



T.C.
NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



Fizyoloji Anabilim Dalı

Fizyoloji

[Yüksek Lisans Tezi]

**HİPOTALAMUSTAKİ BAZI OREKSİJENİK VE ANOREKSİJENİK
MOLEKÜLLERİN EKSPRESYONUNDA MÜ OPIOİT RESEPTÖRLERİN
OLASI ETKİSİNİN YETİŞKİN SIÇANLARDA ARAŞTIRILMASI**

Zeliha ERKAYA
ORCID: 0000-0001-8278-1274

Danışman
Prof. Dr. Selim KUTLU
ORCID: 0000-0001-9257-4797

Bu tez çalışması Necmettin Erbakan Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından 23YL18003 numaralı proje ile desteklenmiştir.

Konya – 2024

TEŞEKKÜR

Fizyoloji alanında ve her alanda kendimi geliőtirebilmem için her türlü imkânı sağlayan ve tez çalışmamda desteklerini esirgemeyen, benim için bir hocadan daha fazlası olan her anlamda örnek aldığım değerli danışman hocam Prof. Dr. Selim KUTLU'ya sonsuz saygı ve teőkükürlerimi sunarım.

Yüksek lisans eğitimim süresince bilgi ve tecrübeleri ile büyük katkı sağlayan kıymetli hocalarım, Prof. Dr. Işık SOLAK GÖRMÜŐ, Doç. Dr. Faik ÖZDENGÜL ve Dr. Öğr. Üyesi Raviye ÖZEN KOCA'ya teőkükürü bir borç bilirim.

Deneylerimin moleküler analiz aşamasının gerçekleştirilmesine yardımcı olan hocalarım Prof. Dr. Ercan KURAR ve Doç. Dr. Canan EROĐLU'ya teőkükürlerimi sunarım.

Tezimi 23YL18003 no'lu proje ile destekleyen NEÜ Bilimsel Araştırma Koordinatörlüğü'ne, çalışmamda yardımcı olan KONÜDAM Deneysel Tıp Araştırma ve Uygulama Merkezi'ndeki ekip üyelerine ve Sağlık Bilimleri Enstitüsü öğrenci işlerine teőkükür ederim.

Beni her zaman destekleyen, güvenen, maddi ve manevi yanımda olan, varlıklarıyla her daim bana güç veren babam Doç. Dr. Musa ERKAYA, annem Vahide ERKAYA, ablam Arş. Gör. Dr. Müberra ERKAYA TOSUN, kardeşim Ertuđrul ERKAYA ve nişanlım Enes TURAN'a sonsuz saygı, sevgi ve teőkükürlerimi sunarım.

Zeliha ERKAYA

Haziran 2024

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER.....	iv
TEZ ONAY SAYFASI.....	vi
TEZ ÇALIŞMASI ORJİNALLİK RAPORU	vii
BİLİMSEL ETİK BEYANNAMESİ	viii
KISALTMALAR.....	ix
TABLolar LİSTESİ.....	xi
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	xii
ÖZET	xiv
ABSTRACT	xv
1.GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2.GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Enerji Metabolizması ve Hipotalamus	3
2.2. Ventromediyal Nükleus.....	4
2.3. Paraventriküler Nükleus	5
2.4. Dorsomediyal Nükleus	5
2.5. Arkuat Nükleus	5
2.6. Lateral Hipotalamik Alan.....	7
2.7. Oreksijenik Moleküller	8
2.7.1. Nöropeptit Y.....	8
2.7.2. Agouti ilişkili peptit	9
2.7.3. Ghrelin.....	9
2.7.4. Oreksin A ve B	10
2.8. Anoreksijenik Moleküller	11
2.8.1.Proopiomelanokortin.....	11
2.8.2. Kokain amfetamin ilişkili peptit.....	11
2.8.3. Leptin	12
2.9. Opioitler	13
2.9.1.Opioit peptitler	15
2.9.2. Opioit reseptörler ve alt Tipleri.....	16
2.9.3.Morfin.....	18
2.9.4.Nalokson.....	18
2.9.4.Opioit bağımlılığı	19
3.GEREÇ VE YÖNTEM	21
3.1. Hayvan Deneyleri.....	21

3.1.1. Morfin bağımlılığı ve morfin çekilmesi uygulama aşamaları	21
3.1.2. Deneyin sonlandırılması ve dokuların toplanması	22
3.1.3. Doku örneklerinden total RNA izolasyonu	22
3.1.4. Total RNA örneklerinin kalite kontrolü	23
3.1.5. Total RNA örneklerinin GDNA kontaminasyonunun temizlenmesi	23
3.1.6. Primer dizaynı	23
3.1.7. Reverse transkriptaz reaksiyonu	23
3.1.8. Gerçek zamanlı kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu (qRT-PZR)	24
3.1.9. İstatiksel metot	24
4.BULGULAR	25
4.1.Davranış Testi Bulguları	25
4.2.Gen İfadesi Bulguları	32
5.TARTIŞMA	41
6.SONUÇ	45
7. ÖNERİLER.....	45
7.KAYNAKLAR.....	47
8. EKLER.....	53
8.1. EK 1 Etik Kurul Kararı	53

TEZ ONAY SAYFASI

Necmettin Erbakan Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Fizyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans/Doktora Öğrencisi **ZELİHA ERKAYA**'nın "**Hipotalamustaki Bazı Oreksijenik ve Anoreksijenik Moleküllerin Ekspresyonunda Mü Opioid Reseptörlerin Olası Etkisinin Yetişkin Sıçanlarda Araştırılması**" başlıklı tezi tarafımızdan incelenmiş; amaç, kapsam ve kalite yönünden Yüksek Lisans olarak kabul edilmiştir.

Konya / 26.06.2024

Tez Danışmanı Prof. Dr. Selim KUTLU
Necmettin Erbakan Üniversitesi
Tıp Fakültesi / Fizyoloji Anabilim Dalı

Jüri Üyesi Doç. Dr. Mehmet ÖZ
Aksaray Üniversitesi
Tıp Fakültesi / Fizyoloji Anabilim Dalı

Jüri Üyesi Dr. Öğr. Üyesi Raviye ÖZEN KOCA
Necmettin Erbakan Üniversitesi
Tıp Fakültesi / Fizyoloji Anabilim Dalı

Yukarıdaki tez, Necmettin Erbakan Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunun 10/07/2024 tarih ve 14/17 sayılı kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Hasibe VURAL
Enstitü Müdürü

TEZ ÇALIŞMASI ORJİNALLİK RAPORU

Hipotalamustaki Bazı Oreksijenik Ve Anoreksijenik Moleküllerin Ekspresyonunda Mü Opioid Reseptörlerin Olası Etkisinin Yetişkin Sıçanlarda Araştırılması başlıklı tez çalışmamın toplam **44** sayfalık kısmına ilişkin, 03.06.2024 tarihinde tez danışmanım tarafından **Turnitin** adlı intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan orijinallik raporuna göre, tezimin benzerlik oranı **%5** olarak belirlenmiştir.

Uygulanan filtrelemeler:

1. Tez kabul sayfası hariç
2. Tez çalışması orijinallik raporu sayfası hariç
3. Bilimsel etik beyannamesi sayfası hariç
4. Önsöz hariç
5. İçindekiler hariç
6. Simgeler ve kısaltmalar hariç
7. Materyal ve metot hariç
8. Kaynaklar hariç
9. Alıntılar dahil
10. 7 kelimedenden daha az örtüşme içeren metin kısımları hariç

Necmettin Erbakan Üniversitesi Tez Çalışması Orijinallik Raporu Uygulama Esaslarını inceledim ve tez çalışmamın, bu uygulama esaslarında belirtilen azami benzerlik oranının (%30) altında olduğunu ve intihal içermediğini; aksinin tespit edileceği muhtemel durumda doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi ve yukarıda vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim.

03.06.2024

Zeliha ERKAYA

Prof. Dr. Selim KUTLU

BİLİMSEL ETİK BEYANNAMESİ

Bu tezin tamamının kendi çalışmam olduğunu, planlanmasından yazımına kadar tüm aşamalarında bilimsel etiğe ve akademik kurallara özenle riayet edildiğini, tez içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, ayrıca tez hazırlama kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda bilimsel kurallara uygun olarak atıf yapıldığını ve bu kaynakların kaynaklar listesine eklendiğini beyan ederim.

26.06.2024

Zeliha ERKAYA

KISALTMALAR

MSS: Merkezi Sinir Sistemi

GİS: Gastrointestinal Sistem

PVN: Paraventriküler Nükleus

VMN: Ventromediyal Nükleus

DMN: Dorsomediyal Nükleus

ARN: Arkuat Nükleus

LHA: Lateral Hipotalamik Alan

NPY: Nöropeptit Y

AgRP: Agouti İlişkili Peptit

OXA: Oreksin A

OXB: Oreksin B

MCH: Melanin Yoğunlaştırıcı Hormon

POMK: Proopiomelanokortin

KART: Kokain Amfetamin İlişkili Peptit

α -MSH: α -Melanosit Uyarıcı Hormon

CCK: Kolesistokinin

ICV: İntraserebroventriküler

MC3R: Melanokortin 3 Reseptörü

MC4R: Melanokortin 4 Reseptörü

ME: Median Eminens

cAMP: Siklik Adenozin Monofosfat

GHSR: Büyüme Hormonu Salgılatıcı Reseptör

PENK: Proenkefalin

PDN: Prodinorfin

N/OFQ: Nosisseptin/Orfanin FQ

MOR: μ Opioid Reseptörleri

KOR: κ Opioid Reseptörü

DOP: δ Opioid Reseptörü

TABLULAR LİSTESİ

Tablo No	Sayfa No
Tablo 2.1. Enerji dengesi ve beslenme kontrolünde rol alan oreksijenik ve anoreksijenik peptitler.....	4
Tablo 4.1. Davranış testi bulguları Ortalama±SH değerleri.....	25
Tablo 4.2. Gen ekspresyon düzeyleri Ortalama±SH değerleri.....	32

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil No	Sayfa No
Şekil 2.1. Besin alımının hipotalamus tarafından düzenlenmesi.....	3
Şekil 2.2. Arkuat Nükleus ve besin alımının kontrolü.....	7
Şekil 2.3. Leptinin ARN'de besin alımı üzerinde etkisi.....	13
Şekil 2.4. Endojen opioit peptitlerinin kimyasal yapıları.....	16
Şekil 2.5. Morfin molekülünün kimyasal yapısı.....	18
Şekil 2.6. Naloksonun kimyasal formülü.....	19
Şekil 4.1. Kontrol (K), Morfin (M), Nalokson (N) ve Morfin+nalokson (M+N) gruplarındaki ağırlık değişimi değerleri.....	25
Şekil 4.2. Kontrol (K), Morfin (M), Nalokson (N) ve Morfin+Nalokson (M+N) gruplarındaki anormal postur sayıları.....	26
Şekil 4.3. Kontrol (K), Morfin (M), Nalokson (N) ve Morfin+Nalokson (M+N) gruplarındaki defekasyon sayıları.....	26
Şekil 4.4. Kontrol (K), Morfin (M), Nalokson (N) ve Morfin+Nalokson (M+N) gruplarındaki dış gıcırdatma davranışı sayıları.....	27
Şekil 4.5. Kontrol (K), Morfin (M), Nalokson (N) ve Morfin+Nalokson (M+N) gruplarındaki göz kısma davranışı sayısı.....	28
Şekil 4.6. Kontrol (K), Morfin (M), Nalokson (N) ve Morfin+Nalokson (M+N) gruplarındaki kifoş sayısı.....	29
Şekil 4.7. Kontrol (K), Morfin (M), Nalokson (N) ve Morfin+Nalokson (M+N) gruplarındaki sıçrama davranış sayısı.....	29
Şekil 4.8. Kontrol (K), Morfin (M), Nalokson (N) ve Morfin+Nalokson (M+N) gruplarındaki silkelene davranış sayısı.....	30

Şekil 4.9. Kontrol (K), Morfin (M), Nalokson (N) ve Morfin+Nalokson (M+N) gruplarındaki süslenme sayısı.....	31
Şekil 4.10. Kontrol (K), Morfin (M), Nalokson (N) ve Morfin+Nalokson (M+N) gruplarındaki şahlanma sayısı.....	31
Şekil 4.11. Kontrol (K), Morfin (M), Nalokson (N) ve Morfin+Nalokson (M+N) gruplarına ait hipotalamus dokularında POMK ekspresyon düzeyleri.....	32
Şekil 4.12. Kontrol (K), Morfin (M), Nalokson (N) ve Morfin+Nalokson (M+N) gruplarına ait hipotalamus dokularında OXR2 ekspresyon düzeyleri.....	33
Şekil 4.13. Kontrol (K), Morfin (M), Nalokson (N) ve Morfin+Nalokson (M+N) gruplarına ait hipotalamus dokularında AGRP ekspresyon düzeyleri.....	34
Şekil 4.14. Kontrol (K), Morfin (M), Nalokson (N) ve Morfin+Nalokson (M+N) gruplarına ait hipotalamus dokularında NPY ekspresyon düzeyleri.....	35
Şekil 4.15. Kontrol (K), Morfin (M), Nalokson (N) ve Morfin+Nalokson (M+N) gruplarına ait hipotalamus dokularında LEPR ekspresyon düzeyleri.....	36
Şekil 4.16. Kontrol (K), Morfin (M), Nalokson (N) ve Morfin+Nalokson (M+N) gruplarına ait hipotalamus dokularında APLNR ekspresyon düzeyleri.....	37
Şekil 4.17. Kontrol (K), Morfin (M), Nalokson (N) ve Morfin+Nalokson (M+N) gruplarına ait hipotalamus dokularında APELİN ekspresyon düzeyleri.....	38
Şekil 4.18. Kontrol (K), Morfin (M), Nalokson (N) ve Morfin+Nalokson (M+N) gruplarına ait hipotalamus dokularında ORXA ekspresyon düzeyleri.....	39
Şekil 4.19. Kontrol (K), Morfin (M), Nalokson (N) ve Morfin+Nalokson (M+N) gruplarına ait hipotalamus dokularında FBN1 ekspresyon düzeyleri.....	40

ÖZET

Necmettin Erbakan Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Fizyoloji Anabilim Dalı
Fizyoloji
[Yüksek Lisans Tezi]

HİPOTALAMUSTAKİ BAZI OREKSİJENİK VE ANOREKSİJENİK MOLEKÜLLERİN EKSPRESYONUNDA MÜ OPIOİT RESEPTÖRLERİN OLASI ETKİSİNİN YETİŞKİN SIÇANLARDA ARAŞTIRILMASI

Zeliha ERKAYA

Konya-2024

Besin alımının düzenlenmesi hipotalamusta birçok nöroendokrin mekanizmanın çok faktörlü olarak entegrasyonu ile gerçekleşmektedir. Hipotalamusta oreksijenik ve anoreksijenik peptitler uyarılara yanıt oluşturarak besin alımının düzenlenmesine katkıda bulunur. Hipotalamusta da yaygın olarak eksprese olan opioit peptitlerin beslenme üzerindeki uyarıcı etkileri bilinmesine rağmen, bu etkinin mekanizmaları hakkında çok az bilgi bulunmaktadır. Bu çalışmanın amacı, hipotalamusta mü opioit reseptörlerin oreksijenik ve anoreksijenik mekanizmalar üzerindeki etkilerinin deneysel modelde araştırılmasıdır. Bu amaçla morfinin subkutan yolla uygulanmasının yetişkin erkek sıçanlarda hipotalamusta besin alımıyla ilişkili moleküller üzerindeki etkisinin belirlenmesi hedeflenmiştir.

Wistar ırkı erkek sıçanlar kontrol, morfin, morfin+nalokson ve nalokson olacak şekilde 4 gruba ayrıldı. Morfin bağımlılığı modeli için sıçanlara 5 gün boyunca 10 mg/kg/gün dozunda morfin subkutan uygulandı. 5. gün morfin+nalokson grubuna morfin yoksunluğu oluşturmak için 3 mg/kg dozunda nalokson ve diğer gruplara %0,9'luk NaCl çözeltisi enjekte edildi. Gruplar 30 dakika süreyle gözlemlendi ve dekapite edilerek hipotalamus dokuları çıkarıldı. Elde edilen dokulardan RT-PCR yöntemiyle anoreksijenik ve oreksijenik peptit ekspresyon seviyeleri belirlendi. İstatistiksel değerlendirme için tek yönlü varyans analizi kullanıldı.

Morfin uygulanması oreksin A gen ekspresyonunu artırırken, AgRP, NPY, POMK, FBN1 ifadelerini değiştirmedi. Nalokson uygulanması ise NPY ifadesini artırırken diğer molekülleri etkilemedi. Bu çalışmanın sonuçları morfin uygulanmasının beslenme ve metabolizmaya ilişkili molekülleri hipotalamustaki gen ifadelerini farklı düzeylerde etkileyebileceğini göstermiştir.

Anahtar Kelimeler: Beslenme ve sıçan, Hipotalamus, Morfin bağımlılığı

ABSTRACT

Necmettin Erbakan University, Graduate School of Health Sciences
Department of Physiology
Physiology
[Master Thesis]

INVESTIGATION OF THE POSSIBLE EFFECT OF MU OPIOID RECEPTORS ON THE EXPRESSION OF SOME OREXIGENIC AND ANOREXIGENIC MOLECULES IN THE HYPOTHALAMUS IN ADULT RATS.

Zeliha ERKAYA

Konya-2024

Regulation of food intake occurs in the hypothalamus through multifactorial integration of many neuroendocrine mechanisms. In the hypothalamus, orexigenic and anorexigenic peptides respond to stimuli and contribute to the regulation of food intake. Although the stimulatory effects of opioid peptides, which are also widely expressed in the hypothalamus, on feeding are known, little is known about the mechanisms of this effect. The aim of this study was to investigate the effects of opioid receptors in the hypothalamus on orexigenic and anorexigenic mechanisms in an experimental model. For this purpose, it was aimed to determine the effect of subcutaneous administration of morphine on food intake-related molecules in the hypothalamus of adult male rats.

Male Wistar rats were divided into 4 groups as control, morphine, morphine+naloxone and naloxone. For morphine addiction model, rats were administered morphine subcutaneously at a dose of 10 mg/kg/day for 5 days. On the 5th day, the morphine+naloxone group was injected with naloxone at a dose of 3 mg/kg and the other groups were injected with 0.9% NaCl solution to induce morphine withdrawal. The groups were observed for 30 minutes and the hypothalamus tissues were removed by decapitation. Anorexigenic and orexigenic peptide expression levels were determined by RT-PCR method. One-way analysis of variance was used for statistical evaluation.

Morphine administration increased orexin A gene expression, but did not change AgRP, NPY, POMK, FBN1 expression. Naloxone administration increased NPY expression but did not affect other molecules. The results of this study showed that morphine administration may affect gene expression of nutrition and metabolism related molecules in the hypothalamus at different levels.

Keywords: Feeding and rat, Hypothalamus, Morphine addiction

1.GİRİŞ VE AMAÇ

Beslenme ve metabolik olaylar canlıların yaşamlarını sürdürebilmeleri için büyük önem taşır. Enerji dengesinin düzenlenmesi, vücut ağırlığını korumak için enerji alımı ve harcanması arasındaki ilişkidir. Enerji alımının, enerji harcanmasından fazla olduğu durumlarda pozitif enerji dengesi ile vücut ağırlığında ve yağ oranında artış gözlemlenir. Zamanla bu enerji alımı ve harcanması arasındaki dengesizlik adipoz dokuda trigliserit formunda yağ depolanmasına yol açmaktadır. Belirtilen pozitif enerji dengesi çağın hastalığı obezite gibi patolojik sonuçların ortaya çıkmasına neden olmaktadır.

Besin alımının düzenlenmesi merkezi sinir sistemi (MSS), periferel sinyaller, duyuusal uyarıcılar gibi pek çok yolla gerçekleşir. İştahı ve besin alımı miktarını düzenleyen en önemli sinirsel merkezler hipotalamusta bulunur. Hipotalamusta besin alımını artıran ve azaltan oreksijenik ve anoreksijenik peptitler uyarılara yanıt oluşturarak açlığın, tokluğun ve besin alımının düzenlenmesine katkıda bulunur. Bu sebeple beslenme davranışı ve besin alımı ile ilgili süreçlerin kontrol edildiği MSS bölümü hipotalamustur (Mayer, 1953).

Paraventriküler nükleus (PVN), ventromediyal nükleus (VMN), dorsomediyal nükleus (DMN), arkuat nükleus (ARN) ve lateral hipotalamik alan (LHA) besin alımının düzenlenmesinde görev alan hipotalamus çekirdekleridir. VMN tokluk merkezi, LHA açlık merkezi olarak işlev gösterir. ARN, oreksijenik etkili nöropeptit Y (NPY), aguti ilişkili peptit (AgRP) ve anoreksijenik etkili proopiomelanokortin (POMK) ifade edilen nöronların yoğun popülasyonunu içerir (Valassi ve ark. 2008). AgRP yalnızca beyinde hipotalamusun ARN'sinden salgılanır ve AgRP üreten nöronların tümü NPY ile birlikte bulunur. PVN ve DMN de hipotalamusun beslenmeye ilgili önemli bölgeleridir (Flier 2006).

Enerji dengesi ve besin alımının düzenlenmesinde görev alan birçok oreksijenik ve anoreksijenik etkili molekül vardır. Oreksijenik peptitler besin alımını artırırken anoreksijenik peptitler besin alımını azaltmaktadır. NPY, AgRP, ghrelin, oreksin A ve B (OXA ve OXB), melanin yoğunlaştırıcı hormon (MCH) oreksijenik etkili peptitlerdir. POMK, leptin, kokain amfetamin ilişkili peptit (KART) anoreksijenik etkili peptitlerdir (Valassi ve ark. 2008).

Endojen opioit sistem yaklaşık olarak 30 farklı opioit peptitten oluşmaktadır. Beta endorfinler, met-enkefalin, leu-enkefalin, orfanin FQ (nosiseptin), dinorfinler bu peptitler arasında yer almaktadır. G protein eşlenikli opioit peptit reseptörleri mü, kappa, delta (μ , κ , δ),

ve nosiseptin opioit peptit reseptör olarak adlandırılmaktadır. μ opioit reseptörler hipotalamus, hipokampüs, nükleus akumbens ve prefrontal kortekste eksprese olmaktadır.

Beta endorfin μ opioit reseptör aktivasyonu ile işlev gösteren endojen bir opioittir. Aynı reseptör aracılığıyla analjezik etki gösteren sentetik opiyat morfin, farmakolojik alanda yaygın olarak kullanılmaktadır. Şiddetli ağrı kontrolünde sıklıkla kullanılan morfin, tekrarlayan kullanımlarında bağımlılığın gelişmesine neden olabilmektedir (Hassanipour ve ark. 2016). Bu özelliğiyle morfin, deneysel opioit bağımlılık modellemelerinde oldukça yaygın olarak kullanılmaktadır (Kim ve ark. 2016).

Bu tez çalışmasında mü opioit reseptör agonist opiyat olan morfinin subkutan yolla uygulanmasının yetişkin erkek sıçanlarda hipotalamusta oreksijenik ve anoreksijenik moleküller üzerindeki etkisinin araştırılması amaçlanmıştır. Bu amaçla davranış testleri uygulanmış ve elde edilen gen ifade düzeyleri karşılaştırılarak mü opioit reseptör aktivasyonunun hipotalamustaki beslenmeyle ilişkili moleküller üzerindeki etkisi araştırılmıştır.

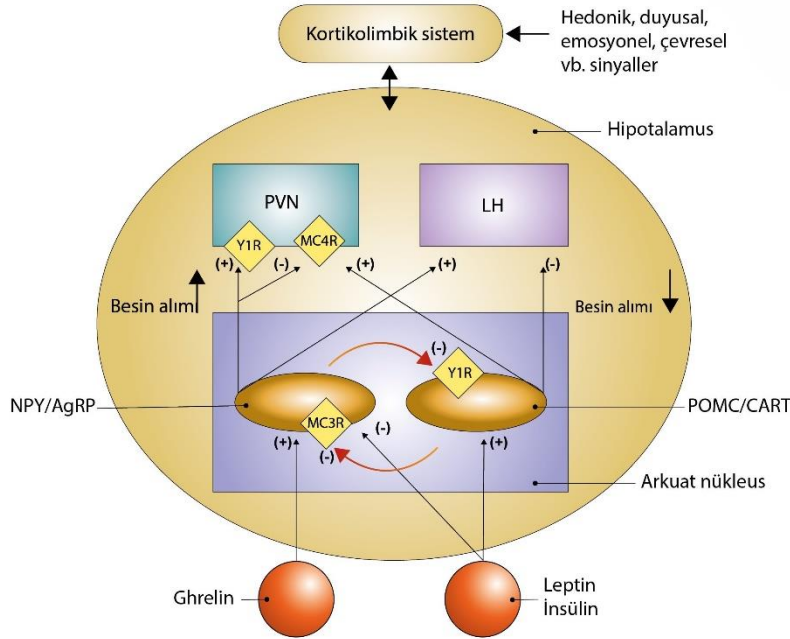
2.GENEL BİLGİLER

2.1. Enerji Metabolizması ve Hipotalamus

Beslenme kompleks bir davranıştır. Besin alımı ve enerji harcanması arasındaki karmaşık denge vücut ağırlığının sürekliliğini sağlamaktadır. Besin alımının düzenlenmesi hipotalamusta oldukça karmaşık birçok mekanizmanın entegrasyonu ile gerçekleşmektedir.

MSS, besin alımı ve enerji metabolizmasının düzenlenmesinde gastrointestinal sistem (GİS) ve nöroendokrin sinyallerin değerlendirilip integrasyonunun yapılmasında önemli rol oynar (Schwartz ve ark., 1996). Bu anlamda hipotalamus beslenmeyle ilgili süreçlerin kontrol edildiği MSS bölümüdür (Mayer 1953).

Hipotalamusta yer alan PVN, VMN, DMN, ARN ve LHA besin alımının merkezi kontrolünde önemli rol oynamaktadır. LHA açlık merkezi olarak görev yaparken, VMN doygunluk hissinin oluşmasında etkili olan tokluk merkezidir (İnsan Fizyolojisi. 2021).



Şekil 2.1. Besin alımının hipotalamus tarafından düzenlenmesi. AgRP, agouti ilişkili peptit; CART, kokain amfetamin ilişkili peptit; LH, lateral hipotalamus; NPY, nöropeptit Y; POMC, proopiomelanokortin; PVN, paraventricüler nükleus (İnsan Fizyolojisi Ed: Erdal Açar, 2021).

ARN, besin alımı ve enerji homeostazisini etkileyen ve açlık/tokluk durumlarında sinyallerin algılanıp değerlendirilmesinde görev alan enerji nükleusudur. ARN'de oreksijenik ve anoreksijenik olarak adlandırılan nöron grupları bulunmaktadır. NPY, AgRP, ghrelin, OXA ve OXB, MCH besin alımını artıran oreksijenik etkili peptitlerdir. POMK, leptin, KART besin alımını azaltan anoreksijenik etkili peptitlerdir (Valassi ve ark. 2008).

Tablo 2.1. Enerji dengesi ve beslenme kontrolünde rol alan oreksijenik ve anoreksijenik peptitler.

Oreksijenik Peptitler	Anoreksijenik Peptitler
Nöropeptit Y	Proopiomelanokortin
Agouti ilişkili peptit	Leptin
Ghrelin	Kokain amfetamin ilişkili peptit
Oreksin Ave B	

2.2. Ventromediyal Nükleus

VMN'nin, lezyon çalışmaları sonucunda insanlar da dahil olmak üzere çeşitli türlerde hiperfaji ve obeziteye yol açtığı Hetherington ve Ranson tarafından 1942 yılında açıklanmıştır ve VMN beyin "tokluk merkezi" olarak adlandırılmıştır (Sun ve ark., 2006; King, 2006). VMN nöronları nükleusun dorsomediyal yönünde yerleşmiştir ve bu alan DMN ile karşılıklı olarak ilişkilidir.

VMN'nin beslenme davranışında birincil rol oynadığına dair çok sayıda çalışma vardır. İnsanlarda yapılan nörogörüntüleme çalışmalarında, besin alımı sırasında VMN bölgesindeki aktivitede belirgin artış olduğu görülmüştür (King, 2006). VMN, kan glikoz düzeylerine dinamik olarak yanıt veren geniş glukoresponsif nöron popülasyonuna ve beslenmeyle ilgili uyaranlara yanıt veren çok sayıda histamin, dopamin, serotonin ve GABA nöronuna sahiptir. Son çalışmalar, melanokortinlerin beslenme davranışının VMN düzenlemesinde rol oynadığını göstermiştir. POMK nöronları, VMN beyin kaynaklı nörotrofik faktör nöronlarını aktive ettiğinde besin alımı azalır. Posterodorsal amigdaldan VMN'ye giden efferent projeksiyonlarda hasar olan dişi sıçanlarda orta derecede hiperfaji ve obezite gözlemlenmiştir (King, 2006).

2.3. Paraventriküler Nükleus

PVN 3. ventrikül'ün dorsal kısmında bulunur. PVN, GİS'i kontrol eden sempatik ve parasempatik preganglionik nöronlara önemli bir girdi kaynağıdır. Bu durum besin alımındaki değişikliklerin otonomik değişiklikler sonucu olabileceğini düşündürmektedir (Elmqvist ve ark., 1999).

PVN'ye α -melanosit uyarıcı hormon (α -MSH) enjeksiyonu besin alımını azaltırken, NPY mikroenjeksiyonu besin alımını uyarıp artırmıştır (Rossi ve ark., 1998). Ayrıca yapılan elektrofizyolojik çalışmalar, PVN'nin leptin, adiponektin, kolesistokinin (CCK) ve glukagon benzeri peptit-1 (GLP-1)'e cevap olarak önemli değişiklikler göstermiştir (Hamamura ve ark., 1991; Larsen ve ark., 1997). PVN, kortikotropin salgılatıcı hormon, tirotropin salgılatıcı hormon, oksitosin ve vazopressin salgılatıcı nöron grupları içermektedir. Bu nöronlar NPY, AgRP ve α -MSH'nin besin alımı ve enerji harcama sinyallerini PVN'ye iletirler (Elmqvist ve ark., 1999).

2.4. Dorsomediyal Nükleus

DMN, Bernardis ve arkadaşları tarafından yapılan elektrofizyolojik lezyon çalışmaları ile 1963 yılında hipotalamusta tanımlanmıştır (Bernardis ve ark., 1963). Beyin, çevresel aydınlık-karanlık döngüleriyle uyum içinde günlük davranış ve metabolizma ritimlerini yönlendirmede önemli bir rol oynar. Beyinde DMN, beslenme ve enerji homeostazının bütünleştirici sirkadiyen kontrolünde görev alır (Saper ve ark., 2005).

Leptin reseptörünü ifade eden DMN nöronlarının (DMHLepR) akut inhibisyonunun beslenme üzerinde etkisi olmadığı görülürken (Garfield ve ark., 2016), kronik inhibisyonu birkaç gün boyunca devam eden hiperfajiye neden olmuştur (Faber ve ark., 2021). Bu geçici hiperfajik yanıt sürekli kilo alımı ve yağ kütlelerinde artışa neden olmuştur. Artan yağlanmayla tutarlı olarak orta derecede artmış plazma leptin seviyesi ve açlık kan glikoz değerinde yükselme gözlemlenmiştir. Bu bulgular, DMHLepR nöronlarının enerji homeostazisinde fizyolojik bir rol oynadığını göstermektedir (Garfield ve ark., 2016; Faber ve ark., 2021).

2.5. Arkuat Nükleus

ARN, 3. ventrikül boyunca uzanmış şekilde bazal hipotalamusta bulunur. Besin alımı, vücut ağırlığının düzenlenmesi ve enerji sinyallerinin algılanıp değerlendirilmesinde kritik öneme sahip olan enerji çekirdeğidir (Meister ve ark., 1989; Bergen ve ark., 1998). POMK ve

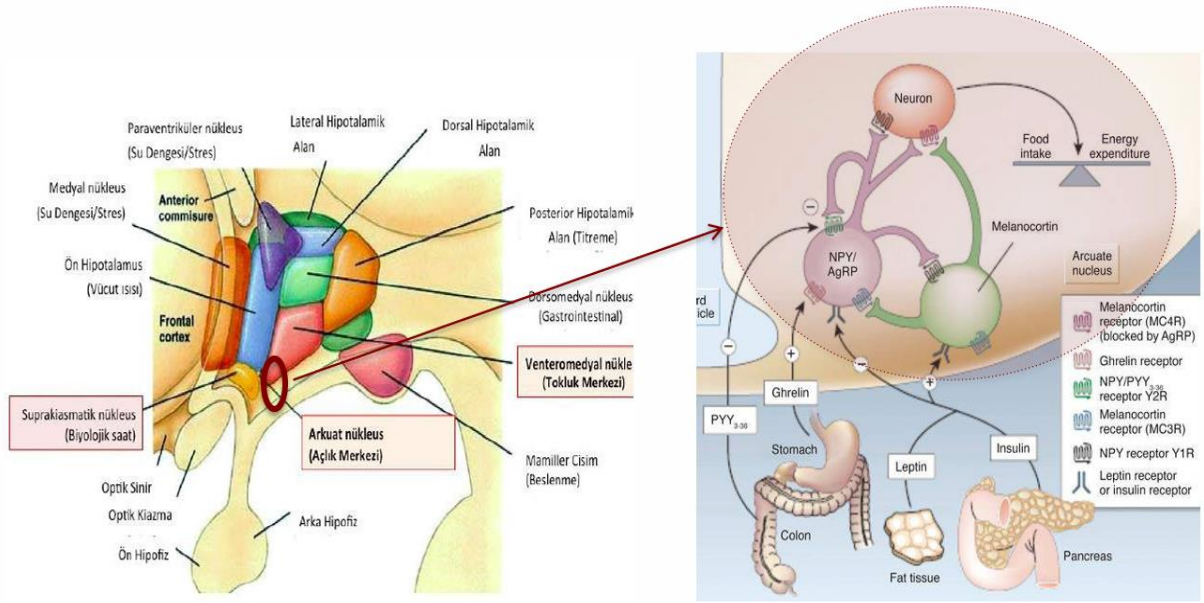
AgRP nöronlarını içeren ARN, besin alımının ve vücut ağırlığının sinirsel kontrolünde en çok etkili beyin bölgesidir (Sohn ve Williams, 2012).

ARN kökenli nöronlar anoreksijenik (besin alımını azaltan) ve oreksijenik (besin alımını artıran) ve olarak adlandırılmaktadır. Bunlardan NPY/AgRP nöronları oreksijenik etkili iken, POMK/KART nöronları ise anoreksijenik etkilidir.

POMK, α -melanin uyarıcı hormon öncülüdür ve iştah baskılayıcı etkisiyle bilinir. KART ve α -MSH'nin sıçanlarda intraserebroventriküler (ICV) enjeksiyonunun besin alımını inhibe ettiği bildirilmiştir (Edwards ve ark., 2000). α -MSH, MSS içindeki melanokortin nöronlarının aktivasyonu ile besin alımını inhibe eden melanokortin 3 ve 4 reseptörü (MC3R ve MC4R) agonistidir.

Melanokortin reseptörlerinin antagonisti olan AgRP'yi eksprese eden nöronlar, ARN'de POMK nöronlarına bitişik olarak bulunur. AgRP nöronları sadece ARN'de NPY ile birlikte lokalize olur. NPY, besin alımını uyarmak ve enerji metabolizmasını düzenlemede birincil role sahiptir. NPY ve AgRP'nin ICV enjeksiyonlarının besin alımını uyardığı gösterilmiştir (Sohn ve Williams, 2012).

NPY/AgRP ve POMK/KART nöronlarının ARN'den hipotalamusun diğer bölgeleri olan PVN, DMN, VMN ve LHA'ya projeksiyonları vardır (Ahima ve ark., 2000). NPY, besin alımını Y1 ve Y5 reseptörleri ile uyarırken; α -MSH, MC4R reseptörü ile besin alımını baskılar (Elmqvist ve ark., 1999). AgRP ise α -MSH antagonisti olarak görev alır (Ollmann ve ark., 1997). Hipotalamusta NPY/AgRP nöronları leptin hormonu tarafından baskılanırken; buna karşın POMK/KART nöronları pozitif uyarılır (Elmqvist ve ark., 1999)



Şekil 2.2. Arkuat Nükleus ve besin alımının kontrolü (Schwartz ve Morton, 2002).

2.6. Lateral Hipotalamik Alan

LHA, 1951 yılında lezyon çalışmaları ile Anand ve Brobeck tarafından “açlık merkezi” olarak tanımlanmıştır (Anand ve Brobeck, 1951). LHA, azalan glikoz seviyesiyle aktive olan ve leptin ile inhibe edilen glikoza duyarlı nöronlar içermektedir (Stein ve ark., 1990). Hipoglisemi ile uyarılmış hiperfajide önemli rol oynar (Bernardis ve ark.1996).

LHA'nın besin alımına etkisi hem serebral kortekse hem de beyin sapı ve omuriliğin otonomik ve motor sistemlerine doğrudan projeksiyonları olan lateral hipotalamik hücre sistemini gösteren nöroanatomik çalışmalarla desteklenmiştir (Elmqvist ve ark., 1999).

LHA'da bulunan nöron grupları oreksin ve MCH sentezlemektedirler (Elmqvist ve ark., 1999). ORXA ve ORXB uyku/uyanıklık, iştah ve otonomik fonksiyonların kontrolünde işlevlidir (Brisbare-Roch ve ark., 2007). MCH nöronları hipotalamik açlık merkezi olan LHA'da yoğunlaşmıştır. MCH, 19 amino asitli siklik bir peptittir ve sinyalleri hipotalamusta G protein eşlenik MCH-1 ve MCH-2 reseptörleri ile işlev gösterir (Qu ve ark., 1996). LHA'ya MCH veya ORX'in enjeksiyonu sıçanlarda besin alımını artırıcı etki göstermiştir. Ayrıca, sıçanlarda MCH geninin hedeflenen şekilde silinmesi, kontrol grubuna kıyasla besin alımının ve vücut ağırlığının azalmasına neden olmuştur (Shimada ve ark., 1998).

2.7. Oreksijenik Moleküller

2.7.1. Nöropeptit Y

NPY molekülü, 1982 yılında Tatemoto ve arkadaşları tarafından ilk defa domuz beyinde keşfedilmiştir. NPY, pankreatik peptid ailesinden 36 amino asitten oluşan bir peptittir ve MSS'de üretilen bir nörotransmitterdir (Williams ve ark. 2000). NPY'nin MSS'de bulunduğu bölgeler, hipokampus, amigdala, hipotalamusun 3. ventriküle komşu kısmında yerleşen ARN'dir. PVN, suprakiazmatik nükleus, median eminens (ME) ve DMN'de daha az olacak şekilde eksprese edilir (White and Kershaw, 1990; Rossi ve ark., 1998; Schwartz ve ark., 2000).

NPY, sinyal yollarındaki etkisini G protein aracılığı ile çalışan 6 adet reseptör ile gösterir (Y1, Y2, Y3, Y4, Y5, Y6). Bu reseptörler siklik adenozin monofosfat (cAMP) üretimini inhibe eden G protein eşlenik reseptörlerdir. Y1, Y2 ve Y5 reseptörleri yoğun miktarda hipotalamusta sentezlenmektedir (Leibowitz ve Alexander, 1991; Lecklin ve ark., 2003; Chee ve Colmers, 2008). Y1 reseptörü hipokampus, amigdala, hipotalamus bölgelerinde post sinaptik olarak bulunmaktadır (Kopp ve ark., 2002). Y2 reseptörü presinaptik bölgede yerleşmiştir ve aşırı NPY salınımını inhibe eder (Chee and Colmers, 2008).

NPY, besin alımının kontrol edilmesi ve enerji metabolizması, duygusal davranışların düzenlenmesi, üreme, uyku uyanıklık siklusunun düzenlenmesi, günlük sirkadiyen ritim, termogenez ve kan basıncının kontrolü gibi birçok fizyolojik işleve sahiptir (Hu ve ark., 1997).

Oreksijenik etkili AgRP, ARN'de NPY ile birlikte besin alımını stimüle eden NPY/AgRP nöronlarından salgılanır (Rossi ve ark., 1998). NPY/AgRP nöronlarının genetik olarak kaldırılması erişkin sıçanlarda zayıf ve hipofajik bir fenotip ile sonuçlanmıştır (Bewick ve ark., 2005).

ICV yolla NPY uygulanması beslenmeyi belirgin olarak artırmaktadır (Niimi ve ark., 2001; Clark ve ark., 1984).

NPY besin alımının düzenlenmesinde etkisini Y1, Y2 ve Y5 reseptörleri üzerinden gösterir. ICV yolla NPY reseptörleri olan Y1, Y2, Y4 ve Y5 reseptör agonistlerinin uygulanması sıçanlarda besin alımını indüklemiştir (Rojas ve ark., 2012).

2.7.2. Agouti ilişkili peptit

AgRP ilk kez 1997 yılında Olmann ve arkadaşları tarafından bulunmuştur (Ollmann ve ark., 1997). AgRP, besin alımını stimüle eden AgRP/NPY nöronları tarafından sentezlenen 132 amino asitli oreksijenik bir nöropeptittir (Rossi ve ark., 1998). Hipotalamusun kavisli çekirdeği ARN'de bulunur. Çeşitli hipotalamik alanlara; PVN, DMN ve LHA projeksiyon yapar (Rossi ve ark. 1998; Arora 2006). Hipotalamik nöronlardaki α -MSH reseptörü MC4R hem agonistik hem de antagonistik sinyaller alır. POMK'den türetilen α -MSH, bu reseptörleri uyararak besin alımını azaltır ve kilo kaybına neden olur (Flier 2006).

AgRP, POMK ürünü olan α -MSH reseptörleri MC3R ve MC4R'ye bağlanarak α -MSH anoreksijenik aktivitesini inhibe etmede rol alır (Fong ve ark., 1997; Yang ve ark., 1999). AgRP enerji homeostazisinin düzenlenmesinde ve iştahı artırmada görev alır. Besin alımı ve besin arama davranışında AgRP hipotalamusta önemli işleve sahiptir (Flier, 2006). NPY besin alımındaki artışa kısa süreli etki gösterirken, AgRP'nin bir haftayı geçen sürede artışa neden olduğu görülmüştür (Schwartz ve ark., 2000). AgRP'nin sıçanlarda yüksek yağ içeren besin alımının, düşük yağ içeren besin alımına göre daha fazla etkisinin olduğu gösterilmiştir. Besin alımını artırıcı etkisinin yanısıra besin seçiminde de etkisinin olduğu görülmüştür (Ghilardi ve ark., 1996).

2.7.3. Ghrelin

Ghrelin, ilk kez 1999'da Kojima ve arkadaşları tarafından büyüme hormonu salgılatıcı reseptörün (GHSR) endojen ligandı olarak bulunmuştur. Mide mukozasında bulunan oksintik hücreler tarafından sentezlenen 28 amino asitli oreksijenik bir peptittir (Kojima ve ark., 1999). En yüksek ghrelin salınımı midede meydana gelse de ghrelin üreten hücreler aynı zamanda pankreas adacıklarında da mevcuttur. Burada ghrelin, glukagon ve insülin salınımını modüle eder (Müller ve ark., 2015). Mide mukozasından sentezlenen ghrelin, kan dolaşımı ile ARN'ye ve beynin diğer kısımlarına aktif transport ile kan-beyin bariyerini geçerek iştahı etkilemektedir. Aynı zamanda ghrelin hipotalamusta da sentezlenmekte ve direkt olarak ARN'deki NPY/AgRP ve diğer hücreleri uyarmaktadır (Kojima ve ark., 2005).

Ghrelin büyüme hormonu salınımını uyararak enerji homeostazisini düzenlemede görev alır. Açlık ve kalori kısıtlaması sırasında, besin alımını ve yağ depolamasını artırmak ve kan glikoz seviyesinde hayati risk taşıyan düşüşleri önlemek için plazmadaki ghrelin seviyeleri yükselir. Plazma ghrelin düzeyleri yemek sonrası ve obezite gibi enerji fazlası durumlarında

düŒer. Ghrelin, iŒtah ve enerji homeostazisinin düzenlenmesinde önemli rol oynar. Ghrelin bu iŒlevleri, iŒtahı düzenleyen nöronlarda ve endokrin pankreas dahil periferik metabolik organlarda ghrelin reseptörü GHS-R'ye bağlanarak gerçekleştirir (Bader ve ark., 2016). Bu iŒtah artırıcı etkisini ARN'de bulunan NPY/AgRP aracılığı ile gerçekleŒtirmektedir. ARN'den türevlenen ghrelin AgRP/NPY nöronlarını uyararak iŒtah ve vücut ağırlığında artışa neden olur (Elias ve ark., 1999).

2.7.4. Oreksin A ve oreksin B

1998 yılında tanımlanan OXA ve OXB pre-prooreksin adlı tekli öncü polipeptitten üretilmektedir. İnsanlarda pre-prooreksin geni 17q21 kromozomu üzerine yerleŒmiştir. OXA 33 amino asit OXB ise 28 amino asit içermektedir (Hungs ve Mignot, 2001). Oreksinler G protein eşlenik OX1R ve OX2R adlı reseptörleri aktive ederek etkilerini gösterir (Arora 2006; Nicholls ve ark., 2012). OXA'nın OX1R reseptörü ile, OXB'nin ise OX2R reseptörü ile daha iyi bağlandığı gösterilmiştir. OX1R ve OX2R reseptörlerinin beyinde farklı yerleŒim yerleri vardır. Sıçanlarda OX2R PVN'de OX1R ise daha çok hipotalamusta bulunur. Çalışmalar bağırsak ve hipofiz bezinde de oreksin reseptörlerinin bulunduğunu hatta OX1R'in kahverengi yağ dokusunda, OX2R'nin adrenal medullada bulunduğunu göstermiştir (Hungs ve Mignot, 2001; Smart ve Jerman, 2002).

Oreksin nöronları beynin çeŒitli bölgelerinde yer almaktadır. Daha çok LHA, perifornikal hipotalamus, ARN ve PVN'de bulunur. Bunların dışında serebral kortekste, hipotalamusun mediyal yapılarında, limbik sistem ve beyin sapında da görölmektedir (Date ve ark., 1999).

Oreksin nöronlarının çoğunda leptin reseptörü bulunmaktadır. Dolayısıyla plazma leptin seviyesinin oreksin nöronları tarafından düzenlenebileceği düşünölmektedir. Oreksin immünoreaktivitesi insan pankreasında insölin üreten hücrelerde tespit edilmiştir. OXA'nın izole edilmiş adacıklardan glikoz tarafından stimöle edilen insölin salınımını azalttığı gözlemlenmiştir. Leptine benzer şekilde oreksin nöronlarının belirli bir kısmı insöline bağlı hipoglisemi ile aktive olmaktadır. Bu durum plazma glikoz seviyesinin de oreksin nöronları tarafından düzenlenebileceğini düşöndürmektedir (Tatar, 2020).

Yapılan elektrofizyolojik bir çalışmada, düşük glikozla veya yüksek glikozla uyarılan glikoza duyarlı nöronlardan bazılarının oreksijenik nöronlarla sinaps yaptığı gösterilmiştir. Ayrıca OXA'nın LHA'daki glikoza duyarlı sinirleri uyardığı, VMN'deki glikoza duyarlı

sinirleri ise baskıladığı gösterilmiştir. Bu nedenle hipogliseminin kısmen, oreksijenik sinirleri aktive ederek besin alımını uyardığı iddia edilmektedir (Gültekin ve Şahin 2005).

2.8. Anoreksijenik Moleküller

2.8.1. Proopiomelanokortin

POMK, enerji metabolizmasında görev alan birçok nöropeptitin öncülüdür. ARN'de POMK/KART nöronlarından salınır. POMK, prohormon konvertaz 1 ve prohormon konvertaz 2 enzimleri ile posttranslasyonel aşamalar geçirerek melanokortin peptitlerini oluşturur. POMK nöronları ARN'de KART nöronları ile birlikte işlev görür ve leptin hormonu tarafından pozitif uyarılır (Cowley ve ark., 2001).

POMK, hipotalamus-hipofiz-adrenal aksıta α -MSH, adrenokortikotropik hormon ve beta-endorfin gibi bir seri hormon yapımında rol alır. Melanokortin anoreksijenik etkisini beyinde MC3R ve MC4R olarak adlandırılan iki reseptörle gösterir (Arora 2006). Bu reseptörler hipotalamusun DMN, LHA, ARN'sinde yoğun olarak bulunur (Roselli-Reh fuss ve ark.,1993).

Melanokortin peptitleri, POMK'den salgılandıktan sonra agonist ligandlar olan melanokortin reseptörleriyle etkileşime girerek vücutta birçok fizyolojik mekanizmada etkili olurlar (Butler ve ark., 2017). Beyinde yüksek oranda üretilen MC3R ve MC4R reseptörleri, diğer reseptörlere göre iştah ve enerji homeostazisinin düzenlenmesinde daha etkin rol üstlenmişlerdir. Yapılan çalışmalara göre enerji ve glikoz homeostazında önemli göreve sahip olan melanokortin reseptörü yardımcı protein 2'nin gen yapılanmasının yokluğu obeziteyle ilişkili bulunmuştur (Anderson ve ark., 2016).

2.8.2. Kokain amfetamin ilişkili peptit

KART 102 amino asitten oluşan anoreksijenik etki gösteren bir nöropeptittir. 1995 yılında sıçan striatumunda keşfedilmiş, ancak daha sonra hipotalamusta yüksek düzeyde eksprese edildiği bulunmuştur (Arora 2006). Spesifik olarak hipotalamusun LHA, ARN, VMN, DMN ve PVN çekirdeğinde bulunan KART, geniş çapta dağılmış bir nöropeptittir ve beynin farklı bölgelerinde eksprese edilir. Bu geniş dağılım, KART'nin beslenme, bağımlılık, stres, anksiyete, doğuştan gelen korku, nörolojik hastalık, nöropatik ağrı, depresyon, osteoporoz, insülin sekresyonu, öğrenme, hafıza, üreme, görme, uykunun düzenlenmesi gibi çeşitli fizyolojik süreçlerde rol oynadığını göstermektedir (Ahmadian ve ark., 2018). Beynin yanı sıra, KART peptitleri hipofiz, bağırsak, adrenal, pankreas, Langerhans adacığı ve diğer

nöroendokrin dokular ile ince bağırsağın düz kas tabakasında, sirküler kasında, miyenterik ganglionlarında ve kalın bağırsağın düz kas tabakasında çok sayıda bulunmaktadır (Arora 2006).

KART hipotalamusta POMK ile birlikte bulunur ve ekspresyonu leptin hormonu ile düzenlenir. Bu peptitin santral uygulanmasının besin alımını önemli düzeyde azalttığı tespit edilmiştir (Kozimor ve ark., 2013). Hipotalamustaki bazı KART nöronlarının NPY nöronları ile sinaps yaptığı belirlenmiştir. Bu sebeple KART'nin vücut ağırlığının düzenlenmesinde rolü olabileceği düşünülmektedir (Gültekin ve ark., 2004).

KART peptidinin potansiyel fizyolojik öneminin anlaşılmasına rağmen tanımlanmış bir reseptörünün bulunmaması sebebiyle kendisinin veya analoglarının terapötik ajanlar halinde kullanılması tam olarak mümkün olmamaktadır (Yosten ve ark., 2021).

2.8.3. Leptin

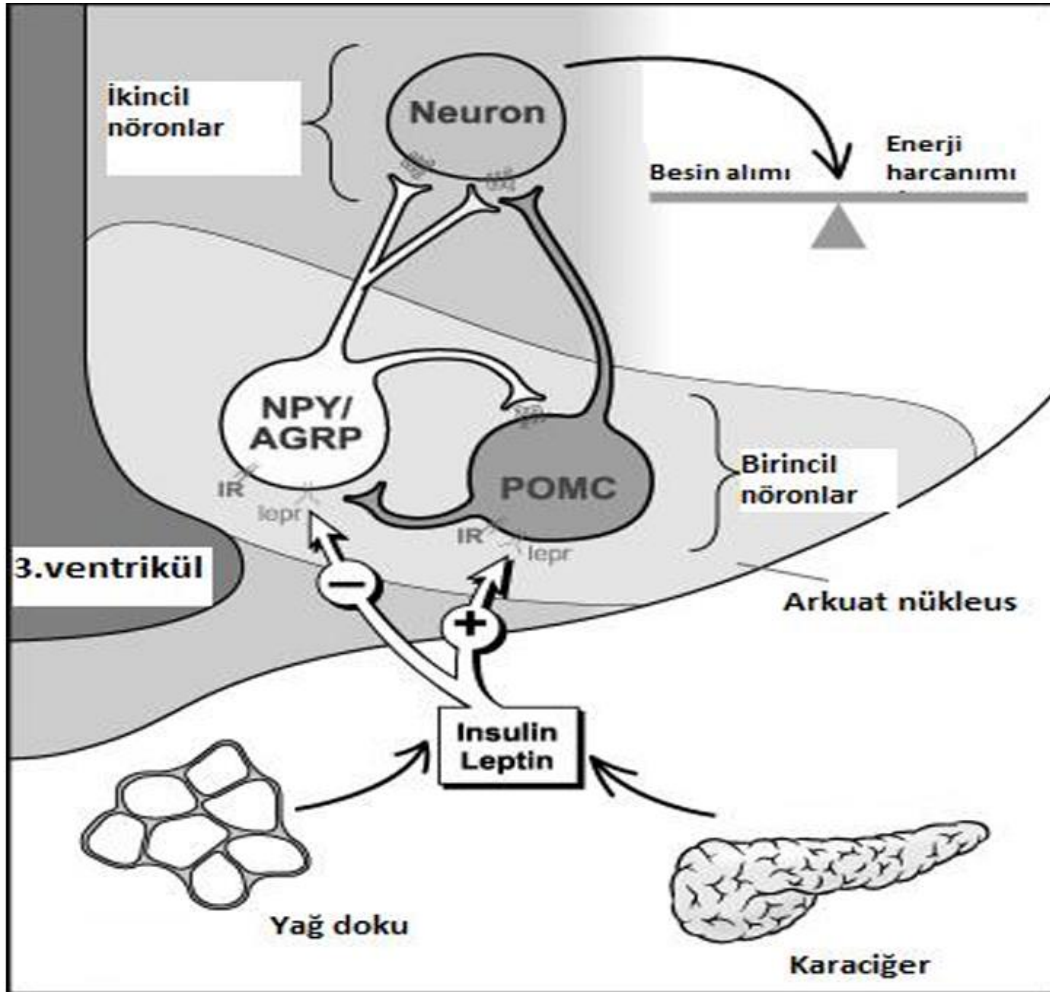
İlk kez 1994 yılında keşfedilen leptin, 16 kilodalton moleküler ağırlığında, tek zincirli 167 amino asitli polipeptit yapıya sahip bir hormondur (Zhang ve ark. 1994). Leptin, başta hipotalamusta olmak üzere, enerji metabolizması, termoregülasyon, üreme ve metabolizma gibi birçok sistemin fonksiyonlarının düzenlenmesinde görev alır (Mercer ve ark., 1996; Meli ve ark., 2004).

Leptinin besin alımı ve vücut enerji dengesini düzenleme görevi için en önemli hedef organ hipotalamustur. Leptin reseptörleri vücut ağırlığı, besin alımı, iştahın düzenlendiği bölge olarak bilinen hipotalamusta belirlenmiştir (Schwartz ve ark., 1996; Elmquist ve ark., 1998). Leptin reseptörünün uzun formu OB-Rb'nin, en çok hipotalamusta ARN, PVN, VMN ve DMN' de bulunması leptinin besin alımı ve enerji dengesinin korunmasında önemli bir faktör olduğunu göstermektedir. Leptin, oreksijenik NPY/AgRP nöronlarını inhibe ederek ve aynı zamanda anoreksijenik POMK/KART nöronlarını uyararak besin alımını azaltır (Strnadová ve ark., 2024).

Leptin eksikliği olan mutasyonlarda hem hayvanlarda hem de insanlarda vücut ağırlığında ileri derecede artış olduğu gözlemlenmiştir. Sıçanlarda ob ve db genlerindeki resesif mutasyonlar obezite ile sonuçlanmıştır (Ingalls ve ark., 1950). Genetik olarak obez fareler (ob/ob) ilk kez 1950 yılında Ingalls ve arkadaşları tarafından bulunmuştur. Bu hayvanlarda 4 haftalıktan itibaren besin alımında ve vücut ağırlığında aşırı artış gözlemlenmiştir. 3. ayda obez

olmayan farelere göre 2 kat daha fazla vücut ağırlığına sahip oldukları görülmüştür (Ingalls ve ark., 1950).

Yapılan bir diğer çalışmada obez olmayan sıçanların dolaşımı obez sıçanlara aktarıldığında, obez sıçanlarda kilo kaybının başladığı fark edilmiştir (Coleman ve ark., 1982). Bu çalışmalar leptinin vücut ağırlığı ve besin alımının düzenlenmesinde birinci derecede etkin rol aldığını göstermektedir.



Şekil 2.3. Leptinin ARN'de besin alımı üzerinde etkisi (Barsh, 2002).

2.9. Opioidler

Opioidler, afyon haşhaşının (*Papaver somniferum*) özünden türetilen doğal bitki alkaloidleriyle ilgili ilaç sınıfıdır. İçerisinde morfin, kodein, tebain, papaverin, narkotin gibi doğal opioidler vardır. Sentetik türevler arasında eroin, fentanil, hidromorfon, metadon, buprenorfin yer alır (Petrocelli ve ark., 2022).

Opioitler son derece güçlü ve etkili analjeziklerdir. Günümüzde yaygın olarak ağrı tedavisinde kullanılmaktadır. İşlevlerini opioit reseptörlerini etkileyerek gösterirler. Bağımlılık yapıcı maddelerdir ve kötüye kullanım potansiyeli yüksektir (Petrocelli ve ark., 2022).

Opioit reseptör antagonistleri (nalokson, naltrekson, nalmeafen), opioitlerin işlevlerini tersine çevirmek için kullanılır ve opioit doz aşımının tedavisinde önemlidir. Uzun süreli opioit kullananlarda sedasyon, solunum depresyonu, bağımlılık, uyku bozukluğu, cinsel işlev bozukluğu ve kabızlık gibi istenmeyen yan etkiler görülebilir. Bu yan etkileri tersine çevirmek için özel opioit antagonistler kullanılır. Bu ajanlar genellikle kan beyin bariyerini geçemeyecek ve opiatların MSS etkilerini tersine çevirmeyecek şekilde modifiye edilmiştir (National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases, 2012).

Opioitlerin inhibisyon etkilerinde üç temel mekanizma vardır. Bu mekanizmalar adenilat siklaz inhibisyonu, hücreye Ca^{2+} girişi azaltılması ve Gi proteini vasıtasıyla hücre dışına K^+ iyonlarının difüzyonudur (Rosenbaum ve ark., 2009).

Opioit antagonistlerin LHA'ya enjeksiyonu sıçanlarda besin alımını inhibe ettiği belirlenmiştir (Ikeda ve ark., 2015). Opioit peptitlerin hipotalamik PVN içine enjeksiyonu besin alımını başlatır ve beslenme davranışında uzamaya yol açar (Leibowitz ve Hoebel. 2004; Lenard ve Berthoud. 2008; Stanley ve ark. 1988). PVN'ye opioit enjeksiyonu yağdan zengin besin alımını özellikle artırmaktadır (Leibowitz ve Hoebel. 2004; Naleid ve ark. 2007).

Tam ve kısmi agonistler:

- Alfentanil
- Buprenorfin
- Butorfanol
- Kodein
- Difenoksilat
- Fentanil
- Eroin
- Hidrokodon
- Hidromorfon
- Levorfanol
- Loperamid
- Meperidin

- Metadon
- Morfin
- Afyon
- Oksikodon
- Oksimorfon
- Pentazosin
- Remifentanil
- Sufentanil
- Tramadol

Opiat antagonistleri:

- Naldmedin
- Nalmefen
- Naloksekol
- Nalokson
- Naltrekson

2.9.1. Opioid peptitler

Endojen opioid peptitler enkefalin, dinorfin, endorfin ve nosiseptin/orfanin FQ olmak üzere dört sınıfa ayrılmaktadır. Moleküler açıdan bakıldığında, her bir opioid peptit bir prepro ve bir proform olarak sentezlenir ve öncül işleminden sonra fonksiyonel peptitler oluştururlar. Tüm peptitler ortak bir amino terminal dizisini, Tyr-Gly-Gly-Phe-(Met/Leu), yani opioid motifini paylaşır. Bu nedenle aynı öncül farklı opioid peptitlerin oluşmasına neden olabilir. Bu peptitler, asetilasyon, glikozilasyon, fosforilasyon ve metilasyon gibi translasyon sonrası hücreye özgü modifikasyonlara uğrar. Bu tür modifikasyonlar, peptit etkinliği ve reseptör afinitesi peptitin fizyolojik eylemlerindeki değişiklikleri belirler (Petrocelli ve ark., 2022)

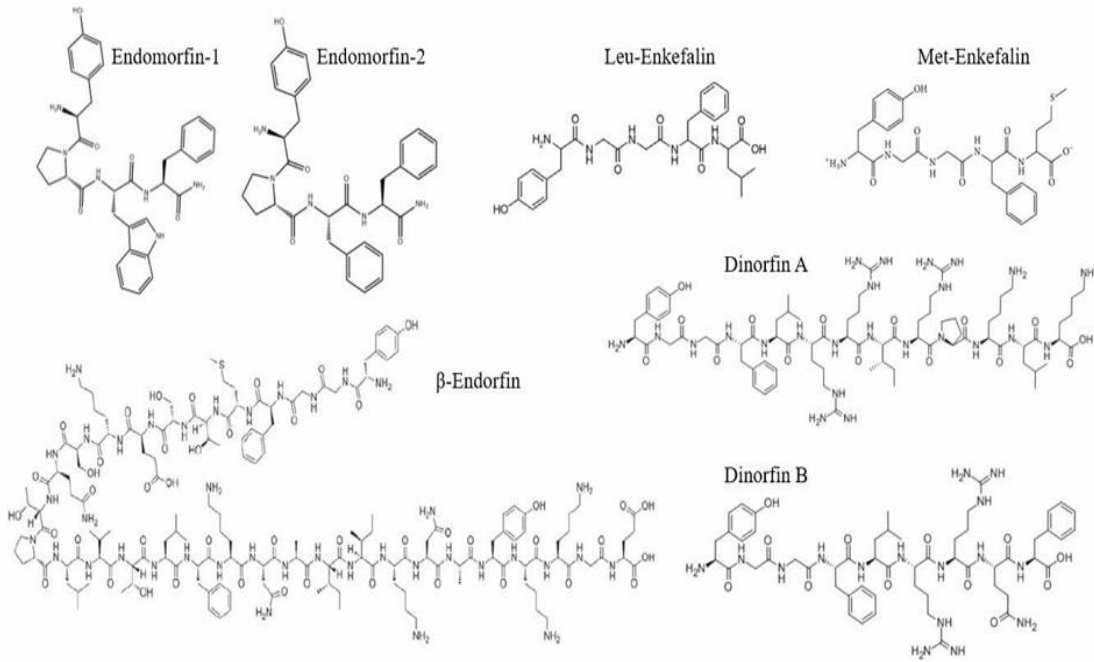
Endojen opioid peptitler proopiomelanokortin sistemi (POMK), Proenkefalin sistemi (PENK), Prodinorfin sistemi (PDN) ve Nosiseptin/Orfanin FQ sistemi (N/OFQ) olarak dört sisteme ayrılırlar:

- POMK sistemi: Bu sistemde β -endorfin ve endomorfınler bulunur. Bu peptitler μ reseptörlerine yüksek afinite gösterirler. β -endorfin 31 amino asitli bir opioid peptittir ve öncül madde olan POMK'nin yıkılması sonucu oluşur.

- PENK sistemi: Bu sistemde Met-enkefalin, lö-enkefalin gibi başlıca enkefalinler bulunmaktadır. Enkefalinler opioit reseptörlerinden δ ve μ reseptörlerine yüksek afinite gösterirler.

- PDN sistemi: Bu grupta dinorfin A, dinorfin B, α -neoendorfin ve β -neoendorfin endojen opioit peptitleri bulunur. κ opioit reseptörüne yüksek afinite gösterirler.

- N/OFQ sistemi: Bu sistemin peptitleri nosiseptin, orfanin-2 ve nosistatindir. N/OFQ reseptörlerine afinitesi vardır ve μ , δ ve κ reseptörlerini etkilemezler.



Şekil 2.4. Endojen opioit peptitlerinin kimyasal yapıları.

2.9.2. Opioit reseptörler ve alt Tipleri

Dört farklı opioit reseptör tipi tanımlanmıştır. Bunlar mü (μ), delta (δ), kapa (κ), nosiseptin/orfanin FQ reseptörleri (NOR/ORL1)'dir. Mü (μ_1 , μ_2 , μ_3), delta (δ_1 , δ_2 , δ_3) ve kapa (κ_1 , κ_2 , κ_3) reseptörleri 3 alt reseptör tipine sahiptir. En yoğun buldukları bölge MSS'dir. Opioit reseptör alt tipleri talamus, pons, omuriliğin arka boynuzu, periakuedüktal gri alan, rostroventral medulla, ventral tegmental alan (VTA), korteks, globus pallidus, hipokampus, amigdala, ventral pallidum, rafe nükleus ve diğer bazı beyin bölgelerinde bulunur. Ayrıca GİS, üreme sistemi, akciğer, karaciğer, kalp gibi periferel organlarda da bulunur. Opioit reseptörler uyarılara yanıt olarak vücutta üretilen endojen peptitler tarafından işlev görürler. Bu

endojen peptitler endorfin, enkefalin ve dinorfindir (Waldhoer ve ark. 2004; Engin ve ark., 2023).

Opioit reseptörleri G protein eşlenik reseptörlerdir (GPBR). İnsan vücudunun çoğu hormona, nörotransmitere ve ilaca verdiği tepkiye aracılık ederler ve duyuşal işlevlerde görme, tat ve koku almada rol oynarlar. Tüm GPBR'ler, hücre içi G proteinlerine bağlanan yedi transmembranlı proteinden oluşurlar. Reseptörlere bağlanan ve hücre içi olarak aktive edilen sinyal yolaklarına göre farklılaşan farklı tipte G proteinleri vardır. Gs proteinine bağlı reseptörlerin, cAMP üretimini artıran adenilat siklaz molekülünü aktive etmeleri nedeniyle uyarıcı olduğu düşünölmektedir. cAMP molekülü, çok sayıda proteinin, iyon kanalının ve enzimin fosforilasyonundan sorumludur ve bunların aktivasyonu/inhibisyonu ile sonuçlanan Protein Kinaz A'yı aktive eder (Dhaliwal ve ark., 2023).

μ opioit reseptörleri (MOR), adını yüksek afinite ile bağlanan morfinden alır. Bu reseptörler G protein eşlenikli olduklarından agonist varlığında hızla desensitizasyona ve internalizasyona uğrarlar. MOR μ 1, μ 2, μ 3 alt türlere sahiptir. Yoğun olarak beyin sapı, medial talamus ve amigdalada bulunmaktadır. MOR reseptörleri aktive edildiğinde fiziksel bağımlılık, öfori, analjezi, solunum depresyonu, sedasyon, gastrointestinal hareketlilikte azalma ve miyozis gibi etkiler ortaya çıkar (Kayaalp 2012; Engin ve ark., 2023).

MOR'nin bloke edilmesi sıçanlarda self administration davranışını azaltmıştır. MOR geni silinmiş sıçanlarda opioit ilaçların analjezik ve keyif verici etkisi gözlemlenmemiştir (Negus ve ark., 1993; Matthes ve ark., 1996).

Beynin ödöl merkezi, mezolimbik dopamin sistemi içindeki ventral striatuma projeksiyonlar gönderen VTA'dan oluşur. MOR uyarımı, GABA sekresyonunun inhibisyonu yoluyla dopamin salınımıyla sonuçlanır. Dopamin, opioit uygulamasının ürettiği ödüllendirici etkilerden sorumludur ve pozitif pekiştirmeye yol açar (Dhaliwal ve ark., 2023).

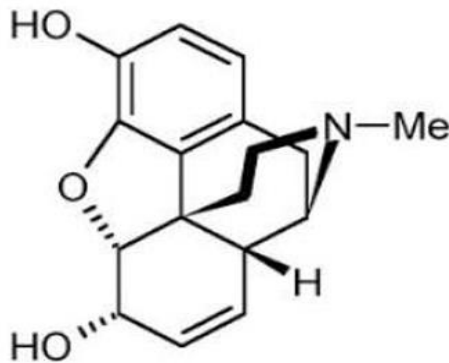
κ reseptörü (KOR) adını agonistik etki yapan ketosiklazosinden alır. Yoğun olarak limbik bölgede ve beyin sapıyla omurilikte bulunur (Trescot ve ark., 2008). Dinorfin A ve dinorfin B, bu reseptöre bağlanarak aktive eden endojen opioit peptitlerdendir. KOR reseptörleri; spinal analjezi, sedasyon, nefes darlığı, bağımlılık, disfori ve solunum depresyonu gibi durumlardan sorumludur. Agonistleri kronik ve şiddetli ağrı tedavisinde kullanılırlar (Wadenberg, 2003).

δ reseptörü (DOP) yoğun olarak amigdala, nükleus akümbens ve neokortekste bulunur. Enkefalinlerin bağlanmasıyla aktive olurlar. Morfinin duygudurum üzerine etkilerinde δ reseptörlerinin rol oynadığı düşünülmektedir (Katzung ve ark., 2009). δ reseptör geni silinmiş sıçanlarda analjezi ve yoksunluk sendromu olduğu gözlemlenmiştir.

Nosiseptin/Orfanin FQ, N/OFQ sistemine ait opioit peptitlerin etkilerine aracılık ederler. Beslenme, kardiyovasküler sistem, öğrenme, bellek, ağrı iletilmesi, hafıza, epilepsi/nöbetler, motor aktivite, öksürük, depresyon, anksiyete, ilaç bağımlılığı ve stres düzenlenmesi gibi bilişsel aktivitelerde görev alırlar (Chiou ve ark. 2006; Toll ve ark., 2016).

2.9.3. Morfin

Morfin, papaver somniferum ismi ile bilinen afyon (opiyum) haşhaş bitkisinin olgunlaşmamış kapsülünün çizilmesi ile ortaya çıkan rohopium özütünden elde edilen doğal bir alkaloiddir. Morfin sözcüğü Yunan mitolojisinde uyku tanrısı olarak bilinen Morpheus adından türetilmiştir (Sverrisdóttir ve ark. 2015). Geçmişten günümüze ağrı kesici ve keyif verici madde olarak kullanımı yaygındır. Morfin alkaloidi şiddetli ve kronik ağrılarda hala en etkili ve en sık kullanılan analjezik maddedir (Yaluğ ve ark. 2008). Analjezik etkisi nedeniyle sıklıkla kullanılan morfin, tekrarlayan kullanımlarında bağımlılığa neden olabilmektedir. Bu özelliğiyle morfin, deneysel opioit bağımlılık modellemelerini konu alan çalışmalarda oldukça yaygın olarak kullanılmaktadır (Grenald ve ark., 2014; Kim ve ark., 2016).

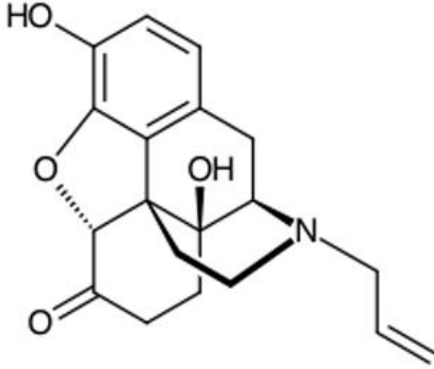


Şekil 2.5. Morfin molekülünün kimyasal yapısı.

2.9.4. Nalokson

Nalokson, opioit reseptörlerinin antagonistidir ve oksimorfonun sentetik bir N-alil türevidir. Özellikle μ opioit reseptörüne karşı yüksek afiniteye sahiptir ve morfin ve diğer agonistlerin yerini alarak etkilerini tersine çevirir. Nalokson, opioit bağımlısı kişilerde hızla

yoksunluk semptomlarının başlamasına neden olur ve genellikle acil servislerde opioit doz aşımının neden olduğu solunum depresyonunu tedavi etmek veya ameliyat sonrası opioit anestezi etkilerini tersine çevirmek için kullanılır (National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases, 2020).



Şekil 2.6. Naloksonun kimyasal formülü

2.9.4. Opioit bağımlılığı

Opioit bağımlılığı Dünya Sağlık Örgütü'nün (DSÖ) tanımına göre “Opioit bağımlılığı, tekrarlayıcı opioit kullanımı sonucu oluşan, opioit alımı için güçlü, karşı konulamaz istek; tolerans gelişimi, fiziksel yoksunluk durumu, opioit kullanımından dolayı sosyal aktivite ve yükümlülüklerin ihmal edilmesi, zararlı sonuçlarının apaçık görülmesine ve kullanım zorluklarına rağmen kullanımına devam etme belirtileri ile karakterize, davranışsal, bilişsel ve fizyolojik olaylar bütünüdür.” (DSÖ, Guidelines for the Psychosocially Assisted Pharmacological Treatment of Opioit Dependence, 2009).

Opioit madde kullanan bireylerin genel olarak enerjileri düşük, iş ve sosyal aktivitelerle ilgilenmediği, yorgun göründükleri, iştahlarında değişiklikler olduğu, kendi tavırlarından farklı davrandıkları, ileri düzeyde miyozis, yüz ve boyunda flashing ile ani kaşıntılar, konsantrasyon eksikliği azalmalar, mental değişiklikler, odaklanamama gibi durumlar göze çarpmaktadır (Kılıç, 2017).

Opioitler hem akut hem de kronik ağrı tedavisinde kullanılan en etkili maddelerdir. Ancak kullanım sırasında bağımlılık, tolerans, bırakıldığında ise yoksunluk sendromunu gelişmesine yol açmaktadır (Koob ve Le Moal, 2006). Etkilerini μ , κ ve δ reseptörlerini uyararak gösterirler. Bu reseptörlerin uyarılması sonucunda analjezi, sedasyon, öfori, diürez,

konstipasyon ve solunum depresyonu gibi bulgular görülebilmektedir. Yapılan araştırmalarda morfin ve diğer opioitlerin yan etkilerini özellikle μ reseptörlerine bağlanarak gösterdikleri anlaşılmıştır (Bender ve ark., 2013).

Opioit bağımlılığının gelişiminde mezokortikolimbik sistem kritik öneme sahiptir. VTA'dan başlayıp, NAc ve medial prefrontal kortekse projeksiyon yapan dopaminerjik nörotransmisyonun, opioit maddelerin pekiştirilmesinde temel rol oynadığı gösterilmiştir (Gang ve ark., 2012).

3.GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Hayvan Deneyleri

Projemiz Necmettin Erbakan Üniversitesi KONÜDAM Deneysel Tıp Uygulama ve Araştırma Merkezi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nda değerlendirilerek onaylanmıştır. Deneysel çalışmalar N.E.Ü. Deneysel Tıp Uygulama ve Araştırma Merkezi (KONÜDAM) laboratuvarlarında gerçekleştirilmiştir. Projede opioit bağımlılığı modeli olarak morfin bağımlılığı oluşturulmuştur. Deneylerde 300-350 gr ağırlığında yetişkin 48 adet erkek Wistar ırkı sıçan kullanılmıştır. Sıçanlar 22±1 oda sıcaklığında, 12 saat aydınlık 12 saat karanlık döngü olacak şekilde barındırılmıştır. Standart sıçan yemi ve musluk suyuyla beslenmişlerdir. Bağımlılık modeli oluşturulması amacıyla 5 gün boyunca her gün sabah 09.00-10.00 arasında morfin uygulamaları yapılmıştır.

3.1.1. Morfin bağımlılığı ve morfin çekilmesi uygulama aşamaları

Morfin yoksunluğu oluşturmak amacıyla nalokson uygulanmasından sonra sıçanların davranışları kaydedilmiş ve bulgular gözlemlenip skorlanmıştır. Morfin çekilmesinin davranışsal olarak belirgin bulgular oluşturması, uyguladığımız bağımlılık modelinin doğru olduğunun göstergesi olarak kabul edilmiştir (Akbarian ve ark. 2001; Ozawa ve ark. 2001; Chen ve ark. 2014). 1978'de Gellert ve Holtzman tarafından bulunan bu yöntem günümüzde de etkin bir model olarak kullanılmaktadır. Akriba olmamak kaydı ile rastgele seçilen sıçanlar kontrol, morfin, nalokson ve morfin + nalokson olmak üzere dört gruba ayrılmıştır. Morfin ve morfin + nalokson gruplarındaki sıçanlara 5 gün boyunca 10 mg/kg/gün dozunda morfin subkutan yolla enjekte edilmiştir. Morfin bağımlılığının olup olmadığı, 5. gün intraperitoneal 3 mg/kg doz nalokson uygulanarak yoksunluk bulgularının görülmesi ile belirlenmiştir.

1. Kontrol grubu (K): Sıçanlara her gün %0,9'luk NaCl 10 mg/kg/gün dozunda 5 gün süresince deri altı yolla uygulanmıştır. 5. gün sabah tekrar 10 mg/kg/gün dozunda %0,9'luk NaCl uygulanmış ve 1,5 saat sonra bir doz daha subkutan olarak %0,9'luk NaCl enjeksiyonu yapılmıştır. Sıçanlar davranışsal olarak gözlemlenmiştir.

2. Morfin bağımlılığı grubu (M): Sıçanlara 10 mg/kg/gün dozunda 5 gün süresince morfin deri altı yolla uygulanmıştır. 5. gün sabah tekrar 10 mg/kg/gün dozunda morfin uygulanmış ve 1,5 saat sonra subkutan olarak tek doz %0,9'luk NaCl uygulanmıştır. Sıçanlar davranışsal olarak gözlemlenmiştir.

3. Morfin bağımlılığı + nalokson grubu (M+N): Sıçanlara 10 mg/kg/gün dozunda 5 gün süresince morfin subkutan yolla uygulanmıştır. 5. gün sabah tekrar 10 mg/kg/gün dozunda morfin ve 1,5 saat sonra subkutan olarak 3 mg/kg doz nalokson uygulanmıştır. Yoksunluk bulguları davranışsal olarak gözlemlenmiştir.

4. Nalokson grubu (N): Sıçanlara her gün %0,9'luk NaCl 10 mg/kg/gün dozunda 5 gün süresince deri altı yolla uygulanmıştır. 5. gün sabah tekrar 10 mg/kg/gün dozunda %0,9'luk NaCl uygulanmış, 1,5 saat sonra 3 mg/kg dozunda nalokson subkutan yolla enjekte edilmiştir. Sıçanlar davranışsal olarak gözlemlenmiştir.

Bütün hayvanlar enjeksiyonlardan hemen sonra 25X65 cm ebatlarında pleksiglas şeffaf silindir gözlem kafeslerine alınmışlardır ve hayvanların davranışları izlenmiştir. Gözlem öncesi ve sonrası hayvanlar tartılmış ve % olarak ağırlık değişim oranları hesaplanmıştır. Enjeksiyondan sonra 30 dk boyunca morfin çekilme davranışları Gellert ve Holtzman skalası dikkate alınarak skorlanmıştır. Tüm sıçanlar için çekilme bulguları ve morfin çekilme skoru belirlenmiştir. Morfin bağımlılığı ve çekilme bulgularının model alındığı birçok araştırmada aynı yöntemler kullanılmıştır. (Almela ve ark. 2012; Pintér-Kübler ve ark. 2013; Chen ve ark. 2014; Kaka ve ark. 2014; Raghav ve ark. 2018).

3.1.2. Deneyin sonlandırılması ve dokuların toplanması

Hayvan davranışları 30 dk takip edilip skorlama yapıldıktan hemen sonra tüm sıçanların beyin dokuları hızla çıkarılmıştır. Hipotalamus dokuları diseke edilerek kriyo tüplere konmuş ve sıvı azotta hemen dondurularak gen ekspresyon analizleri için -80 °C'de saklanmıştır.

3.1.3. Doku örneklerinden total RNA izolasyonu

Gen düzeyinde ekspresyon değerlendirilmesi için hipotalamus dokularından TRIzol yöntemi ile RNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Doku örneklerinin homojenizasyon işlemi 1000 µl TRIzol içerisinde gerçekleştirilmiştir. Homojenatlar oda sıcaklığında 5 dk inkübasyona bırakılmış, daha sonra 200 µl kloroform eklenerek ve kısa bir vorteks işleminin ardından tekrar oda sıcaklığında 15 dk inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra örnekler 12000 g'de 15 dk +4 °C'de santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası RNA'yı içeren üst faz yeni ependorf tüplere aktarılmış ve üzerlerine 500 µl izopropanol eklenmiştir. Daha sonra ependorflar birkaç kez alt üst edilmiş ve 10 dk oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası örnekler 10 dk 12000 g'de +4 °C'de santrifüj edilerek oluşan RNA pelletinin dibine çökmesi sağlanmıştır.

Süpernatant kısmı atılıp peletin üzerine 1 ml %75'lik etanol eklendikten sonra ependorflar alt üst edilmiştir. Yıkama işleminin ardından 12000 g'de 10 dk +4 °C'de santrifüj yapılmış ve süpernatant kısım uzaklaştırılmıştır. Oluşan pelet 5-10 dk oda sıcaklığında kurutulduktan sonra 50 µl nükleaz free su ile çözündürülmüştür. Elde edilen RNA örnekleri kullanılıncaya kadar -80 °C'de saklanmıştır.

3.1.4. Total RNA örneklerinin kalite kontrolü

Total RNA örneklerinin konsantrasyonu ve kalitesinin tayini spektrofotometrik ve agaroz jel elektroforez yöntemi ile kontrol edilmiştir. Fenol, protein ve genomik DNA (gDNA) kontaminasyonlarını belirlemek amacıyla nanodrop cihazına 1 µl RNA örneğinden yüklenip, A260/A280 ve A260/230 oranları değerlendirilmiştir. UV ölçümleri A260/A280 için $2\pm 0,1$ ve A260/A230 için 2,0-2,4 arasında olan RNA örnekleri analizlerde kullanılmıştır. 1 µg/10µl konsantrasyonundaki RNA örnekleri kalitesinin belirlenmesi amacıyla %1'lik agaroz jel elektroforez sonrası değerlendirilmiştir. Tüm örneklerin qRT-PZR analizlerinde kullanılabilecek kalitede olduğu tespit edilmiştir.

3.1.5. Total RNA örneklerinin GDNA kontaminasyonunun temizlenmesi

Olası gDNA kontaminasyonunun giderilmesi amacıyla DNase-I (Thermo Scientific; #EN0521) enzim reaksiyonu üretici firmanın talimatlarına göre uygulanmıştır. Bu protokole göre 2 µg total RNA, DNase-I reaksiyon karışımı ile 20 µl total hacime tamamlanmıştır. RNA örnekleri, üzerine 1U/ µl DNase-I enziminden 2 µl konularak 37 °C'de 30 dk bekletilmiştir. Reaksiyon durdurulması amacıyla 2 µl 50 mM EDTA ilave edilerek 65 °C 10 dakika inkübe edilmiştir.

3.1.6. Primer dizaynı

Kantitatif gerçek zamanlı PZR (qRT-PZR) analizinde kullanılan aday ve referans genlerine ait primerler, IDT PrimerQuest (<https://eu.idtdna.com/site>) programı kullanılarak tasarlanmış veya literatürden alınmıştır.

3.1.7. Reverse transkriptaz reaksiyonu

Kalite kontrolü yapılmış olan RNA örneklerinden üretici firmanın (Bio-Rad iScript™ cDNA Synthesis Kit #170-8891, A.B.D.) protokolü kullanılarak cDNA sentezlenmiştir. Kısaca, 1 µg/20µl total RNA'dan tek zincir cDNA üretilmesi için 4 µl 5X iScript reaksiyon karışımı ve

1 µl Reverz Transkriptaz 1 µg RNA üzerine ilave edilmiştir. Ardından reaksiyon karışımı ddH₂O ile 20 µl'ye tamamlanmıştır. Daha sonra 25°C'de 5 dk, 42°C'de 30 dk ve 85°C'de 5 dk protokolü uygulanarak cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen cDNA örnekleri daha sonra kullanılmak üzere -20 °C'de saklanmıştır.

3.1.8. Gerçek zamanlı kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu (qRT-PZR)

Hedef ve referans genlerin ekspresyon kantitasyon analizi, gerçek zamanlı PZR cihazı (Bio-Rad CFX Connect Gerçek Zamanlı PZR Sistemi) kullanılarak yapılmıştır. Reaksiyon için çift iplikli DNA'ya bağlanan bir boya olan SyberGreen kullanılmıştır. Kısaca, 2X SyberGreen master miskten 10 µl, forward primerden 5 pmol, reverse 34 primerden 5 pmol 2 µl cDNA ve toplam hacim 20 µl olacak şekilde ddH₂O ile tamamlanarak polimeraz zincir reaksiyonu gerçekleştirilmiştir. Reaksiyonun ısı profili, +95 °C 10 dk, 40 döngü (95 °C 30 sn, 60 °C 30 sn, 72 °C 30 sn) olacak şekilde ayarlanmıştır. Ayrıca 95 °C 1 dakika ısıtılıp, 55 °C'ye düşürülen ısı 95 °C'ye kadar tekrar kademeli olarak arttırılarak melting curve (erime eğrisi) analizi gerçekleştirilmiştir. Gerçek zamanlı PZR'den elde edilen ürünlerin doğru ürün olduğunu teyit etmek amacıyla ürünler %2'lik agaroz jelde 120 voltta 30 dk yürütülmüş ve gözlenmiştir. Melting curve analizlerinde de tüm PZR ürünlerinin spesifik olduğu ve herhangi bir diğer genom bölgesinin yükseltgenmediği tespit edilmiştir.

3.1.9. İstatiksel metot

Elde edilen tüm veriler Instat İstatistiksel Paket Programı (Instat Graphad Software 8.0.1, San Diego, CA, USA) aracılığı ile analiz edilmiştir. Verilerin normalliğini test etmek için Shapiro-Wilk testi kullanılmıştır. Normal dağılıma sahip veriler tek yönlü ANOVA testiyle, anormal dağılıma sahip veriler ise Kruskal Wallis testleri ile analiz edilmiştir. Gruplar arasındaki post-hoc karşılaştırmalar Tukey ve Dunn testleri ile yapılmıştır. Verilerin tamamlayıcı istatistikleri ortalama ± Ortalamanın standart hatası (SH) olarak verilmiştir. P<0.05 değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

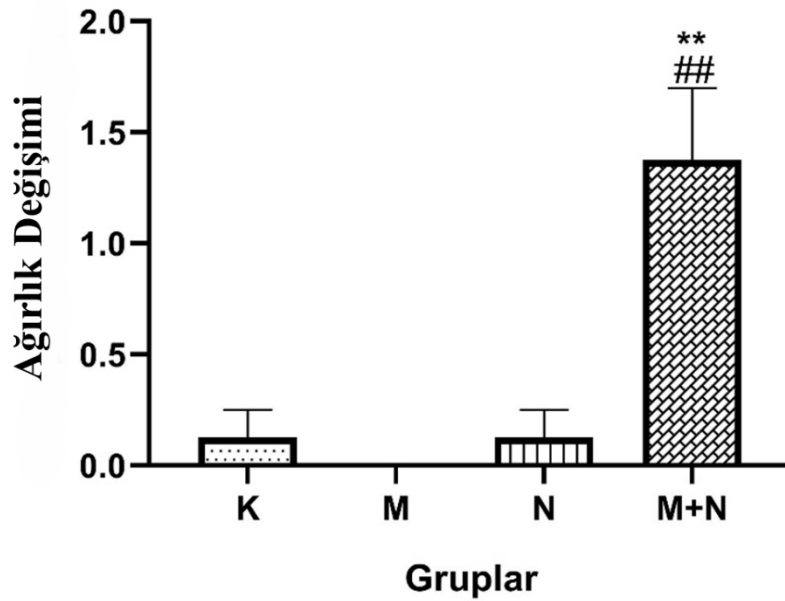
4. BULGULAR

4.1. Davranış Testi Bulguları

Tablo 4.1. Davranış testi bulguları Ortalama±SH değerleri

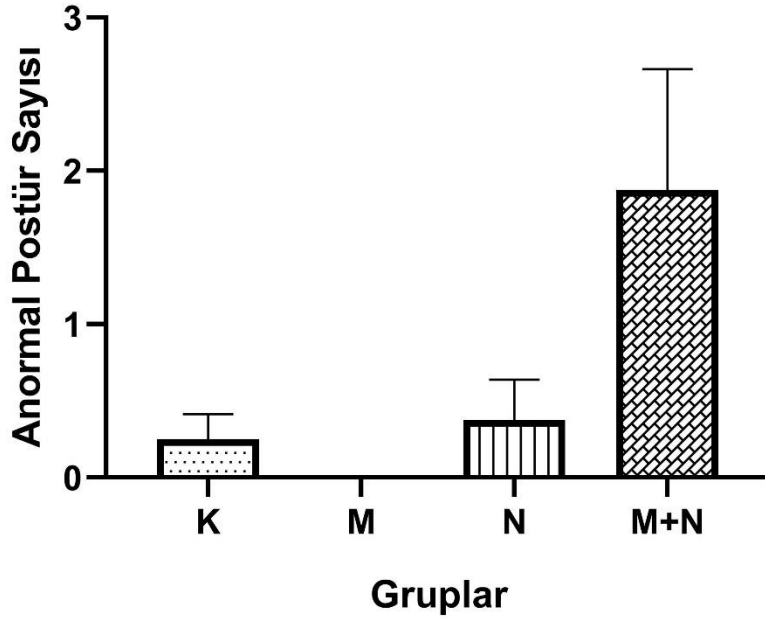
	K	M	N	M+N
Süslenme	3,625±0,565	5,25±1,449	5,625±0,8438	4,125±0,4407
Şahlanma	14,5±2,42	24,63±9,083	12,25±2,194	15,88±1,109
Sıçrama	0,125±0,125	0	0	2,5±1,052
Silkelene	0	0	0,125±0,125	5,25±2,305
Defekasyon	0,875±0,5154	0	0,625±0,3239	3,75±0,5901
Yuvarlanma	0	0	0	0
Anormal Postür	0,25±0,1637	0	0,375±0,2631	1,875±0,7892
Diş Gıcırdatma	0,25±0,1637	0,875±0,875	0,5±0,378	2,625±0,6797
Göz Kısma	4,875±0,9717	0,125±0,125	3,375±0,7055	17,25±3,858
Salya	0	0	0	3,875±1,505
Ağırlık Değişimi	0,125±0,125	0	0,125±0,125	1,375±0,3239
Kifo	0	0	0	1,875±0,4795

Enjeksiyon sonrası hayvanlar yarım saat gözlemlendi ve gruplara göre davranış skorlaması uygulanmıştır.



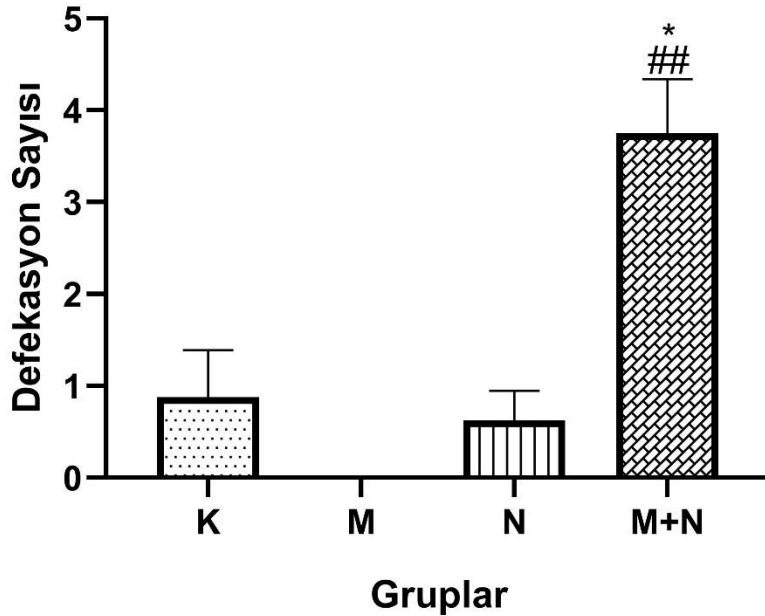
Şekil 4.1. Kontrol (K), Morfin (M), Nalokson (N) ve Morfin+nalokson (M+N) gruplarındaki ağırlık değişimi değerleri. ** $p<0,01$ kontrol grubuyla karşılaştırıldığında, ## $p<0,01$ nalokson grubuyla karşılaştırıldığında tek yönlü varyans analizi kullanılmıştır.

Ağırlık değişimi değerlendirildiğinde M+N grubunun ağırlık kaybının hem K grubu ($p<0,01$) hem de N grubuna ($p<0,01$) kıyasla belirgin olarak yüksek olduğu görüldü (Şekil 4.1.).



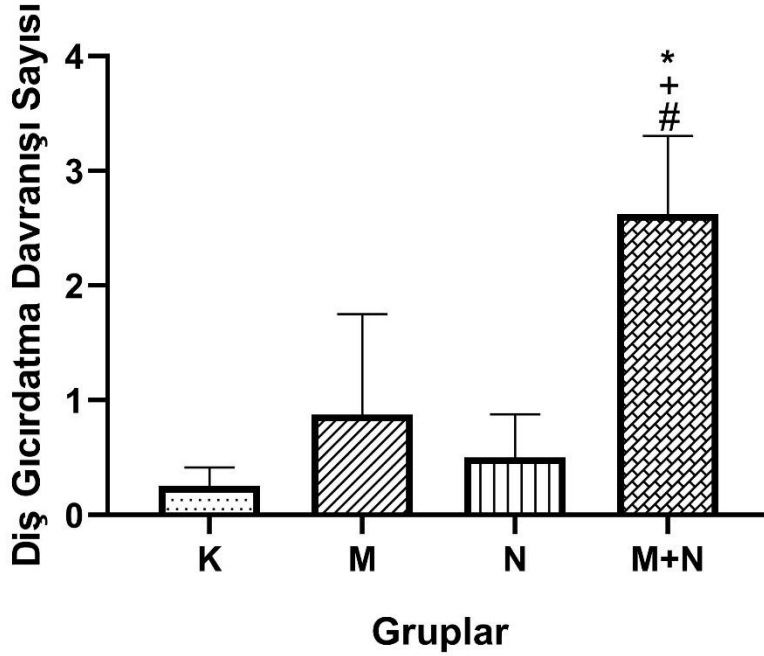
Şekil 4.2. Kontrol (K), Morfin (M), Nalokson (N) ve Morfin+Nalokson (M+N) gruplarındaki anormal postür sayıları. Tek yönlü varyans analizi kullanılmıştır.

Anormal postür sayısı istatistiksel analizi değerlendirildiğinde M+N grubunun diğer gruplara kıyasla anlamlı düzeyde yüksek olduğu görülmüştür.



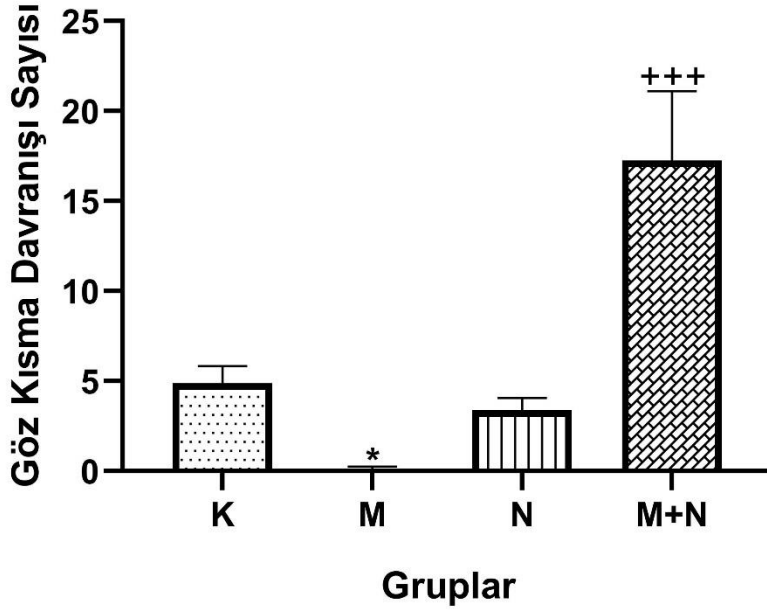
Şekil 4.3. Kontrol (K), Morfin (M), Nalokson (N) ve Morfin+Nalokson (M+N) gruplarındaki defekasyon sayıları. * $p < 0,05$ kontrol grubuyla karşılaştırıldığında, ## $p < 0,01$ nalokson grubuyla karşılaştırıldığında tek yönlü varyans analizi kullanılmıştır.

Defekasyon sayısının istatistiksel analiz sonucu değerlendirildiğinde, M+N grubundaki defekasyon sayısı hem N grubu ($p<0,01$) hem de K grubuyla ($p<0,05$) karşılaştırıldığında anlamlı düzeyde artış görülmüştür (Şekil 4.3.).



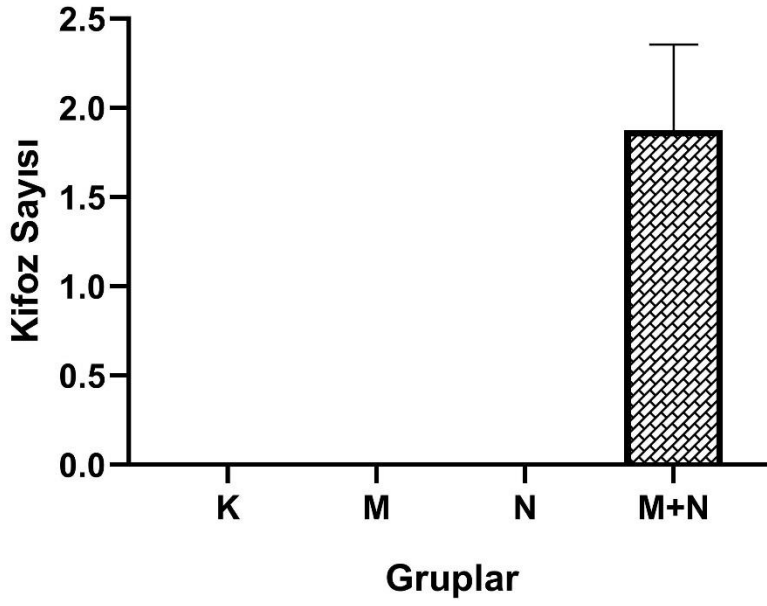
Şekil 4.4. Kontrol (K), Morfin (M), Nalokson (N) ve Morfin+Nalokson (M+N) gruplarındaki dış gıçırdatma davranışı sayıları. * $p<0,05$ kontrol grubuyla karşılaştırıldığında, # $p<0,05$ nalokson grubuyla karşılaştırıldığında, + $p<0,05$ morfin grubuyla karşılaştırıldığında tek yönlü varyans analizi kullanılmıştır.

Diş gıçırdatma sayısı davranış bulguları istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. M+N grubundaki dış gıçırdatma sayısı K grubu ($p<0,05$), M grubu ($p<0,05$) ve N grubu ($p<0,05$) ile karşılaştırıldığında anlamlı düzeyde yüksek olduğu görülmüştür (Şekil 4.4.).



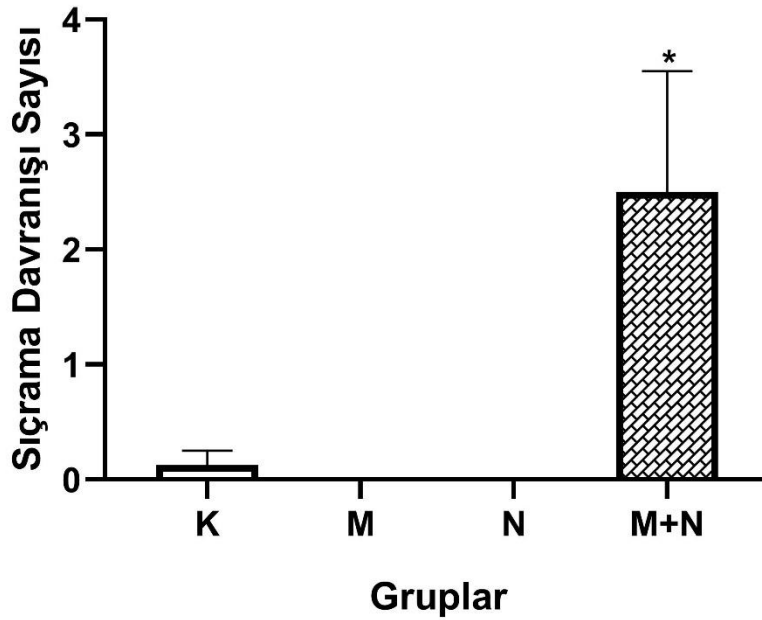
Şekil 4.5. Kontrol (K), Morfin (M), Nalokson (N) ve Morfin+Nalokson (M+N) gruplarındaki göz kısma davranışı sayısı. * $p<0,05$ kontrol grubuyla karşılaştırıldığında, +++ $p<0,001$ morfin grubuyla karşılaştırıldığında tek yönlü varyans analizi kullanılmıştır.

Göz kısma sayısı davranış bulguları istatistiksel olarak incelenmiştir. K grubunda gözlemlenen göz kısma sayısı M grubuyla kıyaslandığında anlamlı düzeyde yüksek olduğu görülmüştür ($p<0,05$). M+N grubunda görülen göz kısma davranışı sayısı M grubu ile karşılaştırıldığında oldukça yüksek düzeyde anlamlı olduğu belirlenmiştir ($p<0,001$).



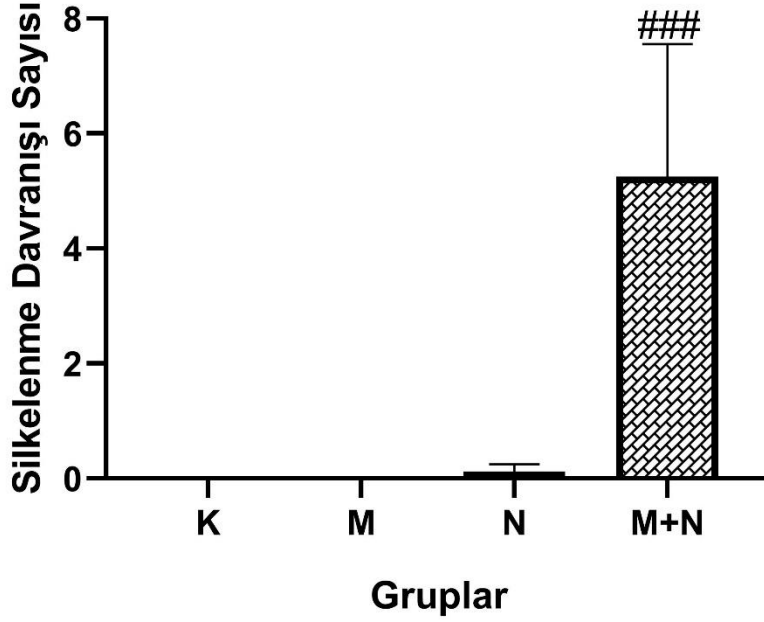
Şekil 4.6. Kontrol (K), Morfin (M), Nalokson (N) ve Morfin+Nalokson (M+N) gruplarındaki kifoş sayısı. Tek yönlü varyans analizi kullanılmıştır.

Kifoş sayısı istatistiksel olarak değerlendirildiğinde M+N grubunda görülen kifoş sayısı diğer gruplar ile karşılaştırıldığında oldukça yüksek olduğu gözlemlendi.



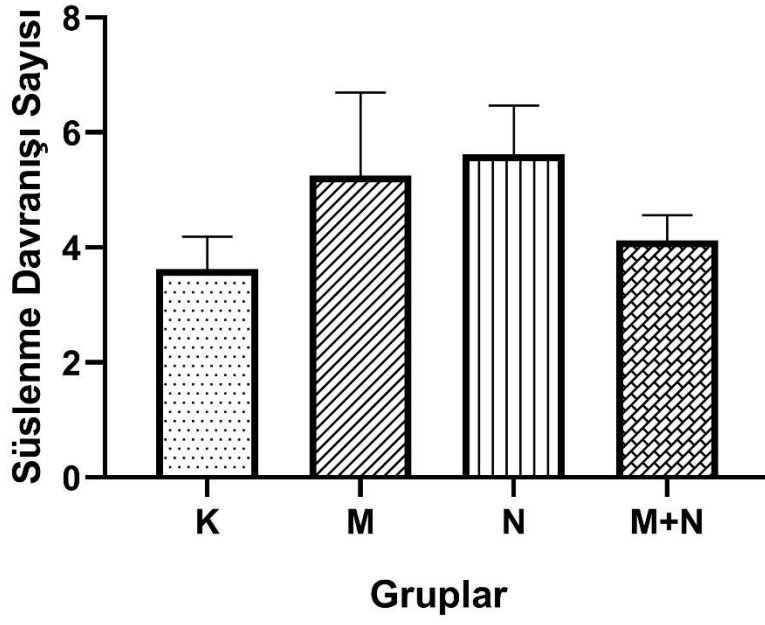
Şekil 4.7. Kontrol (K), Morfin (M), Nalokson (N) ve Morfin+Nalokson (M+N) gruplarındaki sıçrama davranış sayısı. * $p < 0,05$ kontrol grubuyla karşılaştırıldığında tek yönlü varyans analizi kullanılmıştır.

Sıçrama sayısı davranış bulguları istatistiksel olarak incelendiğinde M+N grubunda görülen sıçrama davranışı sayısı diğer gruplarla kıyaslandığında anlamlı şekilde yüksek olduğu görüldü ($p<0,05$).



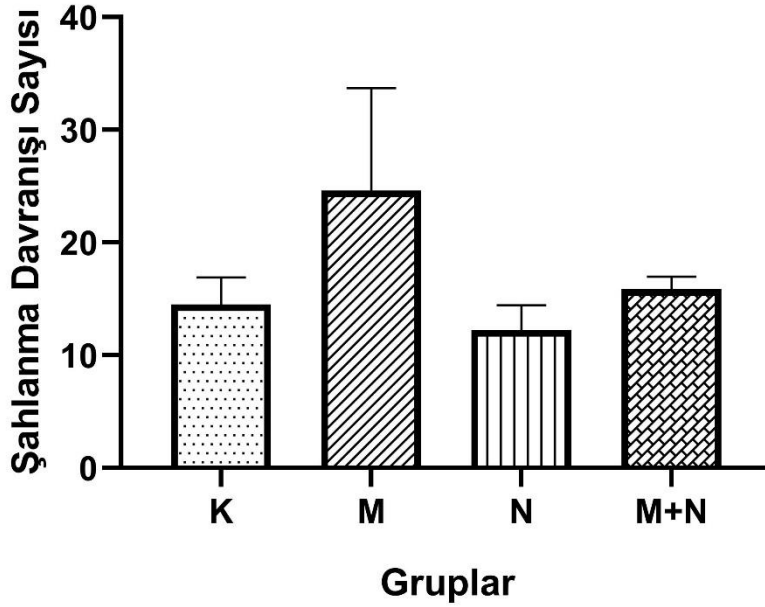
Şekil 4.8. Kontrol (K), Morfin (M), Nalokson (N) ve Morfin+Nalokson (M+N) gruplarındaki silkenme davranış sayısı. ### $p<0,001$ nalokson grubuyla karşılaştırıldığında tek yönlü varyans analizi kullanılmıştır.

Silkenme davranışı sayısı istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. M+N grubunda görülen silkenme davranış sayısı diğer gruplarla kıyaslandığında oldukça anlamlı artış ortaya çıkmıştır ($p<0,001$, Şekil 4.8.).



Şekil 4.9. Kontrol (K), Morfin (M), Nalokson (N) ve Morfin+Nalokson (M+N) gruplarındaki süslenme sayısı. Tek yönlü varyans analizi kullanılmıştır.

Süslenme davranışlarında gruplar arasında anlamlı değişiklik görülmemiştir ($p > 0,05$).



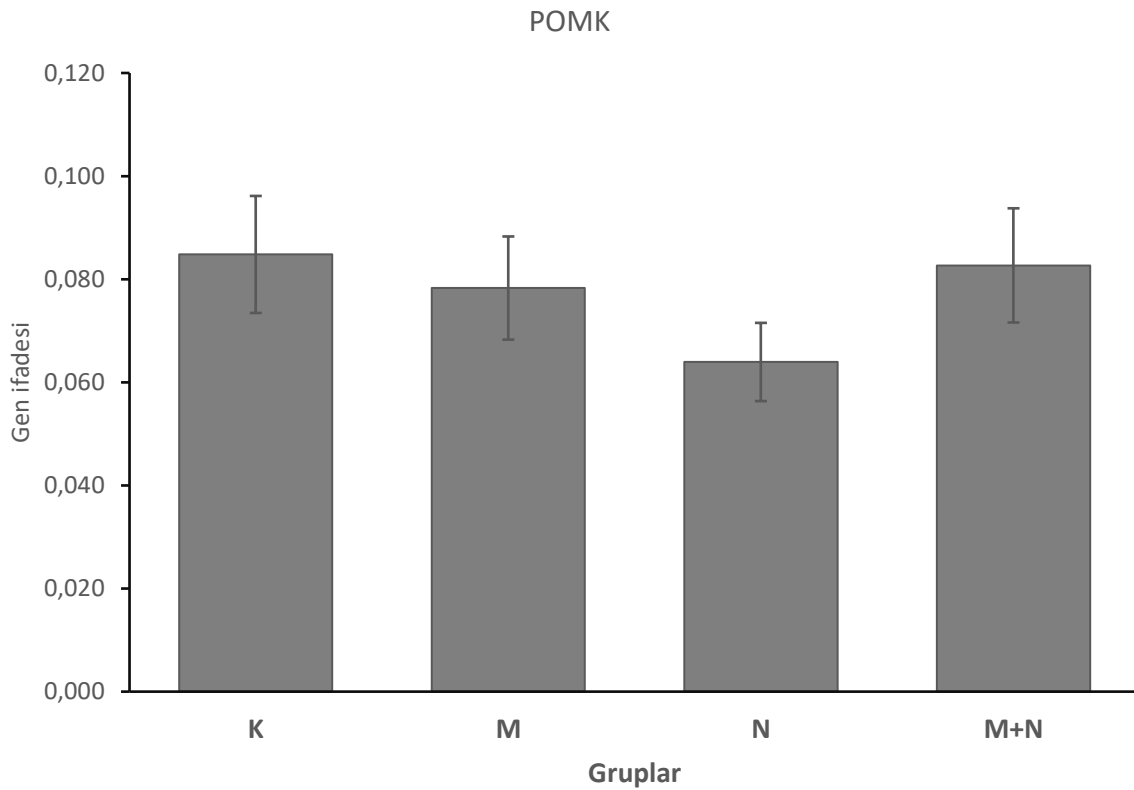
Şekil 4.10. Kontrol (K), Morfin (M), Nalokson (N) ve Morfin+Nalokson (M+N) gruplarındaki şahlanma sayısı. Tek yönlü varyans analizi kullanılmıştır.

Şahlanma davranışı istatistiksel olarak incelendiğinde gruplar arasında anlamlı bir farklılık görülmemiştir ($p>0,05$).

4.2.Gen İfadesi Bulguları

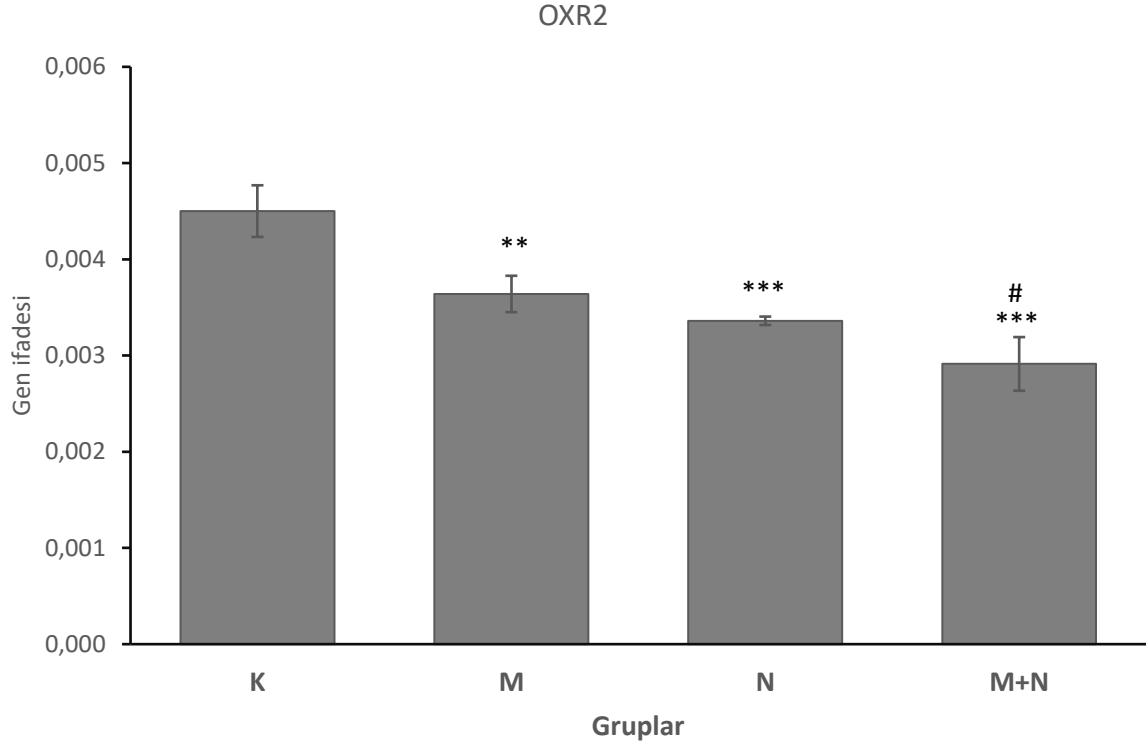
Tablo 4.2. Gen ekspresyon düzeyleri Ortalama±SH değerleri

	K	M	N	M+N
FBN1	0,0131181±0,00087994	0,0107638±,00092252	0,0100852±,00139125	0,0080556±,00077777
ORXA	0,1076207±0,00681897	0,1387700±,01153984	0,0800784±,00779555	0,1325324±,01869132
ORX1	0,0025033±0,00021390	0,0028832±,00036529	0,0019165±,00017498	0,0022601±,00022859
ORX2	0,0045006±0,00026836	0,0036397±,00018896	0,0033606±,00004370	0,0029125±,00027898
AGRP	0,1179827±0,00916539	0,0914508±,01117186	0,1038945±,02803761	0,1505285±,02024075
NPY	0,1806979±0,01184965	0,1975486±,02175501	0,3320569±,04631274	0,2484961±,02945846
POMK	0,0847978±0,01135100	0,0782827±,01000474	0,0639404±,00758626	0,0826757±,01107659
LEPR	0,0086042±0,00114323	0,0059060±,00051817	0,0063611±,00081242	0,0041273±,00045709
APELİN	0,0001±0,00002	0,0001±,00002	0,0001±,00004	0,0002±,00004
APLNR	0,0018776±0,00013914	0,0015352±,00020690	0,0019386±,00031457	0,0011613±,00013795



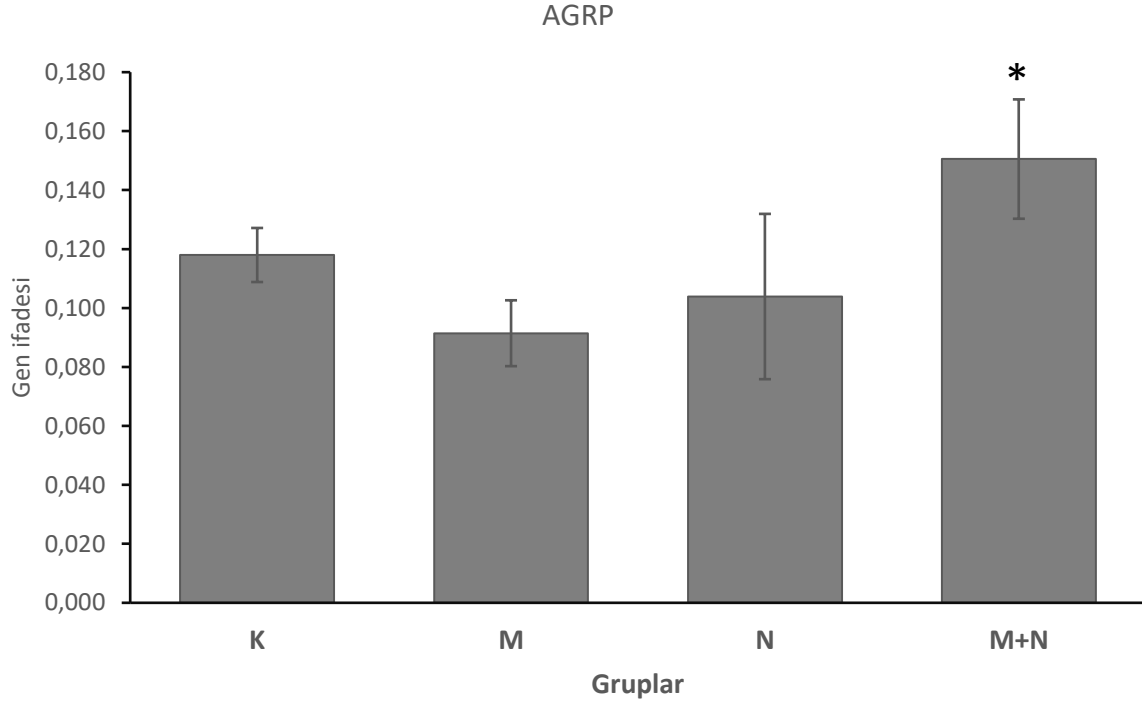
Şekil 4.11. Kontrol (K), Morfin (M), Nalokson (N) ve Morfin+Nalokson (M+N) gruplarına ait hipotalamus dokularında POMK ekspresyon düzeyleri. Tek yönlü varyans analizi kullanılmıştır.

POMK gen ifadesi miktarı olarak incelendiğinde K, M, N ve M+N grupları arasında anlamlı fark bulunmadı ($p>0,05$, Şekil 4.11).



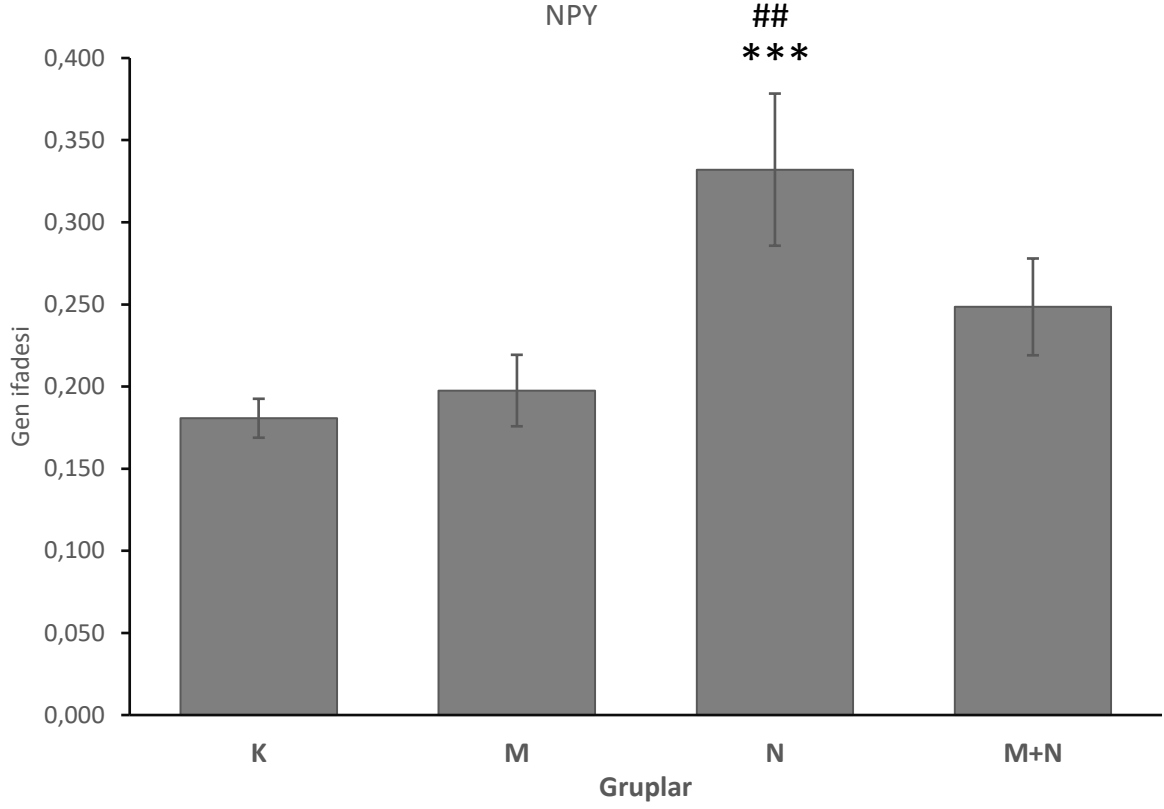
Şekil 4.12. Kontrol (K), Morfin (M), Nalokson (N) ve Morfin+Nalokson (M+N) gruplarına ait hipotalamus dokularında OXR2 ekspresyon düzeyleri. ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$ kontrol grubuyla karşılaştırıldığında. # $p < 0,05$ M grubuyla karşılaştırıldığında tek yönlü varyans analizi kullanılmıştır.

OXR2 gen ifade düzeyleri istatistiksel olarak incelenmiştir ve K grubunda gözlenen gen ifadesi miktarının diğer gruplarla karşılaştırıldığında M grubuna ($p < 0,01$), N grubuna ($p < 0,001$) ve M+N grubuna ($p < 0,001$) kıyasla anlamlı şekilde yüksek olduğu gözlemlendi. M grubunda gözlenen gen ifadesi miktarının M+N grubuna ($p < 0,05$) kıyasla anlamlı şekilde yüksek olduğu gözlemlendi.



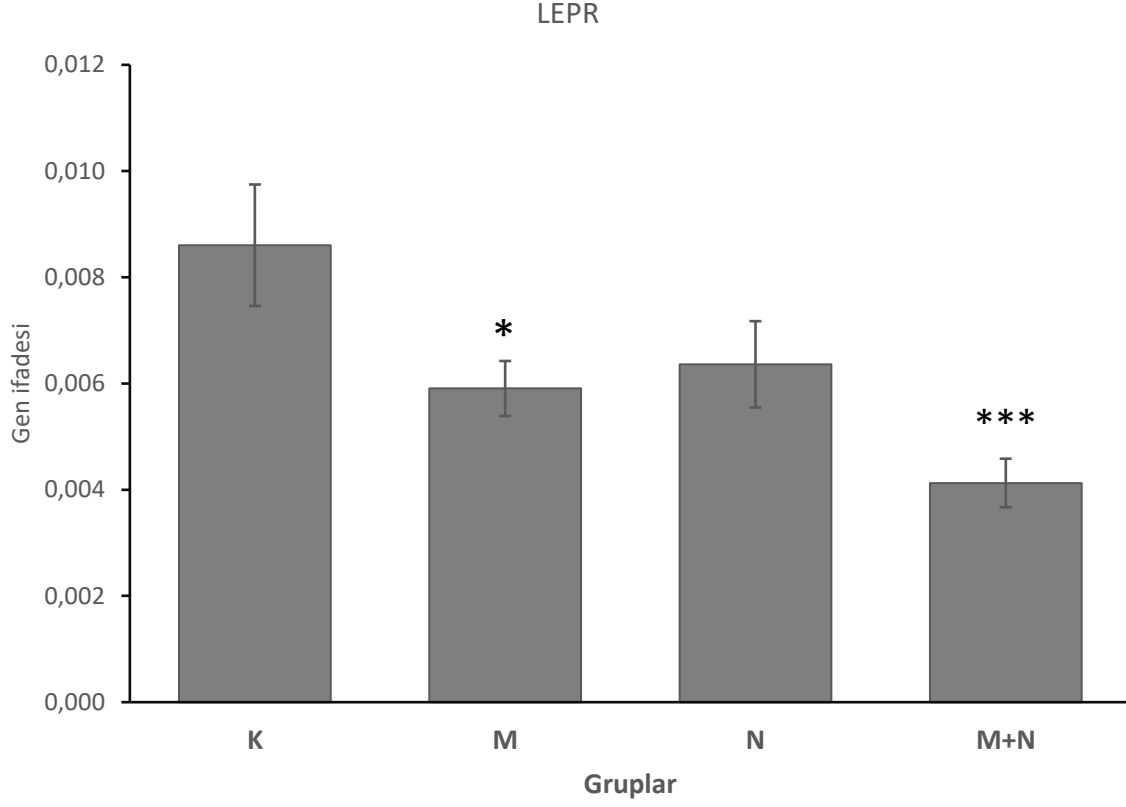
Şekil 4.13. Kontrol (K), Morfin (M), Nalokson (N) ve Morfin+Nalokson (M+N) gruplarına ait hipotalamus dokularında AGRP ekspresyon düzeyleri. * $p < 0,05$ morfin grubuyla karşılaştırıldığında tek yönlü varyans analizi kullanılmıştır.

AgRP gen ifade düzeyleri istatistiksel olarak incelendiğinde M grubuyla karşılaştırıldığında M+N grubu AgRP düzeyinin anlamlı şekilde yüksek olduğu bulunmuştur ($p < 0,05$, Şekil 4.13.).



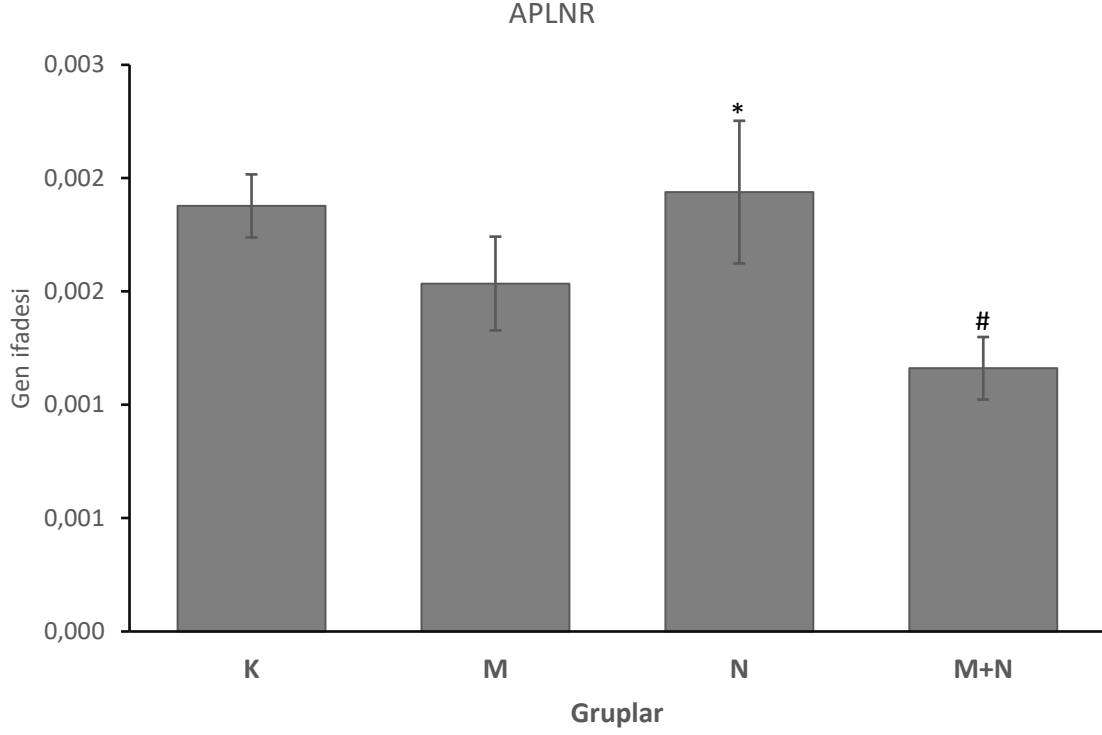
Şekil 4.14. Kontrol (K), Morfin (M), Nalokson (N) ve Morfin+Nalokson (M+N) gruplarına ait hipotalamus dokularında NPY ekspresyon düzeyleri. *** $p < 0,001$ kontrol grubuyla karşılaştırıldığında. ## $p < 0,01$ morfin grubuyla karşılaştırıldığında tek yönlü varyans analizi ile yapılmıştır.

NPY gen ifade düzeyleri istatistiksel olarak incelendiğinde N grubunun K ve M grubuna kıyasla belirgin düzeyde yüksek olduğu gözlemlendi ($p < 0,001$ ve $p < 0,01$ sırasıyla, Şekil 4.14.).



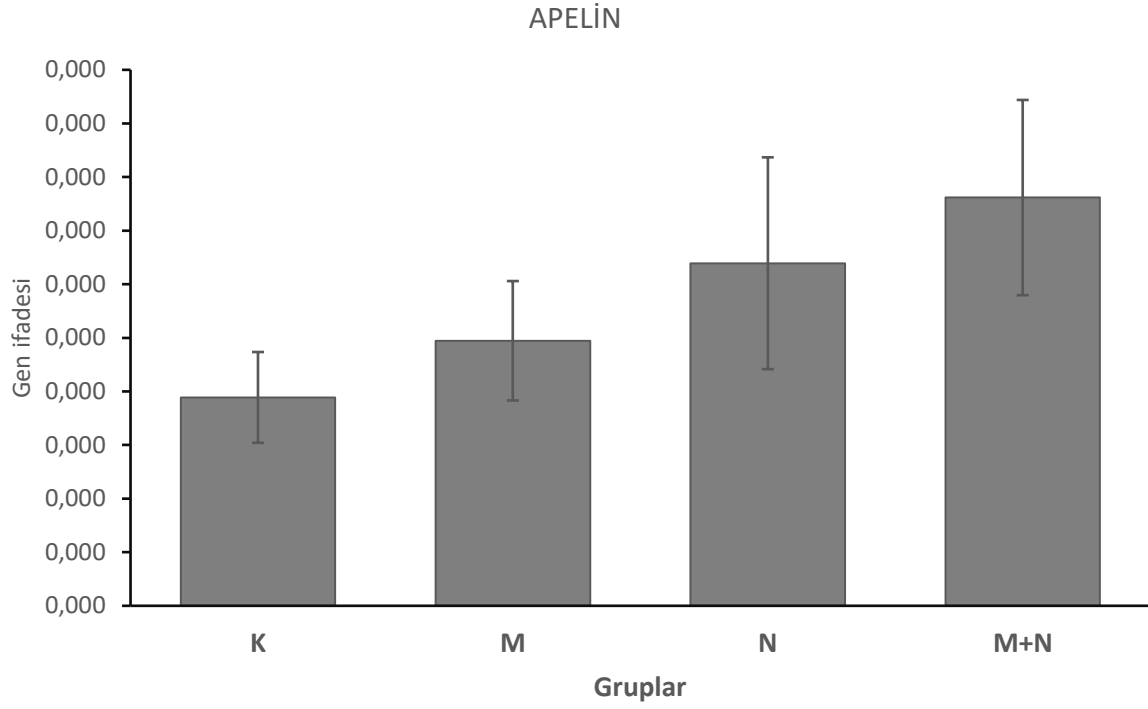
Şekil 4.15. Kontrol (K), Morfin (M), Nalokson (N) ve Morfin+Nalokson (M+N) gruplarına ait hipotalamus dokularında LEPR ekspresyon düzeyleri. * $p<0,05$ *** $p<0,001$ tek yönlü varyans analizi ile yapılmıştır.

LEPR gen ifade düzeyi incelendiğinde K, M, N ve M+N gruplarında LEPR gen ifade düzeyleri değerlendirildiğinde, K grubunda gözlenen gen ifadesi miktarının diğer gruplarla karşılaştırıldığında M grubuna ($p<0,05$) ve M+N grubuna ($p<0,001$) kıyasla anlamlı şekilde yüksek olduğu gözlemlendi (Şekil 4.15.).



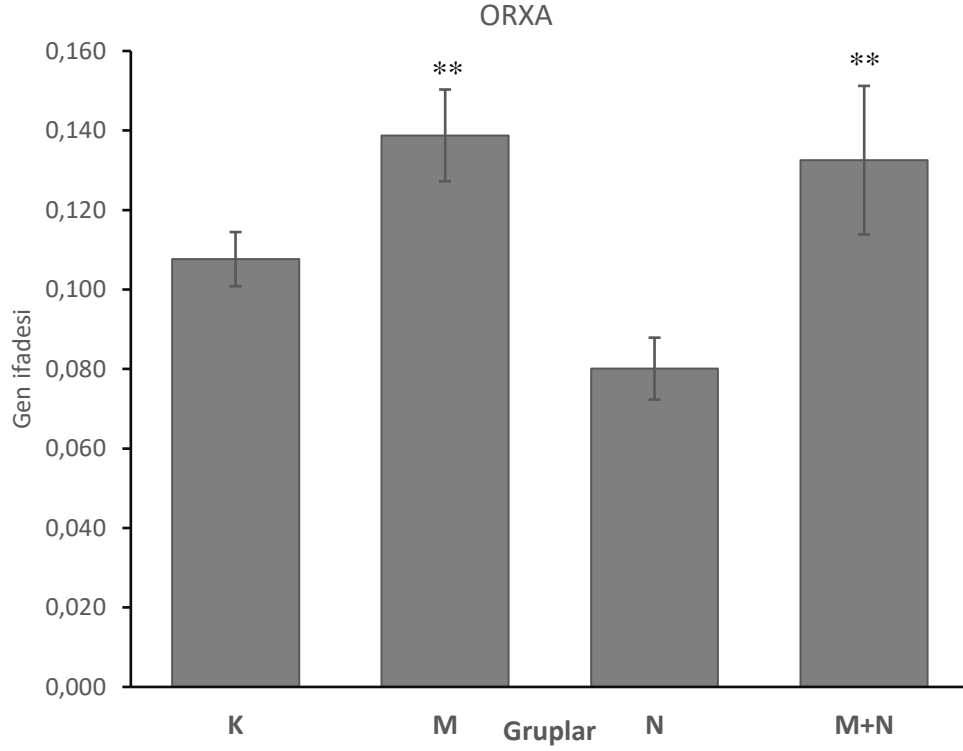
Şekil 4.16. Kontrol (K), Morfin (M), Nalokson (N) ve Morfin+Nalokson (M+N) gruplarına ait hipotalamus dokularında APLNR ekspresyon düzeyleri. * $p<0,05$ kontrol grubuyla kıyaslandığında, # $p<0,05$ nalokson grubuyla kıyaslandığında tek yönlü varyans analizi ile yapılmıştır.

APLNR gen ifadesi düzeyleri istatistiksel olarak incelendiğinde K grubunda gözlenen gen ifadesi miktarının M+N grubuna ($p<0,05$) kıyasla anlamlı şekilde yüksek olduğu gözlemlendi. N grubunda gözlenen gen ifadesi miktarının M+N ($p<0,05$) grubuna kıyasla anlamlı şekilde yüksek olduğu gözlemlendi (Şekil 4.16.).



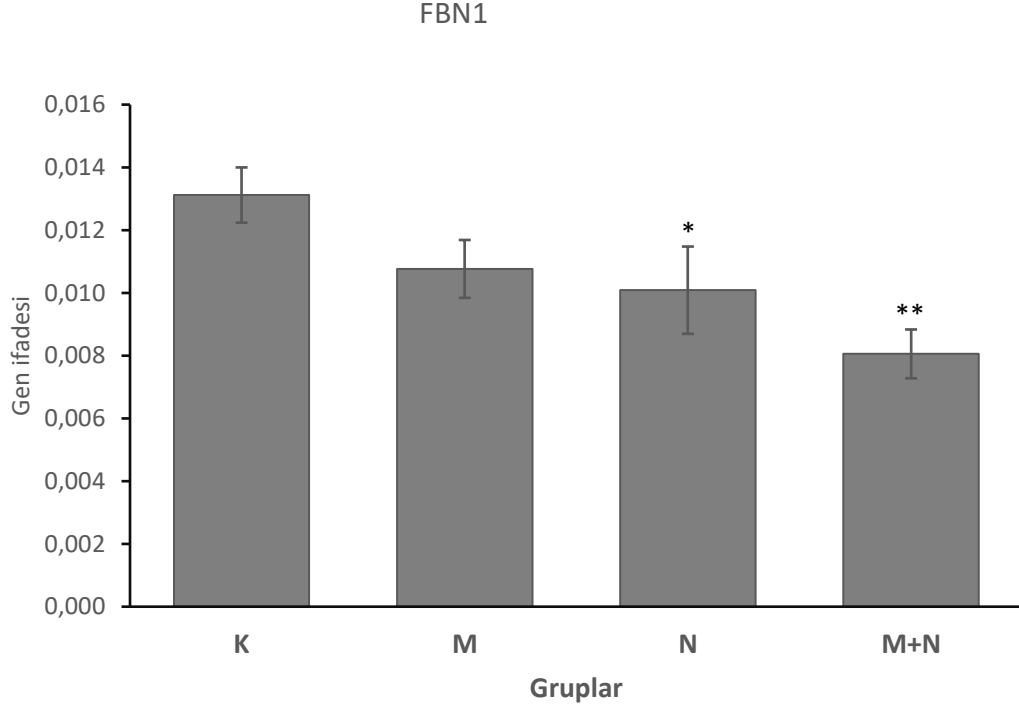
Şekil 4.17. Kontrol (K), Morfin (M), Nalokson (N) ve Morfin+Nalokson (M+N) gruplarına ait hipotalamus dokularında APELİN ekspresyon düzeyleri. Tek yönlü varyans analizi kullanılmıştır.

Apelin gen ifadesi düzeyleri istatistiksel olarak incelendiğinde K, M, N ve M+N grupları arasında anlamlı fark bulunmadı ($p>0,05$, Şekil 4.17.).



Şekil 4.18. Kontrol (K), Morfin (M), Nalokson (N) ve Morfin+Nalokson (M+N) gruplarına ait hipotalamus dokularında ORXA ekspresyon düzeyleri. ** $p<0,01$ nalokson grubuyla karşılaştırıldığında tek yönlü varyans analizi kullanılmıştır.

ORXA gen ifadesi düzeyleri istatistiksel olarak incelendiğinde N grubunda gözlenen gen ifadesi miktarının M grubuna ($p<0,01$) ve M+N grubuna ($p<0,01$) kıyasla anlamlı şekilde düşük olduğu gözlemlendi (Şekil 4.18.).



Şekil 4.19. Kontrol (K), Morfin (M), Nalokson (N) ve Morfin+Nalokson (M+N) gruplarına ait hipotalamus dokularında FBN1 ekspresyon düzeyleri. * $p<0,05$ ** $p<0,01$ kontrol grubuyla karşılaştırıldığında tek yönlü varyans analizi kullanılmıştır.

FBN1 gen ifadesi düzeyleri istatistiksel olarak incelendiğinde K grubunda gözlenen gen ifadesi miktarı diğer gruplarla karşılaştırıldığında N grubuna ($p<0,05$) ve M+N grubuna ($p<0,01$) kıyasla anlamlı şekilde yüksek olduğu gözlemlendi (Şekil 4.19).

5.TARTIŞMA

Besin alımının düzenlenmesi MSS’de periferel sinyaller, duyusal uyarıcılar gibi pek çok girdinin entegrasyonu ile gerçekleşir. İştah ve besin alımı miktarını düzenleyen en önemli sinirsel merkezler hipotalamusta bulunur. Hipotalamusta oreksijenik ve anoreksijenik peptitler uyarılara yanıt oluşturarak besin alımının düzenlenmesine katkıda bulunur. Bu sebeple beslenme davranışı ve besin alımı ile ilgili süreçlerin kontrol edildiği MSS bölümü hipotalamustur (Mayer, 1953).

Hipotalamusta yer alan PVN, VMN, DMN, ARN ve LHA besin alımının merkezi kontrolünde önemli rol oynamaktadır. LHA açlık merkezi olarak görev yaparken, VMN doyumluk hissinin oluşmasında etkili olan tokluk merkezidir (İnsan Fizyolojisi. 2021).

Endojen opioit peptitler, sinir sisteminde başta afektivite, ödül-motivasyon süreçleri ve bellek gibi işlevler yanında, GnRH nöronlarının etkinliği ve oksitosin nöronlarının aktivitesinin düzenlenmesi gibi üreme sisteminin hipotalamik regülasyonunda da rol oynamaktadır. Opioitler için diğer bir hedef aktivite de besin alımının hipotalamik kontrolüdür. Santral opioit sistemin besin alımının düzenlenmesinde önemli etkilere sahip olduğu ileri sürülmektedir (Bodnar, 2007). Hipotalamusta opioit reseptörler yaygın olarak ifade edilmektedir (Mansour ve ark. 1995; Le Merrer ve ark. 2009). Opioit antagonistlerin LHA’ya enjeksiyonun farelerde besin alımını inhibe ettiği belirlenmiştir (Ikeda ve ark. 2015). Opioit peptitlerin hipotalamik PVN içine enjeksiyonu besin alımını başlattığı ve beslenme davranışında uzamaya yol açtığı görülmüştür (Leibowitz ve Hoebel. 2004; Lenard ve Berthoud. 2008; Stanley ve ark. 1988). PVN’ye opioit enjeksiyonu yağdan zengin besin alımını özellikle artırdığı belirlenmiştir (Leibowitz ve Hoebel. 2004; Naleid ve ark. 2007).

Bu çalışmada subkronik morfine maruziyetin hipotalamusta yer alan ve besin alımının düzenlenmesinde rol alan bazı moleküllerin ve reseptörlerin gen ifade düzeyindeki olası değişikliklerin belirlenmesi hedeflenmiştir. Ayrıca morfin uygulanmasıyla oluşan bağımlılık sürecinde nalokson enjeksiyonuyla tetiklenen morfin yoksunluğunun davranışsal olarak ne tür değişiklikler oluşturduğu ve sonuçta morfin bağımlılığının meydana gelip gelmediği de analiz edilmiştir. Deneylemler sonucunda analiz edilen davranışlar morfin bağımlılığının geliştiğini ortaya koymuştur. Morfin+nalokson uygulanan grupta oldukça belirgin şekilde morfin yoksunluk bulguları meydana gelmiştir. Bu bulgular sıçanların farmakolojik olarak mü opioit

etkiye maruz kaldığını göstermiştir. Böylece bu çalışmada hedeflenen mü opioidlerjik aktivasyon deney hayvanlarında etkin şekilde oluşturulmuştur.

Beslenmenin hipotalamik regülasyonu, MSS'deki en karmaşık mekanizmaları içermektedir. Besin alımının düzenlenmesine katkı yapan faktörler hipotalamustaki oreksijenik veya anoreksijenik nöron gruplarını veya molekülleri etkileyerek entegrasyonda rol oynamaktadır.

Asprosin yağ hücrelerinden salgılanan ve metabolizma üzerinde etkilere sahip olan oldukça yeni bir adipokindir (Romere ve ark., 2016). Asprosinin besin alımını artırıcı etkileri belirlenmiştir (Duerschmid ve ark., 2017). Asprosinin bu oreksijenik etkisinde AgRP nöronlarının aktivasyonu rol oynamaktadır (Feng ve ark., 2023). Bizim çalışmamızda da hipotalamus dokularında asprosin sentezinde rol oynayan FBN1 gen ekspresyonu düzeyi analiz edilmiş ve morfinin önemli bir değişikliğe yol açmadığı, nalokson uygulamasının ise FBN1 ifade düzeyini azalttığı belirlenmiştir.

Morfin uygulanan grupta ORXA ifade düzeyi belirgin olarak artmıştır. Bu durum morfinin hipotalamusta ORXA'yı aktive ederek oreksijenik etkiye sahip olabileceğini göstermektedir. Tek başına nalokson uygulanması bu etkiyi azaltması, ORXA nöronları üzerinde endojen bir mü opioid aktivasyonunun olduğunu göstermektedir. Morfin+nalokson uygulanan grupta ise morfin grubuna benzer etki ortaya çıkmıştır. Farmakolojik düzeydeki mü opioidlerjik aktivasyon nalokson ile geri dönmemiştir.

Bir adipokin olan apelin besin alımını artırıcı (Tekin ve ark., 2017) veya azaltıcı etkileri (O'shea ve ark., 2003) tanımlanmıştır. Bu durumlar apelinin besin alımıyla ilgili farklı etkilerinin olabileceğini göstermektedir (Recinella ve ark., 2020). Bizim çalışmamızda da apelin gen ekspresyon düzeylerinde bir farklılık belirlenmemiştir.

AgRP oreksijenik etkili bir hipotalamik peptittir. Morfin veya nalokson uygulamalarının AgRP gen ifade düzeylerinde herhangi bir değişikliğe yol açmaması, beslenmenin mü opioidlerjik regülasyonunda AgRP'nin aracı rol oynamadığına işaret etmektedir.

POMK anoreksijenik etkisi çok iyi tanımlanmış hipotalamik nöron grubudur. Bu çalışmada morfin ve nalokson uygulamaları hipotalamik POMK gen ifade düzeylerinde bir değişikliğe neden olmamıştır. Bu bulgular POMK nöronları üzerinde mü opioid reseptörlerin önemli bir etkiye sahip olmadığını düşündürmektedir.

Çalışma bulgularımıza göre nalokson uygulaması NPY gen ifadesini artırmıştır. Morfin grubunda ise herhangi bir değişiklik gözlenmemiştir. Bu durum NPY nöronları üzerinde mü opioidlerjik endojen bir inhibisyon olduğunu düşündürmektedir. Mü opioid reseptör aktivasyonun ve morfinin besin alımını uyardığına yönelik araştırma bulguları bulunmaktadır (Silva ve ark., 2001). Bu bulguların aksini ortaya koyan çalışmalar da yer almaktadır (Laing ve ark., 2022).

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

6.1. SONUÇ

Bu çalışma morfin bağımlılığı ve morfin yoksunluk durumunun hipotalamik nöropeptitler üzerinde farklı etkiler oluşturduğunu göstermektedir. Bu düşünce farklı çalışmalarla da iddia edilmektedir (Pinter Kübler ve ark., 2013). Morfin uygulanması oreksin A gen ekspresyonunu artırırken, AgRP, NPY, POMK, FBN1 ifadelerini değiştirmemiştir. Nalokson uygulanması ise NPY ifadesini artırırken diğer molekülleri etkilemediği görülmüştür. Bu çalışmanın sonuçları morfin uygulanmasının beslenme ve metabolizmaya ilişkili molekülleri hipotalamustaki gen ifadelerini farklı düzeylerde etkileyebileceğini göstermiştir.

6.2. ÖNERİLER

Besin alımının düzenlenmesinde rol oynayan oreksijenik veya anoreksijenik moleküllerin opioitler tarafından regülasyonunda rol oynayan moleküler mekanizmaların anlaşılabilmesi için daha ileri düzeyde çalışmalara ihtiyaç bulunmaktadır.

7.KAYNAKLAR

- Ahmadian-Moghadam, H., Sadat-Shirazi, M. S., & Zarrindast, M. R. (2018). Cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART): A multifaceted neuropeptide. *Peptides*, 110, 56–77. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2018.10.008>
- Alamri, B. N., Shin, K., Chappe, V., & Anini, Y. (2016). The role of ghrelin in the regulation of glucose homeostasis. *Hormone molecular biology and clinical investigation*, 26(1), 3-11.
- Anderson, E. J. P., Çakir, I., Carrington, S. J., Cone, R. D., Ghamari-Langroudi, M., Gillyard, T., Litt, M. J. (2016). 60 YEARS OF POMC: Regulation of feeding and energy homeostasis by α -MSH. *Journal of Molecular Endocrinology*, 56(4), <https://doi.org/10.1530/jme-16-0014> T157–T174.
- Bender AM, Clark MJ, Agius MP, Traynor JR, Mosberg HI, (2013) Synthesis and evaluation of 4-substituted piperidines and piperazines as balanced affinity μ opioit receptor (MOR) agonist/ δ opioit receptor (DOR) antagonist ligands, *Bioorg Med Chem Lett*. pii: S0960-894X(13)01393-0
- Bergen, H. T., Mizuno, T. M., Taylor, J., & Mobbs, C. V. (1998). Hyperphagia and weight gain after gold-thioglucose: relation to hypothalamic neuropeptide Y and proopiomelanocortin. *Endocrinology*, 139(11), 4483-4488.
- Bernardis, L. L., Box, B. M., & Stevenson, J. A. F. (1963). Growth following hypothalamic lesions in the weanling rat. *Endocrinology*, 72(5), 684-692.
- Bodnar, R. J. (2007). Endogenous opiates and behavior: 2006. *Peptides*, 28(12), 2435-2513.
- Butler, A. A., Girardet, C., Mavrikaki, M., Trevaskis, J. L., Macarthur, H., Marks, D. L., & Farr, S. A. (2017). A Life without Hunger: The Ups (and Downs) to Modulating Melanocortin-3 Receptor Signaling. *Frontiers in Neuroscience*, 11. <https://doi.org/10.3389/fnins.2017.00128> Published.
- Clark, J. T., Sahu, A., Kalra, P. S., Balasubramaniam, A., & Kalra, S. P. (1987). Neuropeptide Y (NPY)-induced feeding behavior in female rats: comparison with human NPY ([Met17] NPY), NPY analog ([norLeu4] NPY) and peptide YY. *Regulatory peptides*, 17(1), 31-39.
- Coleman, D. L. (1982). Diabetes-obesity syndromes in mice. *Diabetes*, 31(Supplement_1), 1-6.
- Cowley, M. A., Smart, J. L., Rubinstein, M., Cerdán, M. G., Diano, S., Horvath, T. L., ... & Low, M. J. (2001). Leptin activates anorexigenic POMC neurons through a neural network in the arcuate nucleus. *Nature*, 411(6836), 480-484.
- Date, Y., Kojima, M., Hosoda, H., Sawaguchi, A., Mondal, M. S., Suganuma, T., ... & Nakazato, M. (2000). Ghrelin, a novel growth hormone-releasing acylated peptide, is synthesized in a distinct endocrine cell type in the gastrointestinal tracts of rats and humans. *Endocrinology*, 141(11), 4255-4261.
- Date, Y., Ueta, Y., Yamashita, H., Yamaguchi, H., Matsukura, S., Kangawa, K., ... & Nakazato, M. (1999). Orexins, orexigenic hypothalamic peptides, interact with autonomic, neuroendocrine and neuroregulatory systems. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(2), 748-753.
- Dhaliwal, A., & Gupta, M. (2023). Physiology, Opioid Receptor. In StatPearls. StatPearls Publishing.
- Duerrschmid, C., He, Y., Wang, C., Li, C., Bournat, J. C., Romere, C., ... & Chopra, A. R. (2017). Asprosin is a centrally acting orexigenic hormone. *Nature medicine*, 23(12), 1444-1453.
- Dünya Sağlık Örgütü (2009), Guidelines for the Psychosocially Assisted Pharmacological Treatment of Opioid Dependence
- Elmqvist, J. K., Elias, C. F., & Saper, C. B. (1999). From lesions to leptin: hypothalamic control of food intake and body weight. *Neuron*, 22(2), 221–232. [https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(00\)81084-3](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(00)81084-3)
- Shimada, M., Tritos, N. A., Lowell, B. B., Flier, J. S., & Maratos-Flier, E. (1998). Mice lacking

- melanin-concentrating hormone are hypophagic and lean. *Nature*, 396(6712), 670–674. <https://doi.org/10.1038/25341>
- Engin D, Timur SS, Muçaj S, Gürsoy RN (2023). Opioid Peptitleri: Farmasötik Açından Önemi ve Formülasyon Yaklaşımları. *HUJPHARM.*, 43(3):243-60.
- Faber, C. L., Deem, J. D., Phan, B. A., Doan, T. P., Ogimoto, K., Mirzadeh, Z., ... & Morton, G. J. (2021). Leptin receptor neurons in the dorsomedial hypothalamus regulate diurnal patterns of feeding, locomotion, and metabolism. *Elife*, 10, e63671.
- Feng, B., Liu, H., Mishra, I., Duerrschmid, C., Gao, P., Xu, P., ... & He, Y. (2023). Asprosin promotes feeding through SK channel-dependent activation of AgRP neurons. *Science Advances*, 9(8), eabq6718.
- Flier, J. S. (2006). AgRP in energy balance: Will the real AgRP please stand up?. *Cell metabolism*, 3(2), 83-85.
- Gang Yu, Hui Yan, Ze-Hui Gong, (2012) Differential effects of acute and repeated morphine treatment on k-opioid receptor mRNA levels in mesocorticolimbic system, *Pharmacol Rep*;64(2):445-8.
- Grenald, S. A., Largent-Milnes, T. M., & Vanderah, T. W. (2014). Animal models for opioid addiction drug discovery. *Expert opinion on drug discovery*, 9(11), 1345-1354.
- Gültekin, H., & Oreksinler, Ş. S. (2005). obezite tedavisinde yeni hedef moleküller. *Genel Tıp Dergisi*, 15(2), 85-90.
- Gültekin, H., Şahin, S., & Budak, N. (2004). BESLENME DAVRANIŞI: FARMAKOLOJİK HEDEF MOLEKÜLLER. *Sağlık Bilimleri Dergisi*, 13(1), 77-87.
- Hassanipour, M., Amini-Khoei, H., Shafaroodi, H., Shirzadian, A., Rahimi, N., Imran-Khan, M., ... & Dehpour, A. (2016). Atorvastatin attenuates the antinociceptive tolerance of morphine via nitric oxide dependent pathway in male mice. *Brain research bulletin*, 125, 173-180.
- Heilig, M., McLeod, S., Brot, M., Heinrichs, S. C., Menzaghi, F., Koob, G. F., & Britton, K. T. (1993). Anxiolytic-like action of neuropeptide Y: mediation by Y1 receptors in amygdala, and dissociation from food intake effects. *Neuropsychopharmacology*, 8(4), 357-363.
- Hu, Y., & Dunbar, J. C. (1997). Intracerebroventricular administration of NPY increases sympathetic tone selectively in vascular beds. *Brain research bulletin*, 44(1), 97-103.
- Hungs, M., & Mignot, E. (2001). Hypocretin/orexin, sleep and narcolepsy. *Bioessays*, 23(5), 397-408.
- Ikeda, H., Ardianto, C., Yonemochi, N., Yang, L., Ohashi, T., Ikegami, M., ... & Kamei, J. (2015). Inhibition of opioid systems in the hypothalamus as well as the mesolimbic area suppresses feeding behavior of mice. *Neuroscience*, 311, 9-21.
- Ingalls, A. M., Dickie, M. M., & Snell, G. D. (1996). Obese, a new mutation in the house mouse. *Obesity research*, 4(1), 101-101.
- Katzung BG, Masters SB, Trevor AJ. (2009). Basic and clinical pharmacology. 11th ed., McGrawHill Companies (Eds.), Singapore.
- Kılıç FS (2017). Opioidler, Ağrı, Opioidlerin Suistimali ve Yanlış Kullanımı. *Osmangazi Tıp Dergisi* 39(3):125-9.
- Kim, J., Ham, S., Hong, H., Moon, C., & Im, H. I. (2016). Brain reward circuits in morphine addiction. *Molecules and cells*, 39(9), 645-653.
- King B. M. (2006). The rise, fall, and resurrection of the ventromedial hypothalamus in the regulation of feeding behavior and body weight. *Physiology & behavior*, 87(2), 221–244. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2005.10.007>

- Kojima, M., & Kangawa, K. (2005). Ghrelin: structure and function. *Physiological reviews*, 85(2), 495-522.
- Kopp, J., Xu, Z. Q., Zhang, X., Pedrazzini, T., Herzog, H., Kresse, A., ... & Hökfelt, T. (2002). Expression of the neuropeptide Y Y1 receptor in the CNS of rat and of wild-type and Y1 receptor knock-out mice. Focus on immunohistochemical localization. *Neuroscience*, 111(3), 443-532.
- Kozimor, A., Chang, H., & Cooper, J. A. (2013). Effects of dietary fatty acid composition from a high fat meal on satiety. *Appetite*, 69, 39-45.
- Laing, B. T., Jayan, A., Erbaugh, L. J., Park, A. S., Wilson, D. J., & Aponte, Y. (2022). Regulation of body weight and food intake by AGRP neurons during opioid dependence and abstinence in mice. *Frontiers in Neural Circuits*, 16, 977642.
- Le Merrer, J., Becker, J. A., Befort, K., & Kieffer, B. L. (2009). Reward processing by the opioid system in the brain. *Physiological reviews*.
- Lecklin, A., Lundell, I., Salmela, S., Männistö, P. T., Beck-Sickinger, A. G., & Larhammar, D. (2003). Agonists for neuropeptide Y receptors Y1 and Y5 stimulate different phases of feeding in guinea pigs. *British journal of pharmacology*, 139(8), 1433-1440.
- Leibowitz, S. F., & Alexander, J. T. (1991). Analysis of neuropeptide Y-induced feeding: dissociation of Y1 and Y2 receptor effects on natural meal patterns. *Peptides*, 12(6), 1251-1260.
- Leibowitz, S. F., & Wortley, K. E. (2004). Hypothalamic control of energy balance: different peptides, different functions. *Peptides*, 25(3), 473-504.
- Lenard, N. R., & Berthoud, H. R. (2008). Central and peripheral regulation of food intake and physical activity: pathways and genes. *Obesity*, 16(S3), S11-S22.
- Lopez-Valpuesta, F. J., Nyce, J. W., Griffin-Biggs, T. A., Ice, J. C., & Myers, R. D. (1996). Antisense to NPY-Y1 demonstrates that Y1 receptors in the hypothalamus underlie NPY hypothermia and feeding in rats. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 263(1372), 881-886.
- Mansour, A., Hoversten, M. T., Taylor, L. P., Watson, S. J., & Akil, H. (1995). The cloned μ , δ and κ receptors and their endogenous ligands: evidence for two opioid peptide recognition cores. *Brain research*, 700(1-2), 89-98.
- Meister, B. (2000). Control of food intake via leptin receptors in the hypothalamus.
- Müller, T. D., Nogueiras, R., Andermann, M. L., Andrews, Z. B., Anker, S. D., Argente, J., ... & Tschöp, M. H. (2015). Ghrelin. *Molecular metabolism*, 4(6), 437-460
- Naleid, A. M., Grace, M. K., Chimukangara, M., Billington, C. J., & Levine, A. S. (2007). Paraventricular opioids alter intake of high-fat but not high-sucrose diet depending on diet preference in a binge model of feeding. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 293(1), R99-R105.
- Naloxone. (2020). In *LiverTox: Clinical and Research Information on Drug-Induced Liver Injury*. National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases.
- Opioids. (2020). In *LiverTox: Clinical and Research Information on Drug-Induced Liver Injury*. National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases.
- Petrocelli, G., Pampanella, L., Abruzzo, P. M., Ventura, C., Canaider, S., & Facchin, F. (2022). Endogenous Opioids and Their Role in Stem Cell Biology and Tissue Rescue. *International journal of molecular sciences*, 23(7), 3819. <https://doi.org/10.3390/ijms23073819>
- Petrocelli, G., Pampanella, L., Abruzzo, P. M., Ventura, C., Canaider, S., & Facchin, F. (2022). Endogenous Opioids and Their Role in Stem Cell Biology and Tissue Rescue. *International journal of molecular sciences*, 23(7), 3819. <https://doi.org/10.3390/ijms23073819>

- Pintér-Kübler, B., Ferenczi, S., Nunez, C., Zelei, E., Polyák, Á., Milanés, M. V., & Kovács, K. J. (2013). Differential changes in expression of stress-and metabolic-related neuropeptides in the rat hypothalamus during morphine dependence and withdrawal. *PLoS One*, *8*(6), e67027.
- Recinella, L., Orlando, G., Ferrante, C., Chiavaroli, A., Brunetti, L., & Leone, S. (2020). Adipokines: new potential therapeutic target for obesity and metabolic, rheumatic, and cardiovascular diseases. *Frontiers in physiology*, *11*, 578966.
- Romere, C., Duerrschmid, C., Bournat, J., Constable, P., Jain, M., Xia, F., ... & Chopra, A. R. (2016). Asprosin, a fasting-induced glucogenic protein hormone. *Cell*, *165*(3), 566-579.
- Roselli-Reh fuss, L., Mountjoy, K. G., Robbins, L. S., Mortrud, M. T., Low, M. J., Tatro, J. B., ... & Cone, R. D. (1993). Identification of a receptor for gamma melanotropin and other proopiomelanocortin peptides in the hypothalamus and limbic system. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *90*(19), 8856-8860.
- Rosenbaum, D. M., Rasmussen, S. G., & Kobilka, B. K. (2009). The structure and function of G-protein-coupled receptors. *Nature*, *459*(7245), 356-363.
- Rossi, M., Kim, M. S., Morgan, D. G. A., Small, C. J., Edwards, C. M. B., Sunter, D., ... & Bloom, S. R. (1998). A C-terminal fragment of Agouti-related protein increases feeding and antagonizes the effect of alpha-melanocyte stimulating hormone in vivo. *Endocrinology*, *139*(10), 4428-4431.
- Schwartz, M. W., & Morton, G. J. (2002). Keeping hunger at bay. *Nature*, *418*(6898), 595-597.
- Schwartz, M. W., Woods, S. C., Porte Jr, D., Seeley, R. J., & Baskin, D. G. (2000). Central nervous system control of food intake. *Nature*, *404*(6778), 661-671.
- Silva, R. M., Hadjimarkou, M. M., Rossi, G. C., Pasternak, G. W., & Bodnar, R. J. (2001). β -endorphin-induced feeding: pharmacological characterization using selective opioid antagonists and antisense probes in rats. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, *297*(2), 590-596.
- Smart, D., & Jerman, J. C. (2002). The physiology and pharmacology of the orexins. *Pharmacology & therapeutics*, *94*(1-2), 51-61.
- Sohn, J. W., & Williams, K. W. (2012). Functional heterogeneity of arcuate nucleus pro-opiomelanocortin neurons: implications for diverging melanocortin pathways. *Molecular neurobiology*, *45*, 225-233.
- Stanley, S. A., Small, C. J., Murphy, K. G., Rayes, E., Abbott, C. R., Seal, L. J., ... & Bloom, S. R. (2001). Actions of cocaine-and amphetamine-regulated transcript (CART) peptide on regulation of appetite and hypothalamo-pituitary axes in vitro and in vivo in male rats. *Brain research*, *893*(1-2), 186-194.
- Strnadová, V., Pačesová, A., Charvát, V., Šmotková, Z., Železná, B., Kuneš, J., & Maletínská, L. (2024). Anorexigenic neuropeptides as anti-obesity and neuroprotective agents: exploring the neuroprotective effects of anorexigenic neuropeptides. *Bioscience Reports*, *44*(4).
- Sverrisdóttir, E., Lund, T. M., Olesen, A. E., Drewes, A. M., Christrup, L. L., & Kreilgaard, M. (2015). A review of morphine and morphine-6-glucuronide's pharmacokinetic-pharmacodynamic relationships in experimental and clinical pain. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, *74*, 45-62.
- Tatar, T. (2020). Orexin and its functions. *Current Perspectives on Health Sciences*, *1*(1), 35-40.
- Tekin, S., Erden, Y., Sandal, S., Etem Onalan, E., Ozyalin, F., Ozen, H., & Yilmaz, B. (2017). Effects of apelin on reproductive functions: relationship with feeding behavior and energy metabolism. *Archives of physiology and biochemistry*, *123*(1), 9-15.
- Trescot, A. M., Datta, S., Lee, M., & Hansen, H. (2008). Opioid pharmacology. *Pain physician*, *11*(2 Suppl), S133-S153.

- Valassi, E., Scacchi, M., & Cavagnini, F. (2008). Neuroendocrine control of food intake. *Nutrition, metabolism and cardiovascular diseases*, 18(2), 158-168.
- White, J. D., & Kershaw, M. (1990). Increased hypothalamic neuropeptide Y expression following food deprivation. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 1(1), 41-48.
- Williams, G., Harrold, J. A., & Cutler, D. J. (2000). The hypothalamus and the regulation of energy homeostasis: lifting the lid on a black box. *Proceedings of the Nutrition Society*, 59(3), 385-396.
- Yaluğ, İ., Özdemir, S., & Aker, A. T. (2008). Travma sonrası stres bozukluğu ve kronik ağrı birlikteliği zemininde opioid bağımlılığı. In *New/Yeni Symposium Journal* (Vol. 46, No. 4, pp. 200-5).
- Yannielli, P. C., & Harrington, M. E. (2001). Neuropeptide Y in the mammalian circadian system: effects on light-induced circadian responses. *Peptides*, 22(3), 547-556.
- Yosten, G. L., Haddock, C. J., Harada, C. M., Almeida-Pereira, G., Kolar, G. R., Stein, L. M., ... & Samson, W. K. (2021). Past, present and future of cocaine-and amphetamine-regulated transcript peptide. *Physiology & behavior*, 235, 113380.

8. EKLER

8.1. EK 1 Etik Kurul Kararı



T.C.
NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ
KONÜDAM Deneysel Tıp Uygulama ve
Araştırma Merkezi Müdürlüğü



Karar Sayısı: 2023 – 041

Karar Tarihi: 15.09.2023

Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Kararı

Necmettin Erbakan Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji ABD'den Prof. Dr. Selim KUTLU ve Zeliha Erkaya' nın sunduğu " **Hipotalamustaki bazı oreksijenik ve anoreksijenik moleküllerin ekspresyonunda mü opioit reseptörlerin olası etkisinin yetişkin sıçanlarda araştırılması**" başlıklı tez projesi 8 üyenin katılımı ile değerlendirildi.

Projede 5 grupta toplam 60 adet sıçan kullanılacağı ve anestezi altında servikal dislokasyon ile sakrifiye edileceği bildirilmiştir.

Necmettin Erbakan Üniversitesi KONÜDAM Deneysel Tıp Uygulama ve Araştırma Merkezi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Yönergesindeki ilgili maddelerde belirtilen başvuru sahibinin sorumlulukları ve hayvan deneyleri ile ilgili etik ilkeler saklı kalmak koşulu ile projenin hazırlanmasında yönerge ilkelerine uyulduğu ve çalışmanın deneysel kısmını gerçekleştirecek araştırmacıların deney hayvanları kullanım sertifikasına sahip olduğu dikkate alınarak projenin hayvan kullanım etiği açısından "**Uygun**" olduğuna oybirliği ile karar verilmiştir.

Adres : Meram Tıp Fakültesi Eski Yerleşkesi 42080 Akyokuş — Meram / KONYA
Tel : +90 332 223 71 11 e-posta : konudam@konya.edu.tr
Faks : +90 332 223 71 24 Elektronik Ağ : https://www.konya.edu.tr/deneysetip

