen bulgulardan biridir (Bexis S ve ark., 2001; Chen ve ark., 2003). Sıçanlarda nalokson ile indüklenen morfin yoksunluğu sendromunda görülen diş gıcırdatma hareketi stria terminalisin norepinefrinden zengin nükleusundaki norepinefrin salınımı ile ilişkilendirilmiştir (Fox ve ark., 2016)

Çalışmamızda hem ICV-T hem de NAC-T gruplarındaki sıçanlara lokal uygulanan topiramat kontrol grubuna göre, naloksonla tetiklenmiş morfin yoksunluğu sendromunda diş gıcırdatma davranışında anlamlı bir değişikliğe neden olmamıştır. Topiramatin nalokson ile indüklenen morfin yoksunluğu

sendromunda norepinefrin üzerinden ortaya çıkan etkilere aracılık etmediği söylenebilir.

Çalışmamızda NAc-T grubundaki sıçanlara lokal uygulanan topiramat (100 µM) kontrol grubuna göre, naloksonla tetiklenmiş morfin yoksunluğu sendromunda stereotipik davranışların yüzde değişimini anlamlı olarak azaltmıştır ($p<0,01$). Ancak ICV-T grubundaki sıçanlara lokal uygulanan topiramat kontrol grubuna göre, naloksonla tetiklenmiş morfin yoksunluğu sendromunda stereotipik davranışlar üzerinde bir değişikliğe yol açmamıştır (Şekil 11).

Stereotipik hareketler tekrarlayan, amaçsız hareketler olup ritmik (vücudun sallanması, baş sallama vb.) şekilde görülür (Singer, 2011). Stereotipik hareketler çeşitli nöropsikiyatrik hastalıklarda görülmekle beraber (Hadamitzky ve ark., 2012), özellikle otizm hastalığının majör semptomlarından biridir (Bhat ve ark., 2014). Yoksunluk sendromunda görülen stereotipik hareketlerde artıştan nigro-striatal ve mezolimbik dopaminerjik sinir terminallerinden dopamin salınımı sorumlu tutulmuştur (Balsara ve ark., 1984). Stereotipik hareketlerin hipokampal lezyonlar ile ilişkisinin olabileceği de belirtilmiştir (Lanke ve ark., 1993). Stereotipik hareketler bir çalışmada ise mikroglia-aracılı düzensiz sinaptik *pruning* ile ilişkilendirilmiştir (Bhat ve ark., 2014). Kronik etanol uygulamasından sonra oluşan etanol yoksunluğu sırasında sıçanlarda stereotipik kafa hareketleri görülmüş ve ekstrapiramidal motor sistemindeki değişiklikler ile ilgili olabileceği belirtilmiştir (Abtee ve ark., 1975). Sıçanlarda metamfetaminin kendi kendine uygulamasına (*self-administration*) olanak sağlandığı bir çalışmada, birkaç hafta içinde sıçanlar günlük ilaç alımını yavaş-yavaş arttırmıştır. Bu süreçte sıçanların davranışları daha çok stereotipik hareketler olan epizodik kol hareketleri ve çiğneme, kemirme gibi sürekli oral hareketler şeklinde görülmüştür (Hadamitzky ve ark., 2012). Sıçanlarda yapılan bir çalışmada, intravenöz anestezik bir ajan olan fensiklidin (i.p.) doz bağımlı olarak stereotipik hareketlere neden olmuştur. Düşük dozlarda baş sallamasına yol açarken, yüksek dozlarda dört uzvunu kullanarak geri-geri yürümeye neden olmuştur. Fensiklidin enjeksiyonundan önce uygulanan (i.p.) klorpromazin, haloperidol ve pimozid toplam stereotipik davranış skorunu anlamlı olarak azaltırken, alfa- ve beta-adrenerjik blokörlerin herhangi bir etkisi olmamıştır. Fensiklidinin stereotipik hareketlere santral

dopaminerjik mekanizmalarla neden olabileceği belirtilmiştir (Murray ve Horita, 1979). Sıçanlarda 5 gün boyunca devamlı infüzyonla uygulanan D-amfetamin ve fensiklidin ajanlarının doz bağımlı bir şekilde stereotipik hareketleri indüklediği gösterilmiştir (Sams-Dodd, 1998).

Sıçanlarda yapılan bir çalışmada, nalokson ile tetklenen morfin yoksunluğu sendromunda GABA_B reseptor agonisti olan baklofenin sistemik (s.c.) uygulanması stereotipik baş hareketlerinde anlamlı azalma meydana getirmiş ve GABA_B reseptor antagonisti olan CGP 46381 (3-aminopropilsiklohegzimetilfosfinik asit) baklofenin bu etkilerini tersine çevirmiştir (Bexis S ve ark., 2001). Ancak GABA agonistlerinin lokal olarak NAc'a uygulandığı başka bir çalışmada ise nalokson ile tetiklenen morfin yoksunluğu sendromunda ne GABA_A agonisti muscimol ne de GABA_B agonisti baklofenin mikroenjeksiyonu stereotipik hareketlerde anlamlı bir değişikliğe yol açmamıştır (Topkara ve ark., 2017).

Yukarıdaki çalışmalarda, stereotipik hareketlerde dopaminerjik ve GABAerjik sistemin rolü olduğu gösterilmiştir. Bizim çalışmamızda NAc-T grubundaki sıçanlara lokal uygulanan topiramatin, kontrol grubuna göre, naloksonla tetiklenmiş morfin yoksunluğu sendromunda stereotipik davranışları azaltması, glutamaterjik sistemin ve/veya GABAerjik sistemin dopamini modüle etmesi sonucu etkileyebileceği söylenebilir. Topiramatin etkisinin sistemik GABA agonistleri uygulamasından sonra ortaya çıkması, fakat NAc'a lokal uygulamalar sırasında ortaya çıkmaması ise bize NAc'daki GABAerjik aktiviteden çok, bu bölgedeki dopaminerjik sistemin GABA dışındaki AMPA gibi başka reseptör veya sistemlerin modülasyonu yoluyla ortaya çıktığına işaret etmektedir.

Çalışmamızda hem ICV-T hem de NAc-T gruplarındaki sıçanlara lokal uygulanan topiramat kontrol grubuna göre, naloksonla tetiklenmiş morfin yoksunluğu sendromunda kat edilen mesafenin, ambulator ve vertikal hareketlerin yüzde değişiminde anlamlı bir değişikliğe neden olmamıştır. Ambulator hareketler, vertikal hareketler ve kat edilen mesafe sıçanların sergilediği lokomotor aktivite parametrelerindendir. Vertikal hareketler sıçanların

dikilme şeklinde sergiledikleri hareketler, ambulatuvar hareketler ise sıçanların dikilme dışında sergiledikleri tüm yer değiştirme hareketlerinin toplamıdır (Uzbay, 2009; Mermerci ve ark., 2018).

Topiramatin çalışmamızda yoksunluk bulgularından sıçrama hareketini ve stereotipik hareketleri azalttığı göz önüne alınırsa, topiramatin hayvanların performansını etkileyecek lokomotor hareketlerini değiştirmeden yoksunluk bulgularını azalttığını söyleyebiliriz.

Çalışmamızda frontal kortekste morfin bağımlılığında ve yoksunluğunda BDNF/proBDNF oranının anlamlı olarak arttığı görüldü (Şekil 15). ICV uygulanan topiramat bu oranı anlamlı olarak azaltırken NAc uygulaması ile artışın daha da belirginleştiği görüldü (Şekil 16).

Morfin bağımlılığı geliştirilen sıçanlarda opiat kullanımını durdurarak tetiklenen morfin yoksunluğunda, frontal kortekste BDNF ve reseptörü olan TrkB'nin ekspresyon artışı; hipokampus ve orta beyinde ise sadece BDNF seviyesinde artış görülmüştür (Peregud ve ark., 2016). Morfin yoksunluğunun frontal kortekste BDNF ve proBDNF üzerine etkisinin incelendiği bir çalışmada, 5 gün süresince morfin (s.c.) enjeksiyonu yapılan sıçanların beyinleri son morfin enjeksiyonundan 2 saat sonra (bağımlı grup) ve 60 saat sonra (yoksun grup) çıkarılmıştır. Frontal kortekste hem morfin yoksunluğunun hem de morfin tedavisinin BDNF seviyelerini kontrol gruplarına göre anlamlı olarak artırdığı gösterilmiştir. Aynı şekilde hem morfin yoksunluğu hem de morfin tedavisi frontal kortekste, proBDNF seviyelerini kontrol gruplarına göre anlamlı olarak artırmış ancak, proBDNF seviyelerini morfin yoksunluğunun kronik morfin tedavisine göre daha anlamlı artırdığı gösterilmiştir. Striatumda ise kronik morfin tedavisinin BDNF'ü artırdığı halde proBDNF'ü artırmadığı; morfin yoksunluğunun proBDNF'ü anlamlı olarak artırırken, BDNF'ü değiştirmedeği gösterilmiştir (Bachis ve ark., 2017). Ayrıca hayvanlarda bağımlılık ve yoksunlukta beynin farklı bölgelerinde BDNF ve proBDNF düzeyinin araştırıldığı çalışmalar da bulunmaktadır. Sıçanlarda yapılan bir çalışmada, morfin yoksunluğunda, LC bölgesinde BDNF mRNA düzeyinde artış olduğu gösterilmiştir (Numan ve ark., 1998). 11 gün boyunca günde iki kez i.p. morfin tedavisi alan sıçanlarda son morfin enjeksiyonundan 7 gün sonra hem VTA hem de LC'da BDNF mRNA seviyeleri son

morfin enjeksiyonundan 2 saat ve 24 saat sonrasına kıyasla anlamlı olarak yüksek bulunmuştur (Mashayekhi ve ark., 2012). Sıçanlarla yapılan başka bir çalışmada ise morfin bağımlılığı (10 mg/kg, s.c.) 10 gün boyunca günde iki kez uygulama ile oluşturulmuş ve son morfin enjeksiyonundan sonra TrkB reseptör antagonisti (ANA-12, i.p.) uygulanmıştır. Çalışmada, TrkB reseptör antagonisti uygulanması morfin fiziksel bağımlılık şiddetini artırırken, anksiyete benzeri duyu durumu zayıflatmıştır. Ayrıca, TrkB reseptör antagonisti uygulanması, hem morfin bağımlılığında hem de yoksunluğunda, VTA-NAc BDNF seviyelerini etkilememiştir (Khalil-Khalili ve ark., 2018).

Ayrıca bağımlılık ve yoksunluk çalışmalarında morfinin yanı sıra kullanılan kokainin sıçanlarda geliştirilen yoksunluğunda, BDNF düzeylerinin araştırıldığı bir çalışmada, kokain geri çekildikten sonra VTA, NAc ve amigdala'da, BDNF seviyelerinin kontrol grubuna göre arttığı gösterilmiştir (Grimm ve ark., 2003). Akut ve tekrarlanan kokain uygulamasının, ayrıca kokain yoksunluğunun BDNF düzeyine etkilerinin araştırıldığı sıçanlarla yapılan bir çalışmada, kokain yoksunluğunda hipokampüste BDNF mRNA seviyeleri yüksek bulunmuş, bunun BDNF biyosentesinde artışa bağlı ortaya çıktığı düşünülmüştür. Akut ve tekrarlanan kokain uygulamasının yanı sıra kokain yoksunluğunda NAc kabuk bölgesinde de BDNF mRNA seviyelerinin arttığı gösterilmiştir (Filip ve ark., 2006).

BDNF'nün sinapsların gelişmesi ve matürasyonu gibi, prekürsörü proBDNF'nün ise apoptozda rol oynamasının yanında proBDNF'nün BDNF'ün öncülü olması, morfin bağımlılığında ve yoksunluğunda BDNF'ün değişmeyip proBDNF'nin azalması aslında proBDNF-BDNF döngüsünün hızlandığına işaret etmektedir. Bu göreceli BDNF artışının morfin bağımlılığında ve yoksunluğunda nöroprotektif bir tepki ya da bir adaptasyon mekanizması olarak geliştiği düşünülebilir. Literatürler arasındaki farklılıklar ise morfinin akut veya kronik uygulanmasından ve/veya BDNF ve proBDNF'ün beynin farklı bölgelerindeki farklı cevaplarından kaynaklanıyor olabilir. Ayrıca BDNF ve pro BDNF ölçümünün örneklem zamanı da her iki markerın miktar ve oranlarına etkisi kaçınılmazdır.

Çalışmamızda topiramatin ICV uygulanması ile naloksonla tetiklenmiş morfin yoksunluğu sendromunda frontal kortekste kontrol grubuna göre BDNF/proBDNF oranında anlamlı olarak azalmaya neden olmuş, topiramatin NAc'a lokal uygulaması ise BDNF/proBDNF oranında ileri derecede anlamlı bir artışa neden olmuştur (Şekil 16).

Pedron ve ark.'nın yaptığı bir çalışmada, nalokson enjeksiyonu öncesinde selektif GABA-B reseptör agonisti uygulanması NAc, stria terminalisin '*bed*' nükleusu ve hipokampüsün CA3 bölgesinde BDNF-pozitif hücre sayısında görülen azalmayı düzeltici etki göstermiş, hatta anlamlı olarak artırırken, santral amigdala yoksunlukta görülen azalmaya anlamlı bir etkisi olmamış, bazolateral amigdala bölgesinde BDNF-pozitif hücre sayısında görülen artmayı ise anlamlı olarak baskılamıştır (Pedron ve ark., 2016). Bizim çalışmamızda da NAc'a uygulanan topiramatin BDNF/proBDNF oranını arttırmasının nedeni GABA agonistik etkisinden kaynaklanıyor olabilir. ICV uygulamada ise bu etkinin görülmemesi NAc'daki değişimin topiramat uygulamasına daha hızlı yanıt vermesinden kaynaklanıyor olması muhtemeldir.

Sıçanlarda AMPA reseptör '*potentiator*' (LY404187, s.c.) ve isomerinin (LY451646, s.c.) uygulandığı bir çalışmada hipokampüsün dentat girus bölgesinde BDNF-pozitif hücrelerde anlamlı artış gösterilmiştir (Mackowiak ve ark., 2002). Kokain yoksunluğu oluşturulan sıçanlarda AMPA reseptör pozitif modülatörü ampakin (i.p.) ilacının uygulanması NAc bölgesinde BDNF seviyelerini artırmıştır (Li ve ark., 2013). Yapılan bir hücre kültürü çalışmasında hipokampal AMPA reseptörü pozitif modülasyonunun BDNF ve TrkB aracılığıyla dentritik translayonu stimüle ettiği gösterilmiştir. (Jourdi ve ark., 2009). Dopamin ve glutamatin yanı sıra, BDNF de NAc'ta dentritik spin dansitesinde değişiklikler yapabilir. Kokain ve morfinin dentritik spin morfolojisine aktin döngüsünü modifiye ederek ve AMPA reseptör ekspresyonunu değiştirerek etki gösterdiği bilinmektedir (Quintero 2013). Kokain bağımlılığında BDNF'nin serum düzeyinin, gelişebilecek relapsı tahmin etmede bir biyomarker olabileceği belirtilmiştir. Ayrıca BDNF sinaptik plastisitede de rol oynamaktadır. Sinaptik plastisitede AMPA reseptörlerinin rolü bilinmektedir. BDNF'nin post sinaptik önemli etkilerinden biri AMPA reseptör regülasyonudur.

BDNF kalsiyum bağı AMPA reseptörlerinin ekspresyonlarını değiştirebilir (Lia ve Wolf, 2015).

BDNF'nin, prefrontal kortekste glutamaterjik nöronlarda ve mezolimbik sistemdeki dopaminerjik yollarda yaygın olarak eksprese olduğu, ayrıca AMPA reseptör modülatörlerinin beyin farklı bölgelerinde BDNF düzeyini artırdığından dolayı, çalışmamızda NAc bölgesine uygulanan topiramatin BDNF/proBDNF oranını artırıcı etkisi, AMPA reseptörler üzerindeki modülatör etkilerinden de kaynaklanıyor olabilir.

Sonuç olarak, beyine (NAc ve ICV) uygulanan topiramat, morfin yoksunluk belirtilerinden en önemlilerinden biri olan sıçrama davranışını azaltmış, lokomotor aktivite performansını değiştirmeden yoksunluk ve dopamin ile yakından ilişkili olduğu bilinen stereotipik davranışları azaltmıştır. NAc'a uygulanan topiramat bu etkisinde, nöroprotektif etkili BDNF ve apoptotik etkili proBDNF oranını anlamlı olarak artırmıştır. Topiramat bu etkilerini GABA akımları üzerinden gerçekleştirebileceği gibi, glutamat reseptörleri altıpları üzerinden de gerçekleştiriyor olabilir. Sonraki çalışmalarda topiramatin bağımlılıkta, GABA ve glutamat reseptörlerinin alt tiplerine etkisinin reseptör düzeyinde incelenmesi ve BDNF/proBDNF döngüsünün bu değişime katkısı morfin ve diğer bağımlılık mekanizmalarının anlaşılmasına ışık tutacaktır.

8. REFERANSLAR

Abtee L, Svartström-Fraser M. 2009). Effect of Ethanol Dependence and Withdrawal on the Catecholamines in Rat Brain and Heart. *Acta Pharmacologica et Toxicologica*.1975;36(4):289–298. DOI:10.1111/j.1600-0773.1975.tb00796.x

Allen SJ, Dawbarn D. Clinical relevance of the neurotrophins and their receptors. *Clinical Science*. 2006 Feb;110(2):175-91.

Aragon-Poce F, Martínez-Fernandez E, Marquez-Espinos C, Perez A, Mora R, Torres LM. History of opium. *International Congress Series*.2002;1242:19– 21

Bachis A, Campbell LA, Jenkins K, Wenzel E, Mocchetti I. Morphine withdrawal increases brain derived neurotrophic factor precursor. *Neurotox Res*. 2017; 32(3): 509–517. DOI: 10.1007/s12640-017-9788-8

Bailey A, Davis L, Lesscher HMB, Kelly MDW, Ledent C, Hourani SMO, Kitchen I. Enhanced morphine withdrawal and μ -opioid receptor G-protein coupling in A2A adenosine receptor knockout mice. *Journal of Neurochemistry*. 2004;88(4):827–834. DOI:10.1046/j.1471-4159.2003.02214.x

Balsara JJ, Nandal NV, Burte NP, Jadhav JH, Chandorkar AG. Effects of naloxone on methamphetamine and apomorphine stereotypy and on haloperidol catalepsy in rats. *Psychopharmacology*.1984;82: 237–240

Bari A, DiCesare J, Babayan D, Runcie M, Sparks H, Wilson B. Neuromodulation for substance addiction in human subjects: A review. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*. 2018;95:33–43. DOI:10.1016/j.neubiorev.2018.09.013

Becket AH, Casy AF. Synthetic analgesics: stereochemical considerations. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 1954;986-1001. PMID:13212680. DOI:10.1111/j.2042-7158.1954.tb11033.x

Bexis S, Onga J, White J. Attenuation of morphine withdrawal signs by the GABAB receptor agonist baclofen. *Life Sciences*. 2001;70; 395–401

Bhat S, Acharya UR, Adeli H, Bairy GM, Adeli A. Autism: cause factors, early diagnosis and therapies. *Reviews in the Neurosciences*. 2014;25(6). DOI:10.1515/revneuro-2014-0056

Billard JM, Potier B. Glutamatergic and GABAergic Systems. *Encyclopedia of Neuroscience*. 2009;913–919. DOI:10.1016/b978-008045046-9.00142-x

Binder DK. Brain-Derived Neurotrophic Factor. *Encyclopedia of Hormones*. 2003;209–214. DOI:10.1016/b0-12-341103-3/00037-1

Borsodi A, Bruchas M, Calo G, Chavkin C, Christie MJ, Civelli O, Connor M, Cox BM, Devi LA, Evans C, Henderson G, Höllt V, Husbands S, Kelly E, Kieffer B, Kitchen I, Kreek MJ, Liu-Chen LY, Massot D, Meunier JC, Portoghese PS, Schulz S, Shippenberg TS, Simon EJ, Toll L, Traynor JR, Ueda H, Wong YH, Zaveri N, Zimmer A. Opioid receptors (version 2019.4). *IUPHAR/BPS Guide to Pharmacology*

Database. IUPHAR/BPS Guide to Pharmacology CITE. 2019;2019(4). DOI: 10.2218/gtopdb/F50/2019.4.

<https://www.guidetopharmacology.org/GRAC/FamilyIntroductionForward?familyId=50>

Browne CJ, Godino A, Salery M, Nestler EJ. Epigenetic Mechanisms of Opioid Addiction. Review. Society of Biological Psychiatry. 2019. ISSN: 0006-3223. DOI: 10.1016/j.biopsych.2019.06.027

Brunton LL, Lazo JS, Parker KL. Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of therapeutics. Çeviren: Süzer Ö. Goodman & Gilman. Tedavinin Farmakolojik Temeli. Nobel Tıp Kitabevleri Ltd. Şti. İstanbul. 2009.

Carmack SA, Koob GF, Anagnostaras SG. Learning and Memory in Addiction. Learning and Memory: A Comprehensive Reference. 2017;523–538. DOI:10.1016/b978-0-12-809324-5.21101-2

Chao MV. Neurotrophins And Their Receptors:A Convergence Point For Many Signalling Pathways. Nature Reviews. Neuroscience: 2003; 4. DOI:10.1038/nrn1078

Chao SZ, Ariano MA, Peterson DA, Wolf ME. D1 dopamine receptor stimulation increases GluR1 surface expression in nucleus accumbens neurons. J Neurochem. 2002;83(3):704-12.

Charkhpour M, Jafari R, Ghavimi H, Ghanbarzadeh S, Parvizpur A. Duloxetine Attenuated Morphine Withdrawal Syndrome in the Rat. Drug Research. 2013;64(08);393–398. DOI:10.1055/s-0033-1358728

Chen JC, Tao PL, Li JY, Wong CH, Huang EYK. Endomorphin-1 and -2 induce naloxone-precipitated withdrawal syndromes in rats. *Peptides*.2003; 24(3);477–481. DOI:10.1016/s0196-9781(03)00078-0

Chiu K, Lau WM, Lau HT, So KF, Chang RCC. Micro-dissection of Rat Brain for RNA or Protein Extraction from Specific Brain Region. *The Journal of Visualized Experiments*. 2007; (7): 269.

Cohen J, Dervaux A, Laqueille X. Le topiramate a-t-il un intérêt en addictologie ? *Presse Medicale*. 2014;43(9):892-901. doi: 10.1016/j.lpm.2014.02.030. Epub 2014 Jul 11.

Cox BM, Goldstein A, Hi CH. (1976). Opioid activity of a peptide, beta-lipotropin-(61-91), derived from beta-lipotropin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1976; 73(6): 1821-3. PMID:1064855. DOI: 10.1073/pnas.73.6.1821

Cunha C, Brambilla R, Thomas KL. A simple role for BDNF in learning and memory?. *Frontiers in Molecular Neuroscience*. 2010;3(1). DOI:10.3389/neuro.02.001.2010

Dandan RH, Brunton LL. *Goodman and Gilman's Manual of Pharmacology and Therapeutics*. Çeviren: Erdem R. Goodman ve Gilman 'ın Farmakoloji ve Tedavi El Kitabı. Güneş Tıp Kitabevleri. 2. Baskı. Ankara, 2017

Davies JA. Topiramate. *xPharm: The Comprehensive Pharmacology Reference*. 2007;1–4. DOI:10.1016/b978-008055232-3.62784-9

Del Arco I, Navarro M, Bilbao A, Ferrer B, Piomelli D, Rodriguez De Fonseca F. Attenuation of spontaneous opiate withdrawal in mice by the anandamide transport inhibitor AM404. *European Journal of Pharmacology*. 2002;454(1):103–104. DOI:10.1016/s0014-2999(02)02483-4

Demirkapu MJ, Yananlı HR. *Opium Alkaloids*. IntechOpen. 2020. DOI:10.5772/intechopen.91326. <https://www.intechopen.com/online-first/opium-alkaloids>

Dewey W. Morphine. *xPharm: The Comprehensive Pharmacology Reference*. 2007;1–6. DOI:10.1016/b978-008055232-3.62208-1

Dilbaz N. Opiat Bağımlılığı. *Madde Bağımlılığı Tanı ve Tedavi Kılavuzu El Kitabı*. T.C. Sağlık Bakanlığı Sağlık Hizmetleri Genel Müdürlüğü. Bakanlık Yayın No: 879. Pozitif Matbaa, Ankara. 2012

Drust EG, Sloviter RS, Connor JD. Effect of morphine on 'wet-dog' shakes caused by cerebroventricular injection of serotonin. *Pharmacology*. 1979;18(6):299-305. DOI:10.1159/000137269

Dunbar AS, Karamian I, Yeatman A, Zhang J. Effects of recurrent withdrawal on spinal GABA release during chronic morphine infusion in the rat. *European Journal of Pharmacology*. 2006. 535(1–3):152-156 DOI:10.1016/j.ejphar.2006.02.007

El-Kadi AOS, Sharif SI. The Role of Dopamine in the Expression of Morphine Withdrawal. *General Pharmacology: The Vascular System*. 1998;30(4):499–505. DOI:10.1016/s0306-3623(97)00286-3

Ellingsrud C, Agewall S. Morphine in the treatment of acute pulmonary oedema-Why?. International Journal of Cardiology. 2016;202:870–873. DOI:10.1016/j.ijcard.2015.10.014

Fields A, Wiegand TJ. Opium and the Constituent Opiates. Encyclopedia of Toxicology. 2014; 698–701. doi:10.1016/b978-0-12-386454-3.00716-8

Filip M, Faron-Gorecka A, Kusmider M, Golda A, Frankowska M, Dziedzicka-Wasylewska M. Alterations in BDNF and trkB mRNAs following acute or sensitizing cocaine treatments and withdrawal. Brain Research. 2006;1071(1):218–225.

Fox ME, Rodeberg NT, Wightman RM. Reciprocal Catecholamine Changes during Opiate Exposure and Withdrawal. Neuropsychopharmacology. 2016;42(3);671–681. DOI:10.1038/npp.2016.135

Fundytus ME, Ritchie J, Coderre TJ. Attenuation of morphine withdrawal symptoms by subtype-selective metabotropic glutamate receptor antagonists. British Journal of Pharmacology. 1997;120: 1015-1020. DOI: 10.1038/sj.bjp.0701000

Goldstein A, Tachibana S, Lowney LI, Hunkapiller M, Hood L. Dynorphin-(1-13), an extraordinarily potent opioid peptide. Proceedings of the National Academy of Sciences. 1979; 76 (12): 6666-70. PMID:230519. DOI: 10.1073/pnas.76.12.6666

Grevel J, Yu V, Sadee W. Characterization of a labile naloxone binding site (λ site) in rat brain. Journal of Neurochemistry. 1985;44(5):1647-56. PMID:2985759. DOI: 10.1111/j.1471-4159.1985.tb08808.x

Grimm JW, Lu L, Hayashi T, Hope BT, Su TP, Shaham Y. Time-dependent increases in brain-derived neurotrophic factor protein levels within the mesolimbic dopamine system after withdrawal from cocaine: implications for incubation of cocaine craving. *Journal of Neuroscience*.2003; 23(3): 742–747

Güleç G, Köşger F, Eşsizoğlu A. DSM-5'te Alkol ve Madde Kullanım Bozuklukları. *Psikiyatride Güncel Yaklaşımlar*. 2015;7(4):448-460
DOI:10.5455/cap.20150325081809

Hadamitzky M, McCunney S, Markou A, Kuczenski R. Development of stereotyped behaviors during prolonged escalation of methamphetamine self-administration in rats. *Psychopharmacology*.2012;223(3): 259–269. DOI:10.1007/s00213-012-2713-1

Hajhashemi V, Abed-Natanzi M. Effect of five common anticonvulsant drugs on naloxone-precipitated morphine withdrawal in mice. *Research in Pharmaceutical Sciences*.2011;6(1):57-62

Heberlein A, Dursteler-MacFarland KM, Lenz B, Frieling H, Grosch M, Bonsch D, Kornhuber J, Wiesbeck GA, Bleich S, Hillemacher T. Serum levels of BDNF are associated with craving in opiate-dependent patients. *Journal of Psychopharmacology*. 2011; 25:1480–1484

Hempstead BL. Dissecting the Diverse Actions of Pro- and Mature Neurotrophins. *Current Alzheimer Research*, 2006, 3, 19-24. doi:10.2174/156720506775697061

Hempstead BL. Neurotrophins. Encyclopedia of the Neurological Sciences. 2014;583–584. DOI:10.1016/b978-0-12-385157-4.00069-5

Hopf FW, Stuber GD, Chen BT, Bonci A. Cellular Plasticity in Cocaine and Alcohol Addiction. Encyclopedia of Behavioral Neuroscience. 2010:236–241. DOI:10.1016/b978-0-08-045396-5.00071-3

Hughes J, Smith TW, Kosterlitz HW, Fothergill LA, Morgan BA, Morris HR. Identification of two related pentapeptides from the brain with potent opiate agonist activity. Nature. 1975;258(5536):577-80. PMID:1207728. DOI: 10.1038/258577a0

Hyttia P, Kiianmaa K. Suppression of Ethanol Responding by Centrally Administered CTOP and Naltrindole in AA and Wistar Rats. Alcoholism: Clinical and Experimental Research. 2001;25(1):25–33. DOI:10.1111/j.1530-0277.2001.tb02123.x

Jafarova Demirkapu M, Yananli HR, Kaleli M, Sakalli HE, Gören MZ, Topkara B. The role of adenosine A1 receptors in the nucleus accumbens during morphine withdrawal. Clin Exp Pharmacol Physiol. 2020 Apr;47(4):553-560. DOI: 10.1111/1440-1681.13224

Johnson BA, Daoud NA, Bowden CL, DiClemente CC, Roache JD, Lawson K, Javors MA, Ma JZ. Oral topiramate for treatment of alcohol dependence: a randomised controlled trial. Lancet. 2003; 361:1677–85

Johnson BA, Rosenthal N, Capece JA, Wiegand F, Mao L, Beyers K, et al. Topiramate for treating alcohol dependence: A randomized controlled trial. JAMA: The Journal of the American Medical Association. 2007;298(14):1641-1651. DOI:10.1001/jama.298.14.1641

Jourdi H, Hsu YT, Zhou M, Qin Q, Bi X, Baudry M. Positive AMPA receptor modulation rapidly stimulates BDNF release and increases dendritic mRNA translation. Journal of Neuroscience. 2009;29(27):8688-97. DOI:10.1523/JNEUROSCI.6078-08.2009.

Kamali M, Sahraei H, Khosravi M, Hassanpour S, Yaribeygi H. Asymmetric Involvement of Central and the Peripheral NMDA Glutamate Receptors in the Expression of Withdrawal Syndrome in Morphine-Dependent Mice. Physiol Pharmacol.2016;19:274-284

Kampman KM, Pettinati HM, Lynch KG, Spratt K, Wierzbicki MR, O'Brien CP. A double-blind, placebo-controlled trial of topiramate for the treatment of comorbid cocaine and alcohol dependence. Drug and Alcohol Dependence. 2013;133:94–99. DOI:10.1016/j.drugalcdep.2013.05.026

Katzung BG, Masters SB, Trevor AJ. Basic & Clinical Pharmacology. Çeviren: Akkan AG, Büyükuysal RL, et al. Temel ve Klinik Farmakoloji. 12. Baskı. Nobel Tıp Kitabevleri. 2014

Katzung BG. Basic & Clinical Pharmacology. 14th Edition. United States of America: McGraw-Hill Education; 2018

Kayaalp O. Akılcı Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji. 13. Baskı. Pelikan Yayıncılık, Ankara: 2012

Kaye AD, Cornett EM, Patil SS, Gennuso SA, et al. New opioid receptor modulators and agonists. *Best Practice & Research Clinical Anaesthesiology*. 2018;32:125-136. DOI:10.1016/j.bpa.2018.06.009

Khalil-Khalili M, Rashidy-Pour A, Bandegi AR, Yousefi B, Jorjani H, Miladi-Gorji H. Effects of BDNF receptor antagonist on the severity of physical and psychological dependence, morphine-induced locomotor sensitization and the ventral tegmental area-nucleus accumbens BDNF levels in morphine- dependent and withdrawn rats. *Neuroscience Letters*. 2018;668:7–12. DOI:10.1016/j.neulet.2017.12.061

Khazaal Y, Chatton A, Rusca M, Preisig M, Zullino D. Long-term topiramate treatment of psychotropic drug-induced weight gain: a retrospective chart review. *General Hospital Psychiatry*. 2007;29: 446–449

Kieffer BL. Opioid Peptides and Receptors. *Encyclopedia of Neuroscience*. 2009;235–240. DOI:10.1016/b978-008045046-9.01472-8

Knapp, CM. Opiates. *Encyclopedia of the Human Brain. Reference Module in Neuroscience and Biobehavioral Psychology*. 2017; 729-739 doi:10.1016/b978-0-12-809324-5.03135-7

Koob GF, Volkow ND. Neurobiology of addiction: a neurocircuitry analysis. *The Lancet Psychiatry*. 2016;3(8):760–773. DOI:10.1016/s2215-0366(16)00104-8

Lal H, Colpaert FC, Laduron P. Narcotic withdrawal like mouse jumping produced by amphetamine and L-DOPA. *European Journal of Pharmacology*. 1975;30(1):113–116. DOI:10.1016/0014-2999(75)90211-3

Langtry HD, Gillis JC, Davis R. Topiramate. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties and clinical efficacy in the management of epilepsy. *Drugs*. 1997;54(5): 752-773

Lanke J, Mansson L, Bjerkemo M, Kjellstrand P. Spatial memory and stereotypic behaviour of animals in radial arm mazes. *Brain Research*. 1993;605(2):221–228. DOI:10.1016/0006-8993(93)91744-d

Li N, Wang J, Wang X, Chang C, Ge S, et al. Nucleus Accumbens Surgery for Addiction. *World Neurosurgery*. 2013;80(3-4):S28.e9-e19. DOI:10.1016/j.wneu.2012.10.007

Lia X, Wolf ME. Multiple faces of BDNF in cocaine addiction. *Behavioural Brain Research*. 2015;279: 240-254. DOI:10.1016/j.bbr.2014.11.018

Lord JA, Waterfield AA, Hughes J, Kosterlitz HW. (1977). Endogenous opioid peptides: multiple agonists and receptors. *Nature*. 1977; 267 (5611): 495-9. PMID:195217. DOI: 10.1038/267495a0

Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin Phenol Reagent. J Biol Chem: 1951;193:265-275

Loyd DR, Wang X, Murphy AZ. Sex Differences in μ -Opioid Receptor Expression in the Rat Midbrain Periaqueductal Gray Are Essential for Eliciting Sex Differences in Morphine Analgesia. The Journal of Neuroscience. 2008; 28(52):14007–14017. DOI:10.1523/JNEUROSCI.4123-08.2008

Lu L, Liu M, Sun R, Zheng Y, Zhang P. Myocardial Infarction: Symptoms and Treatments. Cell. Biochem Biophys. 2015;72(3):865-7. DOI: 10.1007/s12013-015-0553-4.

Lu L, Su WJ, Yue W, Ge X, Su F, Pei G, Ma L. Attenuation of Morphine Dependence and Withdrawal in Rats by Venlafaxine, a Serotonin and Noradrenaline Reuptake Inhibitor. Life Sciences. 2001;69(1):37-46.

Mackowiak M, O'Neill MJ, Hicks CA, Bleakman D, Skolnick P. An AMPA receptor potentiator modulates hippocampal expression of BDNF: an in vivo study. Neuropharmacology. 2002;43(1): 1–10. DOI:10.1016/s0028-3908(02)00066-7

Mamiya T, Matsumura T, Ukaı M. Effects of L-745,870, a Dopamine D4 Receptor Antagonist, on Naloxone-Induced Morphine Dependence in Mice. Annals of the New York Academy of Sciences. 2004;1025(1):424–429. DOI:10.1196/annals.1316.052

Mao XY, Cao YG, Ji Z, Zhou HH, Liu ZQ, Sun HL. Topiramate protects against glutamate excitotoxicity via activating BDNF/TrkB-dependent ERK pathway in rodent hippocampal neurons.. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*. 2015;60:11–17. DOI: 10.1016/j.pnpbp.2015.01.015

Martin WR, Eades CG, Thompson JA, Huppler RE, Gilbert PE. The effects of morphine- and nalorphine- like drugs in the nondependent and morphine-dependent chronic spinal dog. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 1976;197 (3): 517-32. PMID:945347

Mashayekhi FJ, Rasti M, Rahvar M, Mokarram P, Namavar MR, Owji AA. Expression levels of the BDNF gene and histone modifications around its promoters in the ventral tegmental area and locus ceruleus of rats during forced abstinence from morphine. *Neurochemical Research*. 2012;37:1517–1523. DOI: 10.1007/s11064-012-0746-9

McDonald J, Lambert D. Opioid receptors. *Continuing Education in Anaesthesia Critical Care & Pain*. 2005;5(1):22–25. DOI:10.1093/bjaceaccp/mki004

McGinty JF, Whitfield TW, Berglind WJ. Brain-derived neurotrophic factor and cocaine addiction. *Brain Research*. 2010;Volume1314:183-193. DOI:10.1016/j.brainres.2009.08.078

McLemore GL, Kest B, Inturrisi CE. The effects of LY293558, an AMPA receptor antagonist, on acute and chronic morphine dependence. *Brain Res*. 1997 Dec 5;778(1):120-126. DOI:10.1016/s0006-8993(97)00985-2

Medrano MC, Mendiguren A, Pineda J. Effect of ceftriaxone and topiramate treatments on naltrexone-precipitated morphine withdrawal and glutamate receptor desensitization in the rat locus coeruleus. *Psychopharmacology*. 2015; 232(15):2795–2809. DOI: 10.1007/s00213-015-3913-2

Mermerci A, Özmerdivenli R, Orallar H, Beyazçiçek E, Sungur MA. Galanin ve Egzersizin Ratlarda Anksiyete Üzerine Etkisinin Açık Alan ve Yükseltilmiş Artı Labirent Testleri ile Değerlendirilmesi. *Düzce Tıp Fakültesi Dergisi / Duzce Medical Journal*. 2018;20(3):63-68

Meunier JC, Mollereau C, Toll L, Suaudeau C, Moisand C, Alvinerie P, Butour JL, Guillemot JC, Ferrara P, Monsarrat B, Mazarguil H, Vassart G, Parmentier M, Costentin J. Isolation and structure of the endogenous agonist of opioid receptor-like ORL-1 receptor. *Nature*. 1995;377: 532-535. PMID:7566152. DOI: 10.1038/377532a0

Morgan MM, Christie MJ. Analysis of opioid efficacy, tolerance, addiction and dependence from cell culture to human. *British Journal of Pharmacology*. 2011; 164(4):1322–1334. DOI:10.1111/j.1476-5381.2011.01335.x

Motaghinejad M, Motevalian M, Shabab B (2016a) Neuroprotective effects of various doses of topiramate against methylphenidate induced oxidative stress and inflammation in rat isolated hippocampus. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*. 2016; 43(3):360–371. DOI: 10.1111/1440-1681.12538

Murray TF, Horita A. Phencyclidine-induced stereotyped behavior in rats: Dose response effects and antagonism by neuroleptics. *Life Sciences*. 1979;24(24):2217–2225. DOI:10.1016/0024-3205(79)90097-3

Nuijten M, Blanken P, van den Brink W, Hendriks V. Treatment of crack-cocaine dependence with topiramate: A randomized controlled feasibility trial in The Netherlands. *Drug and Alcohol Dependence*. 2014;138:177–184. DOI:10.1016/j.drugalcdep.2014.02.024

Numan S, Lane-Ladd SB, Zhang L, Lundgren KH, et al. Differential regulation of neurotrophin and trk receptor mRNAs in catecholaminergic nuclei during chronic opiate treatment and withdrawal. *Journal of Neuroscience*. 1998;18:10700–10708.

O'Brien CP, Crowley TJ, et al. Substance-Related and Addictive Disorders. *Diagnostic And Statistical Manual Of Mental Disorders - DSM 5*. Fifth Edition. American Psychiatric Association. United States of America. 2013. ISBN 978-0-89042-554-1

Pathan H, Williams J. Basic opioid pharmacology: an update. *British Journal of Pain*. 2012;6(1):11–16. DOI:10.1177/2049463712438493

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

Pedron VT, Varani AP, Balerio GN. Baclofen prevents the elevated plus maze behavior and BDNF expression during naloxone precipitated morphine withdrawal in male and female mice. *Synapse*. 2016;70:187–197. DOI:10.1002/syn.21886

Peregud DI, Yakovlev AA, Stepanichev MY, OnufrievMV, et al. Expression of BDNF and TrkB Phosphorylation in the Rat Frontal Cortex During Morphine Withdrawal are NO Dependent. *Cellular and Molecular Neurobiology*. 2016;36:839–849. DOI:10.1007/s10571-015-0267-6

Pinelli A, Trivulzio S. Quantitative Evaluation of Opioid Withdrawal Signs in Rats Repeatedly Treated With Morphine and Injected With Naloxone, in the Absence or Presence of the Antiabstinence Agent Clonidine. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*. 1997;38:117-131.

Porter RJ, Dhir A, Macdonald RL, Rogawski MA. Mechanisms of action of antiseizure drugs. *Handbook of Clinical Neurology*. 2012;108: 663–681. doi:10.1016/B978-0-444-52899-5.00021-6.

Quintero GC. Role of nucleus accumbens glutamatergic plasticity in drug addiction. *Neuropsychiatric Disease and Treatment*. 2013;9:1499–1512. DOI: 10.2147/NDT.S45963

Raffa RB, Ossipov MH, Porreca F. Opioid Analgesics and Antagonists. *Pharmacology and Therapeutics for Dentistry*. 2017;241–256. DOI:10.1016/b978-0-323-39307-2.00016-3

Reichardt LF. Neurotrophin-regulated signalling pathways. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2006 Sep 29;361(1473):1545-64.

Reinscheid RK, Nothacker HP, Bourson A, Ardati A, Henningsen RA, Bunzow JR, Grandy DK, Langen H, Monsma Jr FJ, Civelli O. Orphanin FQ: a neuropeptide that activates an opioidlike G protein-coupled receptor. *Science*. 1995;270(5237): 792-4. PMID:7481766. DOI: 10.1126/science.270.5237.792

Samini M, Fakhrian R, Mohagheghi M, Dehpour AR. Comparison of the effect of levodopa and bromocriptine on naloxone-precipitated morphine withdrawal symptoms in mice. *Human Psychopharmacology: Clinical and Experimental*. 2000;15(2);95–101. DOI:10.1002/(sici)1099-1077(200003)15:2<95::aid-hup148>3.0.co;2-a

Sams-Dodd F. Effects of Continuous D-Amphetamine and Phencyclidine Administration on Social Behaviour, Stereotyped Behaviour, and Locomotor Activity in Rats. *Neuropsychopharmacology*. 1998;19(1);18–25. DOI:10.1016/s0893-133x(97)00200-5

Sepulveda H, Oliva P, Contreras E. Neurochemical changes of the extracellular concentrations of glutamate and aspartate in the nucleus accumbens of rats after chronic administration of morphine. *European Journal of Pharmacology*. 2004;483:249–258. DOI:10.1016/j.ejphar.2003.10.037

Sepulveda MJ, Hernandez L, Rada P, Tucci S, Contreras E. Effect of precipitated withdrawal on extracellular glutamate and aspartate in the nucleus accumbens of chronically morphine-treated rats: an in vivo microdialysis study. *Pharmacol Biochem Behav*. 1998;60(1):255-62.

Shank RP, Gardocki JF, Streeter AJ, Maryanoff BE. An overview of the preclinical aspects of topiramate: Pharmacology, pharmacokinetics, and mechanism of action. *Epilepsia*. 2000;41(Suppl.1): S3-S9. DOI:10.1111/j.1528-1157.2000.tb02163.x

Singer HS. Stereotypic movement disorders. *Hyperkinetic Movement Disorders*. 2011;631–639. DOI:10.1016/b978-0-444-52014-2.00045-8

Sparber SB, Meyer DR. Clonidine antagonizes naloxone-induced suppression of conditioned behavior and body weight loss in morphine-dependent rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 1978;9(3); 319–325. DOI:10.1016/0091-3057(78)90292-7

Sun X, Zhao Y, Wolf ME. Dopamine receptor stimulation modulates AMPA receptor synaptic insertion in prefrontal cortex neurons. *J Neurosci*. 2005;25(32):7342-51

Suzuki T, Hayashi Y, Misawa M. The role of mu1 receptor in physical dependence on morphine using the mu receptor deficient CXBK mouse. *Life Sciences*. 1992;50(12);849–856. DOI:10.1016/0024-3205(92)90203-2

Teng HK, Teng KK, Lee R, Wright S, et al. ProBDNF Induces Neuronal Apoptosis via Activation of a Receptor Complex of p75NTR and Sortilin. *The Journal of Neuroscience*. 2005; 25(22):5455–5463. DOI:10.1523/JNEUROSCI.5123-04.2005

Tomek SE, Olive MF. Social Influences in Animal Models of Opiate Addiction. *International Review of Neurobiology*. 2018;Volume140:81-107. DOI:10.1016/bs.irn.2018.07.004

Topkara B, Yananli HR, Sakallı E, Demirkapu MJ. Effects of Injection of Gamma-Aminobutyric Acid Agonists into the Nucleus Accumbens on Naloxone-Induced Morphine Withdrawal. *Pharmacology*. 2017;100:131–138. DOI: 10.1159/000477548

Trescot AM, Datta S, Lee M, Hansen H. Opioid Pharmacology. *Pain Physician* 2008;11: S133-S153

Uzbay Tİ. Madde Bağımlılığı Çalışmalarında Kullanılan Deneysel Hayvan Modelleri. *Mised.Türk Eczacılar Birliği Meslek İçi Sürekli Eğitim Dergisi*. Aralık 2009;21-22;49-64

Vinitskaia AG, Lelevich SV, Lelevich VV, Kozlovskii AV, Doroshenko EM. GABA Metabolism and Neuroactive Amino Acids in the Rat Brain in Morphine Withdrawal Syndrome. *Biomed Khim*. 2007; 53(4):427-34. PMID: 18035723

Woo NH, Lu B. BDNF in Synaptic Plasticity and Memory. *Encyclopedia of Neuroscience*.2009;135–143. DOI:10.1016/b978-008045046-9.00829-9

Wüster M, Schulz R, Herz A. Specificity of opioids towards the mu-, delta- and epsilon-opiate receptors. *Neuroscience Letters*. 1979;15(2-3):193-8. PMID:231238. DOI:10.1016/0304-3940(79)96112-3

Yananli H, Gören MZ, Berkman K, Aricioğlu F. Effect of agmatine on brain L-citrulline production during morphine withdrawal in rats: a microdialysis study in

nucleus accumbens. Brain Research. 2007;1132(1):51-58 DOI: 10.1016/j.brainres.2006.11.028 PMID: 17182008

Yang B, Ren Q, Zhang J-c, Chen Q-X, Hashimoto K. Altered expression of BDNF, BDNF pro-peptide and their precursor proBDNF in brain and liver tissues from psychiatric disorders: rethinking the brain–liver axis. Translational Psychiatry: 2017;7, e1128. DOI:10.1038/tp.2017.95

Yang Y, Shuaib A, Li Q, Siddiqui MM. Neuroprotection by delayed administration of topiramate in a rat model of middle cerebral artery embolization. Brain Research. 1998;804:169–76. DOI:10.1016/S0006-8993(98)00410-7

Zagon IS, Gibo DM, McLaughlin PJ. Zeta (zeta), a growth-related opioid receptor in developing rat cerebellum: identification and characterization. Brain Research. 1991;551 (1-2): 28-35. PMID:1655161. DOI: 10.1016/0006-8993(91)90909-f

Zarrindast MR, Habibi M, Borzabadi S, Fazli-Tabaei S, Hossein Yahyavi S, Rostamin P. The effects of dopamine receptor agents on naloxone-induced jumping behaviour in morphine-dependent mice. Eur J Pharmacol. 2002 Sep 20;451(3):287-293

Zhang G, Wu X, Zhang YM, et al. Activation of serotonin 5-HT_{2C} receptor suppresses behavioral sensitization and naloxone-precipitated withdrawal symptoms in morphine-dependent mice. Neuropharmacology. 2016;101:246-254. DOI:10.1016/j.neuropharm.2015.09.031

Zullino DF, Cottier AC, Besson J. Topiramate in opiate withdrawal. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*. 2002;26;1221– 1223

Zullino DF, Krenz S, Zimmerman G, et al. Topiramate in Opiate Withdrawal-Comparison with Clonidine and with Carbamazepine/mianserin. *Substance Abuse*. 2004;25(4):27-33. DOI: 10.1300/J465v25n04_04

9. EKLER

Ek-1. Etik Kurul Onayı



MARMARA ÜNİVERSİTESİ HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU

PROJE ONAY FORMU				
BAŞVURU BİLGİLERİ	PROTOKOL KODU	83.2017.mar	ÇALIŞMA	Test
	PROJE ADI	Santral Sinir Sistemine Akut Uygulanan Topiramatin Morfin Yoksunluk Sendromuna ve Beyin Kaynaklı Nörotrofik Faktöre Etkisi		
	SORUMLU ARAŞTIRMACI (UNVANI/ ADI)	Doç. Dr. Hasan Raci YANANLI		
	ARAŞTIRMA MERKEZİ	DEHAMER		
	DESTEKLEYİCİ			
KARAR BİLGİLERİ	TARİH	25.09.2020*		
	Yukarıda başvuru bilgileri verilen araştırma başvurusu dosyası ve ilgili belgeleri araştırmanın gerektirdiği amaç, yöntem ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş ve gerçekleştirilmesinde sakınca bulunmadığı için kurulumuzca onaylanmasına oy birliği ile karar verilmiştir. Onay sonrasında yapılacak her türlü proje değişiklikleri (kısımlar, başlık vb.) veya protokol değişikliklerinin Etik Kurula bildirilerek proje onayının yenilenmesi gerekmektedir.			
KURUL ÇALIŞMA ESASI	Deney hayvanları ile yapılacak olan bilimsel araştırma, test, sağlık hizmetleri uygulamaları ve eğitim-öğretim gibi temel etkinliklerde kullanılan yöntem ve materyaller ile ilgili etik standartları gözden geçirmek, etik ilkelere doğrultusunda görüş bildirmek, araştırma önerilerini incelemek ve sertifikalı deneyimlerin deney hayvanı kullanmalarını engellemektir.			
Hayvan türü ve sayısı				
ÜYELER				
Unvanı/ Adı/ Soyadı	Uzmanlık Dalı	Kurumu/EK Üyeliliği	Onaylanan Proje ile İlişkisi	İmza
Prof.Dr. Göknel ŞENER	Farmakoloji	M.Ü. Erzurum Fakültesi HADYEK Başkanı	Yok	
Prof.Dr. Levent KABASAKAL	Farmakoloji	M.Ü. Erzurum Fakültesi HADYEK Üyesi	Yok	
Prof.Dr. Ayşen YARAT	Biyokimya	M.Ü. Diğ. Hekimliği Fakültesi HADYEK Üyesi	Yok	
Prof.Dr. Serap ŞİRVANCI	Histoloji-Embriyoloji AbD	M.Ü. Tıp Fakültesi HADYEK Üyesi	Yok	
Prof.Dr. Rezzan GÜLHAN	Farmakoloji	M.Ü. Tıp Fakültesi HADYEK Üyesi	Yok	
Doç.Dr. Gürkan SERT	Tıp Tarihi ve Etik	M.Ü. Tıp Fakültesi HADYEK Üyesi	Yok	
Doç. Dr. Dilek AKKÖN	Histoloji-Embriyoloji AbD	M.Ü. Tıp Fakültesi HADYEK Üyesi	Yok	
Dr. Öğr. Üyesi Dilek ÖZBEYLİ	Veteriner Hekim	M.Ü. Sağlık Hizmetleri MYO HADYEK Üyesi	Yok	
Vet. Hek. Deniz Mukaddes Türet	Veteriner Hekim	DEHAMER Sorumlu Veteriner HADYEK Üyesi	Yok	
Alper Şimşek	Serbest	Kurumla ilişkisi olmayan TC vatandaşı üye	Yok	
Çhançhan MURATOĞLU	Serbest Danışmanlık	Sivil Toplum Kuruluşu Üyesi ve Kurumla ilişkisi olmayan TC vatandaşı üye	Yok	

*Bu form 83.2017.mar protokol numarası ile 06.11.2017 tarihinde onaylanan proje için proje yürütücüsü tarafından yapılan başlık değişikliği talebi üzerine düzenlenmiştir.

Ek-2. Deney Hayvanları Kullanım Sertifikası

TÜRKİYE CUMHURİYETİ MARMARA ÜNİVERSİTESİ SÜREKLİ EĞİTİM MERKEZİ EĞİTİM SERTİFİKASI	REPUBLIC OF TURKEY MARMARA UNIVERSITY CONTINUING EDUCATION CENTER EDUCATION CERTIFICATE
	
Songül Özkula	
Marmara Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından 23 Aralık 2013 - 6 Ocak 2014 tarihleri arasında düzenlenen 40 saat teorik ve 40 saat pratik uygulamaları içeren "Araştırmacılar için Deney Hayvanları Kullanımına ait Eğitim" başlıklı sertifikası programını başarı ile tamamlamıştır.	has successfully completed the certificate program entitled "Education on Animal Use for Researchers" consisting of 40 hours theoretical and 40 hours practical courses organized by Marmara University Animal Experiments Local Ethics Committee between 23 December 2013 - 6 January 2014.
Prof. Dr. Gökşel Şener MÜ Hayvan Deneyleri Etik Kurulu Program Koordinatörü Program Coordinator of MU Committees of Local Ethics Concerning Experiments on Animals	Yrd. Doç. Dr. Mehmet Ersoy Sürekli Eğitim Merkezi Müdürü Director of Continuing Education Center
№ DENEY 2013.064	