



T.C.  
NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



Fizyoloji Anabilim Dalı  
Fizyoloji

|Doktora Tezi|

**DENEYSEL MORFİN BAĞIMLILIĞI MODELİNDE HİPOTALAMİK VE  
HİPOKAMPAL SEMAFORİN 3A VE RESEPTÖRLERİ GEN İFADELERİNİN  
ARAŞTIRILMASI**

Kaniye Zeynep ÇALIŞKAN SAK

ORCID: 0000-0003-0847-1168

Danışman

Prof. Dr. Selim KUTLU

ORCID: 0000-0001-9257-4797

Bu tez çalışması BAP tarafından 221418005 numaralı proje ile desteklenmiştir.

Konya –2024

## TEŞEKKÜR

Akademik anlamda bana her zaman destek olan çok kıymetli danışman hocam Prof. Dr. Selim KUTLU'ya,

N.E.Ü. Tıp Fakültesi Fizyoloji A.B.D.'da bulunan ve lisansüstü eğitimime değerli katkılarını sunan kıymetli hocalarım Prof. Dr. Işık SOLAK GÖRMÜŞ, Doç. Dr. Faik ÖZDENGÜL, Dr. Öğr. Üyesi Raviye ÖZEN KOCA'ya,

N.E.Ü. Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji A.B.D.'da görev yapan, lisansüstü eğitimim boyunca her zaman yanımda olan değerli hocam Prof. Dr. Ercan KURAR'a

KTO Karatay Üniversitesi Tıp Fakültesinde bulunan değerli hocalarım Doç. Dr. Bahriye HORASANLI, Doç. Dr. Merve AYDIN TERZİOĞLU ve Dr. Öğr. Üyesi Esra ŞUMLU'ya

Deneylerini birlikte yürüttüğümüz sayın Dr. Öğr. Üyesi Emine Nedime KORUCU'ya ve ekibine, tezimin istatistiksel değerlendirmesinde destek olan, kıymetli arkadaşım Arş. Gör. Yasin Ali ÇİMEN'E

Hem çalışma hem yol arkadaşım değerli Uzm. Dr. Aysu ŞEN'e, kıymetli arkadaşım Esra FİDAN'a, bölüm arkadaşım Arş. Gör. Ayça YAVUZ'a

Hem anneliği hem de çalışkanlığıyla önümdeki en güzel örneğim biricik annem Uzm. Dr. Hacer ÇALIŞKAN'a, kendimi bildim bileli akademisyenliğin liyakatle ve çok çalışmayla ancak olabileceğini her hücreme işleyen canım babam Prof. Dr. Ümran ÇALIŞKAN'a, bu zorlu süreçte desteklerini bir an bile esirgememiş olan kıymetli anne babam Recai SAK ve Şükran SAK'a, hayat arkadaşım Yusuf Kürşad SAK'a, ruhani doğuşumu bana hediye eden, sevgileri ve varlıkları akciğerlerime dolan nefesim kadar gerçek olan can yoldaşlarım, çok kıymetli iki oğlum olan Rüzgar'ım ve Deniz'ime,

Sağlık Bilimleri Enstitüsü öğrenci işleri biriminde görev yapan ve resmi işlerde bize çok yardımcı olan ekip üyelerine ve tezimi 221418005 no'lu proje ile destekleyen N.E.Ü. Bilimsel Araştırma Koordinatörlüğü'ne teşekkür ederim.

Kaniye Zeynep ÇALIŞKAN SAK

Şubat 2024

## İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR .....	ii
İÇİNDEKİLER .....	iii
TEZ ONAY SAYFASI.....	v
TEZ ÇALIŞMASI ORJİNALLİK RAPORU .....	vi
BİLİMSEL ETİK BEYANNAMESİ .....	vii
KISALTMALAR.....	viii
TABLolar LİSTESİ.....	ix
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	x
ÖZET .....	xi
ABSTRACT .....	xii
<b>1. GİRİŞ VE AMAÇ.....</b>	<b>1</b>
<b>2. GENEL BİLGİLER .....</b>	<b>3</b>
2.1. Endojen Opioid Sistem.....	3
2.1.1. Opioid reseptörlerin alt tipleri, lokasyon ve fonksiyonları .....	4
2.1.2. Ödül sistemi üzerinde opioidlerin rolü.....	6
2.1.3. Morfin.....	7
2.1.4. Nalokson.....	8
2.2. Bağımlılık süreçlerinde hipokampus ve hipokampal nörojeniz .....	9
2.2.1. Hipokampal Nörojeniz.....	9
2.2.2 Hipotalamik Nörojeniz .....	10
2.3. Semaforin Proteinleri .....	11
2.3.1 Semaforin proteinlerinin yapısı ve sınıflandırılması .....	11
2.3.2 Semaforin 3A (SMF 3A) .....	12
2.3.3 Semaforin proteinlerinin fizyolojik fonksiyonları.....	12
2.3.4 SMF 3A proteininin fizyolojik fonksiyonları.....	14
2.3.5 Semaforin proteinlerinin reseptörleri .....	15
2.4. Opioidler ve semaforin proteinleri .....	16
2.5. Bağımlılık, semaforin proteinleri ve davranışsal etkiler .....	16
<b>3. GEREÇ VE YÖNTEM .....</b>	<b>18</b>
3.1. Deney Hayvanları.....	18
3.1.1 Morfin bağımlılığı ve morfin çekilmesi test uygulamaları .....	18
3.2. Deneyin sonlandırılması ve dokuların toplanması .....	20
3.3. Doku örneklerinden total RNA izolasyonu .....	20
3.3.1. Total RNA örneklerinin gDNA kontaminasyonunun temizlenmesi.....	21
3.3.2. cDNA sentezi.....	21
3.3.3. Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR).....	21
3.4. İstatistiksel Metot .....	22
<b>4. BULGULAR.....</b>	<b>23</b>
4.1. Davranış Testi Bulguları.....	23
4.2. SMF 3A, NRF ve PLA1 gen ifade bulguları.....	29

4.2.1. Hipotalamus dokusundaki SMF 3A, NRF ve PLA1 gen ifade bulguları.....	29
4.2.2. Hipokampus dokusundaki SMF 3A, NRF1 ve PLA1 gen ifade bulguları.....	31
<b>5. TARTIŞMA.....</b>	<b>34</b>
<b>6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....</b>	<b>37</b>
<b>7. KAYNAKLAR.....</b>	<b>38</b>
<b>8. EKLER.....</b>	<b>45</b>
8.1. Ek 1 : Etik Kurul Kararı .....	45



## TEZ ONAY SAYFASI

Necmettin Erbakan Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Fizyoloji Anabilim Dalı Doktora Öğrencisi **KANIYE ZEYNEP ÇALIŞKAN SAK**'ın "**Deneysel Morfin Bağımlılığı Modelinde Hipotalamik ve Hipokampal Semaforin 3A ve Reseptörleri Gen İfadelerinin Araştırılması**" başlıklı tezi tarafımızdan incelenmiş; amaç, kapsam ve kalite yönünden Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Konya / 27.02.2024

Tez Danışmanı	Prof. Dr. Selim KUTLU N.E.Ü. Tıp Fakültesi Fizyoloji A.B.D.
Jüri Üyesi	Prof. Dr. Zülfikare Işık SOLAK GÖRMÜŞ N.E.Ü. Tıp Fakültesi Fizyoloji A.B.D.
Jüri Üyesi	Prof. Dr. Ercan KURAR N.E.Ü. Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji A.B.D.
Jüri Üyesi	Doç. Dr. Bahriye HORASANLI KTO Karatay Üniversitesi Tıp Fakültesi Nöroloji A.B.D
Jüri Üyesi	Doç. Dr. Mehmet ÖZ Aksaray Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji A.B.D.

Yukarıdaki tez, Necmettin Erbakan Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunun 03/04/2024.tarih ve 07/07 sayılı kararı ile onaylanmıştır. Prof. Dr.

Hasibe VURAL

Enstitü Müdürü

## TEZ ÇALIŞMASI ORJİNALLİK RAPORU

*Deneyisel Morfin Bağımlılığı Modelinde Hipotalamik ve Hipokampal Semaforin 3A ve Reseptörleri Gen İfadelerinin Araştırılması* başlıklı tez çalışmamın toplam **57** sayfalık kısmına ilişkin, 05.02.2024 tarihinde tez danışmanım tarafından **Turnitin** adlı intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan orijinallik raporuna göre, tezimin benzerlik oranı **%18** 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.

05.02.2024

Kaniye Zeynep ÇALIŞKAN SAK

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.

05.02.2024

Kaniye Zeynep ÇALIŞKAN SAK

## SİMGELER VE KISALTMALAR

### KISALTMALAR

ACh: Asetilkolin CA: Cornu

Ammonis cAMP: Siklik Adenozin

Monofosfat

GABA: Gama Aminobütirik Asit

GnRH: Gonadotropin Salıcı Hormon

GTP: Guanozin Trifosfat

MOR: mü Opioid Reseptörleri

NMDA: N-metil-D-aspartat

NO: Nitrik Oksit

NRF1: Nörofilin 1

PAG: Periakuaduktal Gri Madde

PKA: Protein Kinaz A

PLA1: Pleksin a1

PSA-NCAM: Polisialile Nöronal Hücre Yapışma Molekülü

RVM: Rostro Ventral Medulla

SMF 3A: Semaforin 3A

TGF  $\beta$ 1: Transforming Growth Factor  $\beta$

VTA: Ventral Tegmental Alan

## TABLolar LİSTESİ

<b>Tablo No</b>	<b>Sayfa No</b>
Tablo 3.1. Modifiye Gellert ve Holtzman skalası .....	20
Tablo 3.2. Ekspresyon analizinde kullanılan genlere spesifik primer dizileri .....	22
Tablo 3.3. qRT-PCR basamaklarının sıcaklık ve süreleri .....	22
Tablo 4.1. Morfin yoksunluk bulguları. ....	29
Tablo 4.2. Hipotalamus dokusunda SMF 3A, NRF1 ve PLA1 gen ifade düzeyleri.....	31
Tablo 4.3. Hipokampus dokusunda SMF 3A, NRF1 ve PLA1 gen ifade düzeyleri.....	33



## ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil No	Sayfa No
Şekil 2.1. Mü opioit reseptör sinyalleşme mekanizması .....	4
Şekil 3.1. Deneylerde kullanılan gruplar ve gruplara yapılan uygulamalar .....	19
Şekil 4.1. Gruplar arası dış çıtırdatma sayıları.....	23
Şekil 4.2. Gruplar arası süslenme sayıları.....	24
Şekil 4.3. Gruplar arası şahlanma sayıları.....	24
Şekil 4.4. Gruplar arası anormal postür sayıları. ....	25
Şekil 4.5. Gruplar arası defekasyon sayıları.....	25
Şekil 4.6. Gruplar arası göz kısma sayıları.....	26
Şekil 4.7. Gruplar arası salya davranış sayıları. ....	26
Şekil 4.8. Gruplar arası silkelenme sayıları.....	27
Şekil 4.9. Gruplar arası idrar yapma sayıları.....	27
Şekil 4.10. Gruplar arası sıçrama sayıları.....	28
Şekil 4.11. Gruplar arası yoksunluk skor sayıları.....	28
Şekil 4.12. K, M, N ve MN gruplarında hipotalamik SMF 3A gen ifadesi düzeyi.....	29
Şekil 4.13. K, M, N ve MN gruplarında hipotalamik NRF1 gen ifadesi düzeyi.....	30
Şekil 4.14. K, M, N ve MN gruplarında hipotalamik PLA1 gen ifadesi düzeyi.....	30
Şekil 4.15. K, M, N ve MN gruplarında hipokampal SMF 3A gen ifadesi düzeyi .....	31
Şekil 4.16. K, M, N ve MN gruplarında hipokampal NRF1 gen ifadesi düzeyi.....	32
Şekil 4.17. K, M, N ve MN gruplarında hipokampal PLA1 gen ifadesi düzeyi.....	32

## ÖZET

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

### DENEYSSEL MORFİN BAĞIMLILIĞI MODELİNDE HİPOTALAMİK VE HİPOKAMPAL SEMAFORİN 3A VE RESEPTÖRLERİ GEN İFADELERİNİN ARAŞTIRILMASI

Kaniye Zeynep ÇALIŞKAN SAK

Konya-2024

Ratlar üzerinde deneysel morfin bağımlılığı oluşturularak, hipotalamus ve hipokampus dokularındaki SMF 3A NRF1 ve PLA1 gen ifade düzeylerinin incelenmesi amaçlanmıştır.

Mevcut çalışmada ağırlıkları ortalama 300-350 gr olan 48 adet Wistar ırkı erkek sıçan kullanılmıştır. Randomize olarak alınan ratlar 4 grup halinde ve her grupta 12 adet sıçan olacak şekilde ayrılmıştır. Bu gruplardan kontrol grubuna serum fizyolojik, morfin grubuna 10 mg/kg/gün morfin sülfat, nalokson grubuna serum fizyolojik, morfin + nalokson grubuna deri altı yolla 10 mg/kg/gün morfin sülfat 5 gün boyunca enjekte edilmiştir.

5. gün sabah nalokson ve kontrol gruplarına serum fizyolojik, morfin + nalokson ve morfin gruplarına ise 10 mg/kg/gün morfin sülfat verilmiştir. Bu enjeksiyonlardan 1.5 saat sonra aynı dozda olacak şekilde kontrol ve morfin grubuna SF, nalokson ve morfin+nalokson grubuna nalokson enjekte edilerek davranış testine alınmıştır. Tüm sıçanların hipotalamus ve hipokampus dokularındaki SMF 3A, NRF1 ve PLA1 reseptörlerinin gen ekspresyon seviyeleri kantitatif RTPCR ile analiz edilmiştir. 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. Tek yönlü ANOVA ve ardından Tukey ikili çoklu karşılaştırma testi, eşit grup varyanslarına sahip normal dağılımlı veriler için kullanılmıştır. Anormal dağılımlı veriler için Kruskal-Wallis testi ve ardından Dunn'ın ikili çoklu karşılaştırma testi kullanılmıştır. Hayvanların ilk ve son ağırlık kıyaslaması iki yönlü ANOVA testi ile yapılmıştır.  $2^{-\Delta\Delta CT}$  değerleri ortalama  $\pm$  Ortalamanın standart hatası (SEM) olarak ve davranış deneyleri sonuçları ortalama  $\pm$  standart sapma olarak verilmiştir.  $p < 0.05$  değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

Deney hayvanlarına nalokson uygulanmasının ardından ratlarda belirgin olarak morfin çekilme davranış bulguları saptanmıştır. Hipotalamus ve hipokampus dokularının her ikisinde de SMF 3A, NRF1 ve PLA1 reseptörlerinin gen ifadesi seviyelerinde morfin grubu ile morfin+nalokson grubu arasında anlamlı düzeyde fark oluşmuştur.

Genel olarak sonuçlarımızı değerlendirdiğimizde, morfin uyguladığımız grupta hem SMF 3A hem de reseptörleri olan NRF1 ve PLA1 gen ekspresyonlarının arttığı, bunun tam tersi olarak morfin uygulanan gruba nalokson uygulanmasını takiben belirgin olarak azaldığı gözlemlenmiştir. Mü opioid antagonisti uygulandığı zaman sonucun tersine dönmesi morfinin etkisinin reseptör aracılı olduğunu göstermektedir. Nalokson bir opioid antagonisti olarak, kontrole göre kıyaslayınca etkiyi tam tersine döndürmüş olsaydı, beyinde endojenik olarak mü-opioiderjik bir aktivitenin olduğu ve bunların tonik etki oluşturduğu ve sadece nalokson uygulamasıyla bu etkinin ortadan kalktığı düşünülebilirdi. Ancak bulgulara göre nalokson ve kontrol grubunun değerlerinin birbirine çok yakın olması, sadece nalokson uygulamasının SMF 3A ve reseptörleri üzerinde anlamlı bir etki oluşturmadığını ve hipotalamus ve hipokampüste SMF 3A ve reseptörleri üzerinde opioidderjik tonik baskılamının olmadığını gösterdi. Morfin uygulaması hipotalamusta ve hipokampüste SMF 3A ve reseptörlerinin düzeyini belirgin olarak arttırdı. Bu durum, endojen B-endorfin veya morfin gibi mü opioid reseptör agonistlerinin beyin dokusunda belli düzeyde yükselmesinin sonucunda SMF 3A, NRF1 ve PLA1 ekspresyon düzeyini arttırabileceğini, bu artışın da semaforinerjik aktivasyonla beraber, nöronal entegrasyon ve nöronlar arası bağlantısallığın belirgin düzeyde azalmasına yol açması kuvvetle muhtemeldir.

**Anahtar Kelimeler.** Hipotalamus, Hipokampus, Nörofilin 1, Pleksin A1, SMF 3A.

## ABSTRACT

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

### INVESTIGATION OF HIPPOCAMPAL AND HIPPOCAMPAL SEMAPHORIN 3A AND ITS RECEPTORS GENE EXPRESSION IN AN EXPERIMENTAL MORPHINE ADDICTION MODEL

Kaniye Zeynep ÇALIŞKAN SAK

Konya-2024

It was aimed to investigate the SMF 3A, NRF1 and PLA1 gene expression levels in hypothalamus and hippocampus tissues by inducing experimental morphine addiction in rats.

In the present study, 48 male Wistar rats with an average weight of 300-350 g were used. The rats were randomly divided into 4 groups with 12 rats in each group. The control group was injected with saline, the morphine group with 10 mg/kg/day morphine sulphate, the naloxone group with saline, and the morphine + naloxone group with 10 mg/kg/day morphine sulphate subcutaneously for 5 days. 1.5 hours after these injections, SF was injected into the control and morphine groups at the same dose, naloxone was injected into the naloxone and morphine+naloxone groups and they were subjected to behavioural test. The gene expression levels of SMF 3A, NRF1 and PLA1 receptors in the hypothalamus and hippocampus tissues of all rats were analysed by quantitative RTPCR. All data obtained were analysed using InStat Statistical Package (InStat Graphad Software 8.0.1, San Diego, CA, USA). Shapiro-Wilk test was used to test the normality of the data. One-way ANOVA followed by Tukey's pairwise multiple comparison test was used for normally distributed data with equal group variances. Kruskal-Wallis test followed by Dunn's pairwise multiple comparison test was used for abnormally distributed data. Initial and final weight comparison of animals was performed by two-way ANOVA test. 2- $\Delta\Delta$ CT values are given as mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM) and results of behavioural experiments as mean  $\pm$  standard deviation.  $p < 0.05$  was considered statistically significant.

Following the administration of naloxone to the experimental animals, morphine withdrawal behavioural signs were detected in rats. There was a significant difference between morphine group and morphine+naloxone group in the gene expression levels of SMF 3A, NRF1 and PLA1 receptors in both hypothalamus and hippocampus tissues.

When we evaluated our results in general, we observed that both SMF 3A and its receptors NRF1 and PLA1 gene expressions increased in the morphine-treated group and, on the contrary, decreased significantly following the administration of naloxone to the morphine-treated group. The reversal of the result when an opioid antagonist was administered indicates that the effect of morphine is receptor mediated. If naloxan, as an opioid antagonist, had reversed the effect compared to the control, we could say that there is an endogenous muopioidergic activity in the brain, which produces a tonic effect and that this effect is eliminated only by naloxan administration. However, according to our findings, the fact that the values of naloxone and control group were very close to each other showed that only naloxone administration had no significant effect on SMF 3A and its receptors and there was no opioidergic tonic suppression on SMF 3A and its receptors in the hypothalamus and hippocampus. Morphine administration significantly increased the level of SMF 3A and its receptors in the hypothalamus and hippocampus. This suggests that endogenous B-endorphin or mu opioid receptor agonists such as morphine may increase the expression level of SMF 3A, NRF1 and PLA1 as a result of a certain level of opioid receptor agonists in brain tissue, and it is highly probable that this increase may lead to a significant decrease in neuronal integration and inter-neuronal connectivity with semaphorinergic activation.

**Keywords:** Hypothalamus, Hippocampus, Neurophilin 1, Pleksin A1, SMF 3A.

## 1. GİRİŞ VE AMAÇ

Dünya çapında özellikle son yıllarda yaşam koşullarının zorlaşması, hızla değişen teknolojik gelişmeler ve insan ilişkilerinin zayıflaması sonucunda birçok psikolojik problem ortaya çıkmaktadır. Genel olarak bireyler sosyalleşmek ve toplum içinde olmak yerine daha izole olarak bireyselleşmeye başlamışlardır. Bu durumun neticesinde de kişiler hayattan daha az zevk alma, çevresi tarafından dışlanma, mutsuzluk gibi olumsuz durumlarla karşı karşıya kalmışlar ve neticede kişiler bağımlılık yapıcı maddelere yönelerek giderek eksilmekte olan mutluluk veya haz gibi duyguları bu maddelerden sağlamaya çalışmaya başlamışlardır. İnsanlarda gittikçe yaygınlaşan bağımlılık konusunu araştırmak için deney hayvanları üzerinde çalışmalara yönelinmiş, bağımlılığın altında yatan olası patofizyolojik süreçler ve tedavi protokollerine yönelik bilgiler elde edilmeye çalışılmıştır.

Bağımlılık mekanizmaları merkezi sinir sisteminde (MSS) oldukça karmaşık ve çeşitli süreçleri içermektedir. Opioitler gibi bağımlılık oluşturan moleküllerin MSS'deki ödül merkezlerini aktive ettiği bilinmektedir. Bağımlılığın oluşmasıyla beyindeki hipokampal dentat girus gibi nörogenез bölgelerindeki progenitör hücrelerde ve nöronlarda sağkalımın azaldığı bulunmuştur. Son yıllarda hipotalamusun da önemli bir nörogenез bölgesi olduğu ortaya çıkmıştır.

Opioitler güçlü analjezik etkili ilaçlar olup, uzun süreli kullanımlarda bağımlılık oluşturabilme potansiyeli olan ajanlardır (Hassanipour ve ark. 2016). Bağımlılık genel anlamda, bireyin kullandığı madde, nesne, alkol veya gerçekleştirdiği bir davranış üzerindeki kontrolünü kaybedip sürekli ihtiyaç duyması olarak tanımlanabilir. Morfin toleransı ise; alınması gereken dozdan ve süreden bağımsız olarak kişinin keyif duygusunu tekrar hissetmek için maddeyi tekrarlı olarak kullanmasına dayanmaktadır (Nakamoto ve ark. 2012).

SMF'ler, glikoproteinlerin geniş bir ailesi olup yapıları ve kökenlerine göre sekiz farklı alt gruba ayrılırlar. Fizyolojik sistemlerin fonksiyonu ve gelişiminde önemli görevleri bulunan, özellikle sinir sisteminin gelişiminde görev oynayan nöronal rehberlik proteinleridir. SMF'ler sinaptogenez, akson budanması, dendritik dikenlerin yoğunluğu ve olgunlaşması sürecinde rol oynar. SMF 3A, sınıf 3 tipte salgılanan bir SMF'dir ve gelişen aksonların itici bir molekülü olarak iyi karakterize edilir (Jongbloets ve ark. 2014). Nörofilin 1 (NRF1), SMF 3A için birincil bağlanma bölgesini sağlar ve SMF 3A sinyallerini aktaran pleksinlerle (PLA) bir kompleks oluşturur. SMF'lerin akson rehberliği ve nöronal hücre göçündeki fizyolojik rolleri yoğun bir

şekilde çalışılmış olmasına rağmen, bağımlılık sürecinde meydana gelebilecek olası nöronal değişimlerdeki rolü halen tam anlamıyla anlaşılamamıştır.

Bu projenin amacı, SMF 3A ve reseptörleri olan PLA ve NRF1'in deneysel bağımlılık modeli olarak seçilen morfin bağımlılığındaki düzeylerinin araştırılmasıdır. Bu amaçla, opioit reseptörlerinin yer aldığı bağımlılık fizyopatolojisinde önemli beyin bölgelerinden olan hipokampus ve hipotalamusta bağımlılık sonrası SMF 3A ve reseptör düzeylerindeki olası değişikliklerin moleküler yöntemlerle araştırılması hedeflenmiştir.



## 2. GENEL BİLGİLER

Opioit maddelerin uzun süreli kullanımı sonucunda bağımlılık meydana gelmektedir. 2013 yılında yapılan bir çalışmaya göre 15 ile 64 yaşları arasında olan her yirmi bireyden bir kişinin uyuşturucu kullanmakta olduğu belirtilmiştir (Unodc 2016). Opioit maddeler doğal, sentetik ve yarı sentetik olacak şekilde farmakolojik açıdan üç farklı gruptan oluşmaktadır.

Opioitlerin farklı türleri olan eroin, morfin, oksikodon, metadon ve fentanil beynin farklı alanlarında etkinlik göstermektedir.

### 2.1. Endojen Opioit Sistem

Opioit maddeler özellikle ağrı ile seyreden hastalıkların tedavisinde yer alan analjezik yönleri çok güçlü olan, uzun yıllardır kullanılan ve günümüzde halen sık kullanılan ağrı kesici ajanlardır. Son yıllarda özellikle farmakoloji alanında yapılan çalışmaların ilerlemesi ile opiyatların elde edilmesinde büyük ölçüde gelişmeler sağlanmıştır.

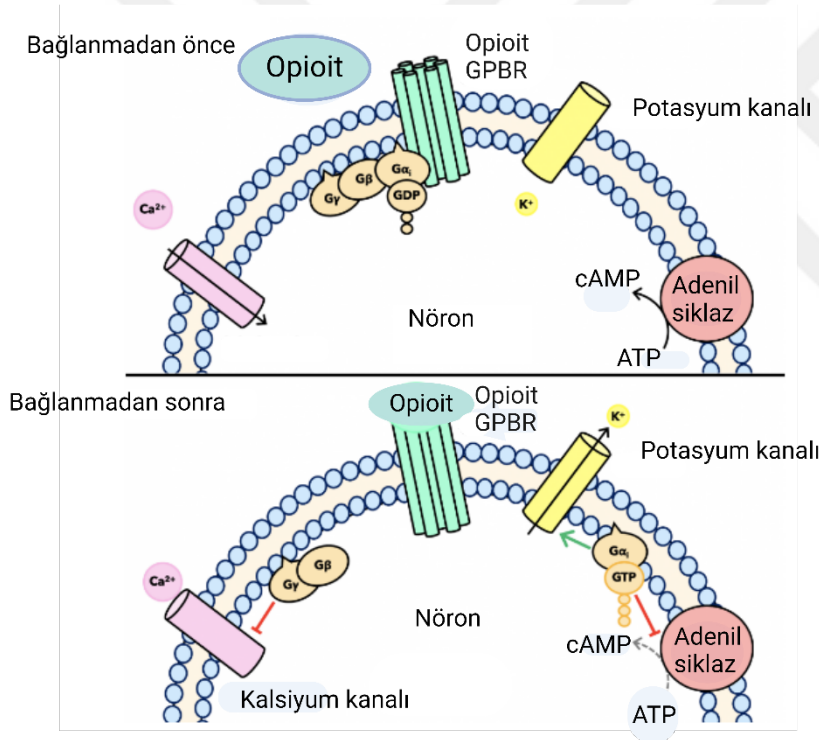
Opioit maddeler analjezik etkilenen yanı sıra öksürük, ishal, operatif işlemler sonrası oluşabilecek ağrılar gibi fazlaca rahatsızlığın tedavisinde sıklıkla kullanılmaktadır (Hasani ve Bruchas 2011). Opioit maddelerin ağrı kesici özelliklerinin yanı sıra öfori, kusma, gastrointestinal sistemdeki motilitede azalma ve sedasyon gibi bazı yan etkileri bulunmaktadır (Sora ve ark. 1997). Opioit maddeler inhibitör özelliklidir ve bu etkinin ortaya çıkmasında üç temel mekanizma bulunur bunlar sırasıyla  $G_i$  proteini vasıtasıyla hücre dışına  $K^+$  iyonlarının difüzyonu, adenilatsiklaz inhibisyonu ve hücreye  $Ca^{2+}$  girişinin azaltılmasıdır.

Opioit reseptör grubu G protein bağlı reseptör grubu içinde yer almaktadır. Nörotransmitterler, hormonlar ve ilaçlara karşı meydana gelen tepkide aracı rol üstlenirler ve tat, koku, duyuşsal algıda görev alırlar (Uprety ve ark. 2013). G protein bağlı reseptörler yedi kat transmembran proteinine sahiptir ve hücre içi G proteinlerine bağlanarak etki gösterirler. İlgili ligand reseptöre bağlandıktan sonra transmembran protein yardımıyla ileti hücre içine iletilir, hücre içinde aktive edilen yola bağlı olarak farklı cevaplar meydana gelir. G protein ailesi  $G_i$ ,  $G_q$  ve  $G_s$  alt birimlerinden meydana gelir ve her birinin aktivasyonu sonucunda farklı yanıtlar oluşur.

G protein alt ünitelerinden olan  $G_s$  uyarıldığında adenilat siklaz enzimi aktive olur ve bu sayede siklik adenosin monofosfat (cAMP) yapımında artış meydana gelir. Artan cAMP, çok

sayıda iyon kanalının, proteinin ve protein Kinaz A'nın (PKA) aktivasyonundan sorumludur (Hasani ve Bruchas 2011). Bazı hedef hücrelerde bir diğer G protein alt türü olan  $G_i$ , cAMP'nin aktivasyonunu inhibe etme özelliği gösterir. Opioid antagonistinin, ilgili reseptörün hücre dışında bulunan N- terminal bölgesine bağlanmasını takiben, hücre içindeki GTP'ye bağlanır. Bu bağlanmayı takiben, alfa alt ünitesi beta ve gama alt ünitesinden ayrılır.  $G_{oi}$  tarafından adenilat siklazin inhibisyonu gerçekleşir ve cAMP üretimi önlenmiş olur. Bu durum, pre/post sinaptik kavşaklarda inhibisyon veya aktivasyon etkisini ortaya çıkartır (Yudin ve ark. 2018).

Opioid agonistleri tarafından N tipli voltaj kapılı  $Ca^{2+}$  kanalları uyarılırlar. Bu kanallar çoğunlukla sinaptik yarığa nörotransmitter salgılayan presinaptik bölgede bulunurlar. G proteinini beta ve gama alt ünitelerinin N tipi  $Ca^{2+}$  kanalları ile etkileşimi girerek  $Ca^{2+}$  akışı engellenir ve presinaptik uçtan salınan nörotransmitter salınımı engellenmiş olur (Mochida ve ark. 2018).



Şekil 2.1. Mü opioid reseptör sinyalleşme mekanizması. (Biorender.com kullanılarak ve lisanslı olarak oluşturulmuştur).

Opioid sistemi çeşitli homeostatik düzenlemelerde de rol almaktadır. Bunlardan bazıları; sıcaklığın regülasyonu, ödül sistemi, nosiseptif yanıtın düzenlenmesi, besin ve su alımıdır.

### 2.1.1. Opioid reseptörlerin alt tipleri, lokasyon ve fonksiyonları

Günümüze kadar mü ( $\mu$ ), delta ( $\delta$ ), kappa ( $\kappa$ ), ve nosiseptin/orfanin FQ reseptörleri (NOR/ORL1) olmak üzere 4 farklı tipte opioid reseptörünün olduğu bildirilmiştir. Reseptörler

gruplandırılırken farmakolojik, hücresel, moleküler ve genetik özellikleri göz önünde bulundurulmuştur (Dhawan ve ark. 1996). Yine reseptör tipleri de kendi aralarında 3 alt gruba omuriliğin arka boynuzu, rostroventralmedulla (RVM), ventraltegmental alan (VTA), amigdala gibi beyin bölgelerindeki varlığı belirlenmiştir (Pert ve Snyder 1973).

### ***Mü opioit reseptörleri***

Literatürde, morfin ve endorfinler için primer bağlanma bölgesi olan bu reseptörler opioitlerin tedavi edici ve yan etkileri ile ilişkili olarak esas mediyatör olarak bilinen mü opioit reseptörleri (MOR) olarak tanımlanmıştır (Jankovic ve ark. 1994). MOR'lar serebral korteks, periaquaduktal gri madde (PAG), amigdala ve kaudat putamende yoğun olarak ifade edilmektedir. Aynı zamanda medulla spinalisin arka boynuzundaki primer afferent nöronlarda presinaptik terminallerde bulunur, A<sub>δ</sub> ve C liflerinden iletilen ağrı sinyallerinin taşınmasını engelleyerek ağrı kesici görevi görürler (Pasternak ve ark. 2014). Ancak ağrıyı engelleyici etkilerinin yanı sıra bağımlılık, solunumun bastırılması, tolerans, kabızlık ve kötüye kullanma gibi zararlı etkileri ciddi tıbbi komplikasyonlara yol açıp sonunda ölüme kadar gidebilecek ağır bir tabloya yol açabilmektedir (Pasternak ve ark. 2018).

### ***Mü opioit reseptörlerinin etkileri Mü opioit reseptörlerinin stres üzerine olan etkisi***

MOR'lar merkezi stres tepkisinin azaltırlar ve bunu lokus seruleustan norepinefrinin salgılanmasının engelleyerek gerçekleştirirler. MOR, hipotalamustaki paraventriküler nükleustan kortikotropin salgılatıcı hormonun salınımını inhibe eder ve norepinefrin salgılanması baskılanır bu sayede stres azaltıcı etki oluşur. MOR'lar, travma sonrası stres bozukluğunun azaltılmasında da etkilidir (Toubia ve Khalife 2019).

### ***Mü opioit reseptörlerinin ruh hali ve ödül sistemine olan etkisi***

Limbik sistemde oldukça yoğun miktarda bulunan MOR'lar ile duygu durum düzenlenmektedir ve duygu durum bozukluklarının tedavisinde bu reseptörlerin kullanılma potansiyeli vardır. Beyindeki ödül merkezi, VTA'dan oluşur ki bu alan mezolimbik dopamin sisteminde yer alan ventral striatuma projeksiyon gönderir. MOR'un stimülasyonu, gama aminobütirik asit (GABA) salgılanmasını inhibe edip dopamin salınımını tetikler. Dopamin, opioitlerin yarattığı ödüllendirici etkileri ortaya çıkarır (Hasani ve Bruchas 2011).

### ***Kappa opioit reseptörleri (KOR)***

KOR'lar ağrı farkındalığı, ruh hali, ağrı algısı ve motor kontrol üzerine etkilidir. Dinorfinler KOR'ları uyarır ve morfin de reseptöre bağlanarak spinal düzeyde analjezik etki gösterir. Bunun yanında bu bağlanma, postgangliyonik nöronal uçtan asetilkolin (ACh) salgılanmasını azaltır (Baser ve ark. 2021). Kronik ve şiddetli ağrı tedavisinde KOR agonistleri kullanılmaktadır (Wadenberg 2003).

### ***Delta opioit reseptörleri (DOR)***

DOR'ların aktivasyonu enkefalinler aracılığı ile meydana gelmektedir. Reseptöragonist etkileşiminden sonra spinal seviyede analjezik etki oluşur. Kortekste, limbik sistemde ve bazal gangliyonlarda DOR reseptör yoğunluğu oldukça fazladır (Peng ve ark. 2012). DOR aktivasyonunun kortikal nöronlardaki nöron harabiyetini azaltma yönünde etkisinin olduğu (Zhang ve ark. 2000) ve hipoksik hasarı hafiflettiği bilinmektedir (Lunzer ve Portoghese 2007).

### ***Nosiseptin orfanin FQ reseptörleri***

Dopamin agonisti olarak görev alan bu reseptörler 1990'lı yıllarda tanımlanan opioit reseptörleridir. Hafıza, öğrenme, bellek, anksiyete, depresyon, epilepsi/nöbetler, beslenme, ağrı iletilmesi, motor aktivite, kardiyovasküler sistem ve ilaç bağımlılığını da içeren birçok farklı alanda rol alır (Toll ve ark. 2016).

#### **2.1.2. Ödül sistemi üzerinde opioitlerin rolü**

Nükleus akumbens haz alma merkezi olarak tanımlanır ve nükleus akumbensten dopamin salınımı mezolimbik yolun uyarılması sonrası artmaktadır (Chiara 2000). Ancak mezolimbik sistem amigdala, ventral striatum, hipokampus ve prefrontal korteksten gelen uyarılarla uyarılır ve nükleus akumbenste dopamin artışı ortaya çıkar (Koob ve ark. 2004). Bu sebeple yüksek miktarda ilaç kullanımı beyindeki ödüllendirici dopamin yollarında düzensizliğe neden olabilmektedir (Listos ve ark. 2016). Bundan yola çıkarak morfinin ödüllendirici etkisinin VTA'nın GABA'erjik kısmında bulunan MOR aktivasyonu ile yakından ilişki içinde olduğu düşünülmektedir. Bu durum GABA salınmasını inhibe ederek öfori duygusu uyarır, dopaminerjik nöron inhibisyonu devre dışı kalır ve nükleus akumbensten dopamin salınarak madde bağımlılığı ortaya çıkar (Bodnar 2013). Dopaminerjik sistem, MSS'deki diğer nörotransmitterler ve nöromodülatörlerden etkilenir ve dolaylı olarak morfin bağımlılığının farklı aşamalarında etkili olur. Bu nörotransmitterler adenozin (Listos ve ark.

2016), serotonin (Reith ve ark. 1997), noradrenalin (Frankowska ve ark. 2008), glutamat (Ghanizadeh ve ark. 2015),  $\gamma$ -aminobütirik asit (Frankowska vd., 2008), nitrik oksit (NO)

(Sahraei ve ark. 2007) ve diğerleridir. Ödül yolağında bulunan bu nörotransmitterler aktive olduğunda potansiyel olarak ilaç bağımlılığında oluşan özlem hissini tetikleyebilmektedir.

### **2.1.3. Morfin**

#### ***Morfinin tarihçesi ve yapısı***

Morfin, latince adıyla Papaver Somniferum olarak bilinen haşhaş bitkisinde doğal şekilde oluşan bir maddedir. İlk olarak F. Wilhem Adam Setürner tarafından izole edilen morfin, yaş meyve halindeki haşhaş bitkisinin dışında bulunan kabukların çizilmesi ile elde edilen meyve özsularının kurutulmuş halidir (Uhl ve ark. 2019). Morfinin en önemli özelliği analjezik etki göstermesidir. Postoperatif dönemde oluşan ağrılar, kanser kaynaklı ağrılar ve orta/yüksek şiddetli ağrılarda sıklıkla kullanılmaktadır (Christie 2008). Günümüzde kliniklerde en çok tercih edilen opioit ajan olup bunun yanı sıra uzun süre kullanıldığında bağımlılık oluşturma riskiyle beraber bırakıldığında yoksunluk sendromu oluşturabilmektedir (Uhl ve ark. 2019).

#### ***Morfinin akut ve kronik etkileri***

Opioit reseptörleri, beynin farklı bölgelerinde bulunan kalsiyum ve potasyum kanalları üzerinde etkilidir ve bu kanallar opioit reseptör aktivasyonu için oldukça önemlidir (Marker ve ark. 2005).

Kronik morfin maruziyeti, G proteini reseptör kinazlar aracılığıyla opioit reseptörlerinin fosforilasyonunu tetikleyerek opioit reseptörlerini  $\beta$ - arrestin bağları için hazırlar. Bu bağlar G protein aracılı sinyalleri inhibe ederek opioit reseptörlerin duyarsızlaşmasına neden olurlar (Allouche ve ark. 2014).

Akut ve şiddetli ağrılarda uygulanan morfin en çok MOR'a affinite göstererek opioit reseptörleri aktive eder ve bu durum histamin salınımında artışa, bronkospazma ve hipotansiyona neden olur (Pergolizzi ve ark. 2008). Ağız yolu ile alınan morfin sindirim sisteminden tamamen emilir ancak presistemik eliminasyondan dolayı ilacın biyoyararlılığında azalma meydana gelir. İntramuskuler veya cilt altı olarak uygulanan morfin enjeksiyonun etkisi yaklaşık 20. dakikada başlar 45-90 dakika arasında maksimum etki değerine ulaşır, bu etki 4-6 saat sürebilir. İntravenöz uygulamalarda ise ağrı kesici etkisi yaklaşık 1-2 dakikada başlar ve

10.-20. dakikalarda pik yapar. Ancak bu etki kısa sürelidir. Morfin vücuda alındığında, 24 saat içinde yaklaşık olarak % 90 oranında eliminasyona uğrar (Kayaalp 2000).

### ***Morfin Bağımlılığı***

Morfine kronik maruziyet fizyolojik ve psikolojik bağımlılığa neden olur (Goodman 2008). Psikolojik bağımlılık fizyolojik bağımlılıktan daha önce oluşurken psikolojik bağımlılık ilaca duyulan özlemlerle kendini belli etmektedir. Fizyolojik bağımlılık, opioit reseptör antagonistlerinin uygulanmasıyla veya uygulanan ilacın aniden kesilmesi ile meydana gelmektedir (Taylor ve ark. 2016). Zaman içinde morfin toleransı da gelişebilmektedir (Nakamoto ve ark. 2012).

### ***Morfin yoksunluğu***

Deneyisel çalışmalarda morfin yoksunluğu için çoğunlukla nalokson tercih edilmekte ve sıçanlara yaklaşık 1-6 mg/kg dozda uygulanmaktadır (Hooshmandi ve ark. 2017). Morfin yoksunluğunun insanlardaki belirtileri arasında sıklıkla öksürük, hapşırma, ishal, anksiyete, burun akıntısı, karın ağrısı ve anoreksi gibi etkiler bulunmaktadır (Harris ve ark. 2005). Hayvanlardaki ise titreme, diş çıtırdatma, zıplama, salya çıkarma davranışı ve dışkılama davranışında artış görülür (Zhang ve Schulteis 2008). Morfin çekilmesi belirtilerinin doğrulanabilmesi için davranışların tekrar sayısı önemlidir (Taylor ve ark. 2016).

### ***Morfin toleransı***

Morfinin uzun süreli ve tekrarlı kullanımı sonucunda morfin toleransı oluşmaktadır (Nakamoto ve ark. 2012) ve farmakokinetik, farmakodinamik ve öğrenilmiş tolerans olarak üçe ayrılmaktadır. Metabolizmadaki değişimler veya ilaç dağılımı farmakokinetik toleransa; bazı davranışların ilacı kullanırken edinilmesi öğrenilmiş toleransa; ilacın ortamdaki konsantrasyonunun artması ile opioit reseptörlerinin olumsuz yönde etkilenmesi ve ilacın farmakolojik etkilerine karşı gelişen tüm nörouyumsal adaptasyonlar farmakodinamik tolerans olarak isimlendirilir (Mitra ve Sinatra 2004).

#### **2.1.4. Nalokson**

Nalokson, mü opioit reseptör antagonisti olup karaciğerde metabolize edilmektedir (Ngai ve ark. 1976; Çimen 2020). Nalokson, opioitlerin aşırı doz kullanımında tedavi amaçlı kullanılmaktadır. Nalokson MOR, DOR ve KOR'un tümünü bloke edebilme kapasitesine sahiptir ancak MOR'lar naloksona karşı diğer reseptörlerden çok daha duyarlıdır. Naloksonun

intravenöz enjeksiyonundan yaklaşık 2 dakika sonra etkisi başlar ve vücuttaki eliminasyonu hızlıdır.

## **2.2. Bağımlılık Süreçlerinde Hipokampus ve Hipokampal Nörogenez**

### **2.2.1. Hipokampal nörogenez**

Hipokampus, yeni belleğin edinilmesinde esas rolü üstlenmekte ve bölgesel olarak dentatgirüs, CA1 ve CA3'ten oluşmaktadır. Duysal bilgi entorinal korteksten dentat girusa, dentat girustan yosunsu liflerle CA3 alanına ve CA3 bölgesinden Schaffer kollateralleriyle CA1 piramidal nöronlarına yayılır, CA1 piramidal nöronları da kortekse tek yönlü projeksiyon yaparak trisinaptik hipokampal döngüyü oluşturan uyarı mekanizmasını şekillendirir. Trisinaptik döngüyü içeren her bölge, spesifik hücre tiplerine ve fonksiyonel plastisiteye sahiptir ki bunlar da uzun süreli spasyal, deklaratif ve asosiyatif belleklerin kazanılması, depolanması ve konsolidasyonuna katkı yaparlar (Burgess ve ark. 2002; Squire 2004).

Hipokampusun bağımlılıkla ilişkili davranış süreçlerinde etkili olan nörobiyolojik değişikliklerde rol oynayabileceği ve bağımlılık oluşturan maddelerle ilgili çevresel ipuçları hakkındaki bilgiyi depoladığı ortaya konmuştur (Belujon ve ark. 2011; Castilla ve ark. 2016).

Nörogenez yeni nöronların oluşumu ve gelişmesiyle birlikte, nöroplastisitenin özel bir formu olarak nöronal ağların yeniden meydana gelmesi ve organize edilmesi süreçlerini kapsamaktadır. Bu süreç, kök hücrelerin proliferasyonu ve artmasıyla başlar, farklılaşma ve olgunlaşmayla devam eder. Yetişkin memeli beyinde nörogenez 2 temel bölge olan subventriküler zon ve hipokampal dentat girusta belirgin olarak ortaya çıkmaktadır (Ming ve ark. 2005; Drew ve ark., 2013). Genç yetişkin sıçan hipokampusunda her gün yaklaşık 1000 yeni nöron kök hücrelerden olgunlaşmaya başlar (Lledo ve ark. 2006; Amrein ve ark. 2011). Dentat girustaki subgranüler zonda yer alan tip 1 radyal gliya benzeri hücreler progenitör hücreler olan tip 2 hücrelere ve onlar da nöroblastlara (tip 3 hücreler) farklılaşırlar (Gonçalves ve ark. 2016). Nöroblastlar olgun dentat girus granüler nöronları oluştururlar. Bu süreç yaklaşık olarak bir ayda ortaya çıkmaktadır. Gliyal fibriler asidik protein (GFAP), nestin, Sox-2 ekspres eden radyal gliyal hücreler nöral kök hücre özelliği göstermektedir (Lagace ve ark. 2007). GFAP, nestin ve Sox-2 tip 1 hücre farklılaşmasında, PSA-NCAM tip 2 hücre farklılaşmasında ve doublecortin ile Neun tip 3 hücre ve immatür nöron farklılaşmasında nörojenik belirteç olarak rol oynamaktadır (Gonçalves ve ark. 2016). Kalretinin ve kalbindin ise matür nöronlara özgüdür. Yetişkinlerdeki hipokampal nörogenez, öğrenme ve bellek başta olmak üzere

affektivite, ruh durumu gibi birçok bilişsel süreçte önemli rol oynamaktadır (Lazarov ve ark. 2016).

Subgranüler zondaki glutamaterjik NMDA reseptör (NMDAR) aktivasyonunun nöronal sağkalımı artırdığı gösterilmiştir (Tashiro ve ark. 2006). Bu etki büyük ölçüde antiapoptotik Bcl-2 uyarımına bağlıdır (Kuhn ve ark. 2005). Akt1 sinyalleşmesi de Bcl-2 uyarımını artırarak nöronal sağkalımı desteklemektedir (Fuchs ve ark. 2014). Böylece subgranüler zonda oluşan yeni nöronlardaki apoptoz Bcl-2/Bax aktivitesi üzerinde odaklanmaktadır. Bazı büyüme faktörlerinin dentat girustaki nörogenez mekanizmalarını stimüle ettiği bilinmektedir. Transforming growth factor  $\beta$ 1 (TGF  $\beta$ 1) ve insülin benzeri büyüme faktörü 1 (IGF1) subgranüler zondaki granül hücre sağkalımını artırmaktadır (Kandasamy ve ark. 2014). IGF1'in dentat girus progenitör hücrelerde proliferasyonu indüklediği belirlenmiştir (Lichtenwalner ve ark. 2001). Beyin derive nörotrofik faktör (BDNF) ve reseptörü olan tropomisin reseptör kinaz B (TrkB) sinyalleşmesinin hipokampal nörogenezi belirgin olarak uyardığı gösterilmiştir (Bergami ve ark. 2008).

Hipokampal nörogenezin Alzheimer hastalığı, depresyon, inme gibi bazı nöropsikiyatrik patolojilerde belirgin olarak azaldığı detaylı olarak bilinmektedir (Micheli ve ark. 2018). Opioit bağımlılığının da hipokampal nörogenez üzerinde olumsuz etkileri belirlenmiştir (Bortolotto ve ark. 2017). Morfin bağımlılığı oluşturulmuş sıçanlarda hipokampal subgranüler zondaki nöral progenitör hücre proliferasyonu belirgin olarak azalmıştır (Liu ve ark. 2018). Kronik morfin uygulanması sonucu, dentat girustaki azalmış proliferasyonu kompanse etmek üzere subgranüler zondaki nörojenik mikro çevre upregüle olmuştur (Arguello ve ark. 2009). Böylece opioitler nörogenez üzerindeki etkileri aracılığıyla, duygulanım, ruh durumu, emosyon ve öğrenme-bellek işlevlerini değiştirebilirler (Kibaly C ve ark. 2019).

### **2.2.2. Hipotalamik Nörogenez**

Otonomik fonksiyon ve davranış modalitelerinde de etkin role sahip olan hipotalamus, enerji metabolizması, üreme, sirkadiyen ritim düzenlenmesi gibi birçok işlevde önemli görevler üstlenen ve 3. ventrikülü çevreleyen bir limbik sistem bölgesidir. Bu işlevler hipotalamustaki özel nöron grupları ve belirli nükleuslarda koordine edilmektedir. Hipotalamus, yetişkinlerde nörogenezin devam ettiği ve yaşlanma döneminde de etkin olduğu önemli bir bölge olarak ön plana çıkmaktadır (Chaker ve ark. 2016). Nörogenez sonucu hipotalamusta oluşan yeni nöron oranı sıçan beynindeki toplamın % 1-37'sini oluşturmaktadır (Migaud ve ark, 2010). Bu miktar BDNF ve IGF1 gibi bazı büyüme faktörleri uygulandığında artmaktadır (Pencea ve ark. 2001).

Arkuat nükleus ve medyan eminens hipotalamik nörogenezde etkin bölgelerdir. Nöroblastların arkuat nükleusa göç ettikleri oreksijenik ve anoreksijenik nöronlara farklılaşarak leptin gibi bazı periferik sinyallere yanıt verdikleri ileri sürülmüştür (Zainuddin ve ark., 2012). Ayrıca hipotalamik nöronal öncül hücrelerin yüksek sıcaklık (Matsuzaki ve ark. 2009), yüksek yağlı diyet (Nascimento ve ark. 2016) gibi etkilerle modifiye edilebileceği gösterilmiştir. Bu bilgiler ışığında hipotalamik nöronal öncül hücrelerin, kan beyin bariyerinin bulunmadığı medyan eminens aracılığıyla periferik ve nöroendokrin sinyalleri alarak, homeostaz ve nöroendokrin regülasyonda rol oynayabilecekleri ifade edilmiştir (Paredes ve ark. 2016).

### **2.3. Semaforin Proteinleri**

1990'lı yıllarda Alex Kolodkin ve ekibi tarafından keşfedilen SMF'ler farklı fizyolojik sistemlerin fonksiyonu ve gelişiminde anahtar rol alan, özellikle sinir sisteminin embriyonik gelişim sürecinde görev yapan nöronal rehberlik proteinleridir. Aynı zamanda hücre çoğalması, kas-iskelet sistemi, hücre adezyonu, bağışıklık, kardiyovasküler, solunum, endokrin ve gastrointestinal sistemde farklılaşma, morfogenez, anjiyogenez gibi temel hücre fonksiyonlarını düzenleyen sinyal ligandları olarak görev yaparlar. Bununla beraber son yıllarda yapılan çalışmalarda SMF'lerin reseptörleri olan NRF ve PLA'ya bağlanarak, otoimmün, kanser ve alerjik bozukluklara kadar çeşitli hastalıkların patogenezinde yer aldığı ortaya konmuştur (Movassagh ve ark. 2018).

#### **2.3.1. Semaforin proteinlerinin yapısı ve sınıflandırılması**

SMF protein ailesi, yapısal olarak farklılık gösterir ve bu farklılıklarından dolayı 8 alt sınıfa ayrılır. 1 ve 2. sınıf omurgasızlarda, 3, 4, 5, 6 ve 7. sınıf omurgalılarda, V sınıf ise virüslerde bulunur. 5. sınıf omurgalılar ve omurgasızların her ikisinde de bulunmaktadır. 2., 3., V sınıfları sekretuar proteinler olup 1., 4., 5., 6. sınıflar ise transmembran proteinlerdir. 7. sınıf proteinler plazma zarına glikofosfatidilinositol yardımıyla güçlü biçimde bağlanmıştır. SMF proteinleri ailesinde salgılanmış, membrana bağlı ve transmembran proteinler yer alır (Lu ve ark. 2020).

SMF domeini tüm SMF proteinlerinde N terminallerinin ucunda bulunur ve SMF sinyal iletimi ve temel aktivitesi için gereklidir. SMF 3A kısmı, karboksi terminalinde (C-terminal) bulunan PSI domein ile bağlıdır. Yapısal olarak SMF 3A ve PSI domein kısımları tüm SMF proteinlerinde yer almaktadır (Alto ve ark. 2017). SMF proteinlerinin farklı alt sınıf proteinleri spesifik yapısal domein ile karakterizedir.

SMF 1 alt sınıfında; SMF 1A ve SMF 1B transmembran proteinleri bulunmaktadır. SMF 2 alt sınıfında; SMF 2A ve SMF 2B sekretuar proteinleri vardır. SMF 3 alt sınıfı; SMF 3A, SMF 3B, SMF 3C, SMF 3D, SMF 3E, SMF 3F, SMF 3G olarak 7 proteinden meydana gelen sekretuar protein grubudur. SMF 4 alt sınıfında transmembran proteinler olan SMF 4A, SMF 4B, SMF 4C, SMF 4D, SMF 4E, SMF 4F, SMF 4G bulunur. SMF 5 alt sınıfında SMF 5A ve SMF 5B transmembran proteinleri yer almaktadır. SMF 6 alt sınıfı; SMF 6A, SMF 6B, SMF 6C, SMF 6D transmembran proteinlerini içerir. V alt sınıf SMF'ler SMF VA ve SMF VB sekretuar proteinlerinden oluşur. SMF 7 alt sınıfı SMF 7A proteinini içerir.

### **2.3.2. Semaforin 3A (SMF 3A)**

SMF 3A, vücuttaki birçok dokuda yaygın şekilde eksprese edilmektedir ancak en fazla sinir sisteminde, özellikle de gelişim sırasında hem nöronal hem de nöronal olmayan hücrelerde eksprese olmaktadır. Bu durum SMF 3A'nın nöronal gelişim süreçlerinde oldukça önemli bir rol üstlendiğini ve SMF 3A sinyalizasyonundaki olası değişikliklerin nöronla büyümedeki fizyolojik süreçleri ve farklılaşmayı etkilediğini göstermektedir (Matrone ve ark. 2023).

SMF 3A, nöronlardaki aksonal uzamayı ve dendritik ağaçlanmayı kontrol ederek (Feretti ve ark. 2022) serebral korteks, hipokampus ve amigdala gibi ana beyin yapılarının modelizasyonuna katkıda bulunmaktadır (Carulli ve ark. 2021). Kortekste SMF 3A, postmitotik kortikal ve GABA nöronlarının radyal göçünü kontrol eder (Limoni ve ark. 2021). Dahası, SMF 3A ve SMF 3C'nin nöronlar üzerindeki itici ve çekici etkileri, ilk eferent aksonların kortikal plakadan çıkıp talamusa ulaşmasını sağlar, böylece nöronların ventriküler bölgeye girmesini önler ve uygun katman organizasyonunu korur (Bagnard ve ark. 2001). Ayrıca SMF 3A, kortikal dendritleri pial yüzeye doğru yönlendirir (Polleux ve ark. 2000) ve dendritlerin büyümesi ile dallanmasını destekler (Fenstermaker ve ark. 2004).

SMF 3A, aksonal büyüme konisinin çökmesini ve geri çekilmesini tetikleme yeteneği nedeniyle omurgalılarda tanımlanan ilk SMF'dir (Osborne ve ark. 2007). SMF 3A yolundaki değişiklikler epilepsi gibi çeşitli nöron hastalıklarında rol oynamaktadır (Carulli ve ark. 2021).

### **2.3.3. Semaforin proteinlerinin fizyolojik fonksiyonları**

SMF proteinlerin yapısal özellikleri, alt gruplarının çeşitliliği, farklı reseptörlere bağlanarak farklı etkiler oluşturması, fizyolojik süreçlerde oldukça önemli rol oynamaktadır. SMF proteini ilk keşfedildiği yıllarda akson rehber molekülü olarak tanımlanmıştır ancak ilerleyen yıllarda yapılan çalışmalarla birlikte SMF proteinlerinin immünomodülasyon, kemiklerde remodelizasyon, anjiyogenez ve tümör neovaskülarizasyonu gibi hem fizyolojik

hem de patolojik birçok süreçte de önemli görevler üstlendikleri ifade edilmiştir (Lu ve ark. 2020).

Bunun yanı sıra SMF proteinlerinin kan damarlarının oluşumunda, nöral krest hücrelerinin göçünün kontrolünde, kalp gelişiminde ve miyokardiyal katmanların farklılaşmasında rol aldıkları belirtilmektedir. SMF proteinleri anjiyogenez sürecinin spesifik adımlarında ya anjiyogenezin promotörleri ya da inhibitör olarak rol almaktadır. SMF'ler aynı zamanda bağışıklık tepkisini tetikleyen yolları modüle etme yeteneğine de sahiptir ve bu da büyüme faktörleri, kemokinler ve sitokinler gibi çözünebilir faktörlerin salgılanmasına neden olur (Kiseleva ve ark. 2022; Eiza ve ark. 2023).

SMF'lerin kemik metabolizması ve kemik hastalıkları sürecinde öncü hücre füzyonunun aktivasyonunu meydana getirerek osteoklast ve osteoblast aktivitesinin düzenlenmesinde, osteoklast farklılaşmasında ve SMF proteinleri gen polimorfizmi ile kemik mineral yoğunluğu ilişkisinde oldukça önemli rol aldıkları yapılan çalışmalarda belirtilmiştir. Bununla birlikte bağışıklık hücrelerinin göçlerinde aracılık ettiği ve immünyetede önemli rol aldığı belirtilmiştir. Yine, kas, böbrek, göz akciğer ve diğer dokulardaki muhtemel rolleri halen araştırma konusudur (Fard ve ark.2021; Lu ve ark. 2020).

SMF proteinleri sinir sisteminde nöral çoğalma, nöral göçün düzenlenmesi ve nöral polaritenin belirlenmesinde kritik bir öneme sahiptir. Sinaps oluşumu, oluşan sinapsların fonksiyonunun düzenlenmesi ve dendrit morfolojisi üzerinde önemli etkileri bulunmaktadır. Bunun yanı sıra PLA-SMF sinyalleşmesi glia ve nöronlar arasındaki iletişimde rol alır. Aynı nöronun birden fazla gelişim süreci bulunmaktadır ve SMF'ler bu süreçlerde rol oynayarak, hücre içindeki sinyal içeriğine göre cevap oluşturulmasına aracılık eder. Bunun yanı sıra sinaptik plastisite üzerinde de önemli görevleri bulunmaktadır (Gu ve ark. 2012; Alto ve ark. 2017).

SMF'lerin ve reseptörlerinin hem fizyolojik hem de patolojik süreçlerdeki rolleri düşünüldüğünde parkinson, alzheimer, epilepsi ve anksiyete bozuklukları gibi çeşitli nörodejeneratif, nörogelişimsel ve psikiyatrik hastalıklar ile ilişki içinde olduğu aşikardır. Bu hastalıkların başlaması ve ilerleme sürecinde SMF'lerin hem fonksiyonunun hem de ekspresyonunun, ilgili hastalıkların karakteristik yönlerinin meydana gelmesini sağlayan sinaps kaybı veya sinaptik yeniden düzenleme gibi nöronal bağlantılarda meydana gelebilecek farklılaşmalara neden olabileceği çeşitli çalışmalarla ortaya konmuştur (Alto ve ark. 2017).

SMF proteinlerinin karakterizasyonuna yönelik bilgiler önemli ölçüde edinilmiştir fakat, SMF proteinleri arasındaki etkileşimin hangi düzeyde olduğu, SMF'lerin işlevleri ve

moleküler etki mekanizmalarına yönelik gerçekleştirilecek olan ayrıntılı çalışmalara ihtiyaç bulunmaktadır.

Bunun yanı sıra SMF proteinlerinin kanser, retina dejenerasyonu, kemik mineral yoğunluğu, mutasyon, azalmış romatoid artrit gibi patolojik süreçlerle ilişkileri açıklanabilmiştir fakat davranışlar, düşünceler, hafıza ve duygu ile ilgili olan sinirsel bağlantılardaki olası rolleri henüz tam olarak açıklığa kavuşturulamamıştır. Sonuç olarak SMF'lerin karakterizasyonu ve sinyal iletim mekanizmalarına yönelik edinilebilecek daha yeni bilgiler ile hastalıkların patolojik mekanizmalarında semaforinerjik iletişimin ne gibi roller üstlendiği daha rahat anlaşılacaktır.

#### **2.3.4. SMF 3A proteininin fizyolojik fonksiyonları**

SMF protein ailesinin tanımlanan ilk üyesi SMF 3A'lardır. SMF 3A grubu fizyolojik etkilerini NRF1, PLA1, PLA2, PLA3, PLA4 reseptör/koreseptör sinyal iletimi yoluyla göstermektedir (Alto ve ark. 2017; Movassagh ve ark. 2018). Fareler ile yapılan bir çalışmada, SMF 3A mutasyonu olan farelerde anormal sempatik nöron inervasyonuna bağlı olarak kalpte inervasyon defektleri oluşmuştur. Bu durum SMF 3A'nın kardiyak inervasyonda rol aldığını göstermektedir (Ieda ve ark. 2009). SMF 3A integrin işlevini baskılayarak damar oluşumunu kontrol etmektedir ve vasküler geçirgenliği arttırmaktadır (Treppe ve ark. 2013). SMF 3A eksikliği olan farelerde osteogenezisin azaldığı bildirilmiştir (Behar vd., 1996). SMF 3A/NRF1 sinyal iletimi de osteoblastik kemik oluşumunu artırarak ve osteoklastik kemik rezorpsiyonunu baskılayarak bir osteoprotektif etki de göstermektedir. Böbreklerde ise SMF 3A'nın düzenlediği, SMF 3A ekspresyon düzey artışının farelerde glomerüler disfonksiyona yol açtığı ve üreter tomurcuğunun dallanmasını negatif yönde etkilediği bildirilmiştir (Reidy ve ark. 2011). Meme kanseri ve prostat kanserinde SMF 3A proteininin hücrelerin hareketliliğini azalttığı ortaya konmuştur (Yin ve ark.2021).

#### ***SMF 3A proteininin sinir sistemindeki rolü***

SMF 3A akson/dendrit büyümesini ve nöronal göçü yönlendiren bir faktördür ve MSS' de duyuşal ve periferik motor liflerin etrafındaki bölgelerde eksprese edilerek gelişmekte olan nöronların yanlış yönde filizlenmesini engeller ve aksonla dendrit gelişiminde polarize edici etkisi vardır (Alto ve ark. 2017).

SMF 3A'nın entorhinal kortekste bulunan stellat hücrelerinde, hipokampus formasyonunda yer alan granül, piramit ve hilar hücrelerinde ekspresyonunun olduğu bilinmektedir (Tamagnone ve ark. 2008). Hipokampal gelişme süresinde SMF 3A proteinlerinin

entorhino-hipokampal bağlantısının büyümesinde ve olgunlaşmasındaki etkileri gösterilmiştir. SMF 3A yosunsu liflerin önemli düzenleyicilerinden biri olup aksonların entorhinal korteks, granüler ve piramidal katmanlardan sitriatum ve moleküler tabakadaki uygun hedeflerine göç etmesini kolaylaştırmaktadır (Gill ve ark. 2019).

SMF proteinleri, sinir sistemi hasarı oluşumu sonrasında özellikle nöronlarda apoptozu düzenlemede etkindirler. SMF 3A, nöronlarda dejenerasyon sonucu oluşabilen parkinson, şizofreni, epilepsi ve alzheimer hastalığı gibi patolojilerin oluşum mekanizmalarında rol almaktadır.

### **2.3.5. Semaforin proteinlerinin reseptörleri**

Günümüzde henüz SMF proteinlerinin işlevlerini nasıl gerçekleştirdiği tam anlamıyla açıklığa kavuşturulamamıştır. SMF proteinlerine birkaç farklı protein ailesinin doğrudan bağlanmakta ve reseptör olarak rol oynamaktadır. Bununla beraber bir dizi kofaktör de SMF proteinlerinin reseptörleriyle bağlanır ve sinyal yanıtının oluşabilmesi için aktivasyonu sağlar (Yazdani ve ark. 2006).

#### ***Pleksinler (PLA)***

PLA'lar transmembran reseptörler olup, bütün SMF proteinlerinin alt gruplarının reseptörlerine bağlanarak aktivasyonlarını sağlamaktadır. PLA'lar omurgalılarda PLA1, PLA2, PLA3, PLA4, PLB1, PLB2, PLB3, PLC1 ve PLD1 olarak 9 alt gruptan oluşur. PLA'ların ekstrasellüler kısmında SMF proteinleri ile etkileşimlerini sağlayan SMF 3A domeini yer almaktadır. Ekstrasellüler alanda PSI domeini ve immünooglobulin benzeri domeini (IPT) bulundurulur. İntrasellüler alanda GAP homoloji domeini vardır. PLA'lar akson rehberliğinde ve vasküler sistemde önemli rol alırlar ve PLA'larda meydana gelebilecek herhangi bir fonksiyon kaybının birçok hastalığın ortaya çıkmasıyla ilişkili olabileceği belirtilmiştir (Alto ve ark. 2017; Movassagh ve ark. 2018).

#### ***Nörofilinler (NRF)***

NRF'ler PLA'ların koreseptörleridir. Koreseptörler ve tirozinkinazlar, SMF protein reseptörleri ile bağlanarak SMF'lerin farklı görevlerde rol almasını sağlarlar. PLA koreseptörleri arasında en iyi bilinenleri NRF transmembran proteinleri olan NRF1 ve NRF2'dir. NRF'ler, SMF alt sınıfı proteinlerinin sinyal iletimine de aracılık etmekte rol oynayan kısa intrasellüler bölgelere sahiptir (Movassagh ve ark. 2018).

SMF alt sınıf proteinlerinde bulunan özel bir alan, PLA ve NRF'den oluşan reseptör kompleksinin bağlanma bölgeleri ile etkileşime girebilir. SMF 4 alt grubunda da PLA reseptörleri ile etkileşime giren bir alan bulunur. SMF 5 alt sınıfı etkisini PLA1, PLA3, PLA3 reseptörleri aracılığı ile gerçekleştirir. SMF 6 alt sınıfı ise etkilerini PLA1, PLA2, PLA4 reseptörleri ile bağlanarak ortaya çıkarır. SMF 7 alt sınıfı ise PLC1 reseptörü ile etkileşime girerek aktive olur (Movassagh ve ark. 2018). Fizyolojik olarak SMF-NRF-PLA sinyalleşmesi çok önemli olup bu alanda birçok çalışma bulunmaktadır ancak sinyal ağının nasıl oluştuğunun mekanizması hala tam olarak açıklığa kavuşmamıştır.

#### **2.4. Opioidler ve Semaforin Proteinleri**

Dünya genelinde yaklaşık olarak 80 milyondan fazla kişiyi etkileyen opioid bağımlılığı, gittikçe büyüyen önemli bir halk sağlığı sorunudur (Herscher ve ark. 2020). Bağımlılığın moleküler ve hücresel mekanizmalarına ilişkin yeni moleküler araştırmalar ile ışık tutmak, tedavide yeni stratejiler sağlayabilir.

SMF proteinleri, özellikle son yıllarda psikiyatrik ve nörodejeneratif hastalıklar üzerine gerçekleştirilen deneysel çalışmalara konu olmaktadır. Çalışmalarda SMF-NRF-PLA sisteminin fizyolojik işleyişte önemli görevler aldığı gösterilmiştir (Yaron ve ark. 2007). SMF alt sınıfından olan SMF 3A grubu proteinlerinin dendritik dallanma, sinaptik iletim, hipokampal akson fonksiyonu ve omurga olgunlaşması üzerinde düzenleyici etkisinin olduğu yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (Yaron ve ark. 2007). Bunun yanında SMF 4A grubu proteinlerinin uyarıcı ve inhibitör sinaps gelişimi için gerekliliği ve sinaps gelişimi üzerine önemli etkilerinden bahsedilmektedir (Dermott ve ark. 2018).

#### **2.5. Bağımlılık, Semaforin Proteinleri ve Davranışsal Etkiler**

Bağımlılık, oluşum sürecinde genetik, psikososyal ve çevresel faktörlerin rol onadığı nörodejeneratif bir hastalıktır. Opioid bağımlılığı genellikle bilişsel, davranışsal ve emosyonel açıdan olumsuz etkileri olan bir durumdur (Herscher ve ark 2020). Bağımlılıkla beraber sinaptik organizasyon, hücre kaybı ve nörogenezdeki değişiklikler dahil birçok morfolojik değişiklik ortaya çıkabilmektedir. Bunun yanı sıra, eksitator ve inhibitör iletilerde fizyolojik değişiklikler ve bilginin kodlanmasında farklılıklar ortaya çıkabilmektedir. Morfolojik ve fizyolojik bu değişikliklere paralel olarak bağımlılık oluşturulmuş sıçanlarda önemli davranışsal ve bilişsel bozuklukların ortaya çıktığı belirtilmiştir. Opioid bağımlılığı, nöronal ağları etkiler ve bağımlılık ile ilgili bilişsel ve davranışsal bozukluklar, farklı beyin bölgeleri arasındaki patolojik etkileşimlerden kaynaklanmaktadır. Bağımlı bireylerde davranış bozuklukları,

öğrenme güçlükleri, sosyal izolasyon hafıza bozuklukları, dikkat eksikliği, duygudurum bozuklukları, anksiyete oluşabilir ve bu tarz komorbiditelerin neticesinde kişilerin yaşam kalitesi olumsuz yönde etkilenmektedir (Pomrenze ve ark. 2019).

Sinaptik oluşumda veya sinaptik işlevde meydana gelebilecek herhangi bir bozulma, psikiyatrik ve nörolojik hastalıklara yol açmaktadır. Son yıllarda insanlar üzerine gerçekleştirilen genetik çalışmalarda, SMF-NRF-PLA sinyal iletimi ile otizm, anksiyete, depresyon, bipolar bozukluk ve şizofreni gibi çeşitli nörodejeneratif hastalıklar arasında ilişki olabileceği belirtilmiştir (Matsuda ve ark. 2016). Bununla birlikte, SMF 3A grubunun hipokampusta sinaptik plastisitenin modülasyonunu sağlayarak hafıza ve öğrenmede önemli rol aldığı belirtilmiştir. NRF2 eksikliği olan hayvanların sosyal hafızalarının, nesne tanıma ve ardışık motor davranışlarda bozulma olduğu bilinmektedir (Shiflett ve ark. 2015). SMF F eksikliğinin, muhtemelen anormal anksiyete ile ilgili davranışları ve lokomotor aktivite azalışını indüklediği, korkuyu ve bağlamsal hafızayı arttırdığı da belirtilmiştir. Özellikle SMF 3F'nin, korku ve anksiyete tepkilerinin düzenlenmesinin altında yatan nöronal devre gelişiminde önemli rol üstlenebileceğini ifade edilmiştir (Matsuda ve ark. 2016). Huntington hastalığı olan hayvanlarda, anti-SMF 3A 4D tedavisi ile korpus kallozum atrofisi, striatal atrofi ve kortikal atrofi dahil olarak nöropatolojik belirtileri iyileştirdiği saptanmıştır (Southwell ve ark. 2015).

SMF düzeylerinin morfin bağımlılığı oluşturulan sıçanlarda gelişen bilişsel ve davranışsal fonksiyon bozukluğuna etkisini araştıran herhangi bir araştırmaya rastlanmamıştır. Çalışmamızda, deneysel morfin bağımlılığı modeli oluşturulmuş sıçanların hipotalamus ve hipokampus dokularında SMF 3A ve reseptörlerinin gen ifade düzeylerinin araştırılması amaçlanmaktadır.

### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

#### 3.1. Deneysel Hayvanları

Projede 2 farklı deneysel aşama uygulanmıştır. Deneysel aşamalar Necmettin Erbakan Üniversitesi Deneysel Tıp Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde gerçekleştirilmiştir. Etik kurul onayı Necmettin Erbakan Üniversitesi KONÜDAM Deneysel Tıp Uygulama ve Araştırma Merkezi Müdürlüğü'nden 06.07.2022 karar tarihli hayvan deneyleri etik kurul kararı ile temin edilmiştir. Projede ratlar üzerinde deneysel morfin bağımlılığı modeli oluşturulmuştur. Gruplandırılmada 300-350 gr ağırlığında toplam 48 adet yetişkin erkek Wistar Albino türü sıçanlar kullanılmıştır. Hayvanlar, 7 gün boyunca 22±1 oda sıcaklığında, 12 saat aydınlık/karanlık olacak şekilde barındırılmıştır. Hayvanların suları özel şişelerinde musluk suyu şeklinde, yemleri standart (pellet) yemi olarak verilmiştir. Testler, birbirinin devamı olan günlerde sabah 09.00-12.00 arasında yapılmıştır ve testten yaklaşık yarım saat önce deney hayvanlarının ortama uyum sağlayabilmesi amacıyla sessiz odaya alınmışlardır. Bu çalışmada kullanılan morfin hidroklorür Meram Tıp Fakültesi Hastanesi Başhekimliği'nden, Nalokson ise Sigma' dan (Kat no: N7758) temin edilmiştir.

#### 3.1.1. Morfin bağımlılığı ve morfin çekilmesi test uygulamaları

Gruplandırmalar için sıçanlar randomize olarak seçilerek 4 farklı grup oluşturulmuş ve enjeksiyonları yapılmıştır. Aşağıda tüm gruplar için yapılan uygulamalar ayrıntılı olarak verilmiştir.

1. grup (kontrol grubu, n=12): Sıçanlara 5 gün boyunca, subkutan yolla % 0.9'luk NaCl çözeltisi (SF) enjeksiyonu yapılmış ve 5. gün sabah tekrar SF enjeksiyonu tek doz olarak uygulanmış, 1.5 saat sonra son SF uygulaması yapılarak hayvanlar davranış deneylerine tabi tutulmuştur.

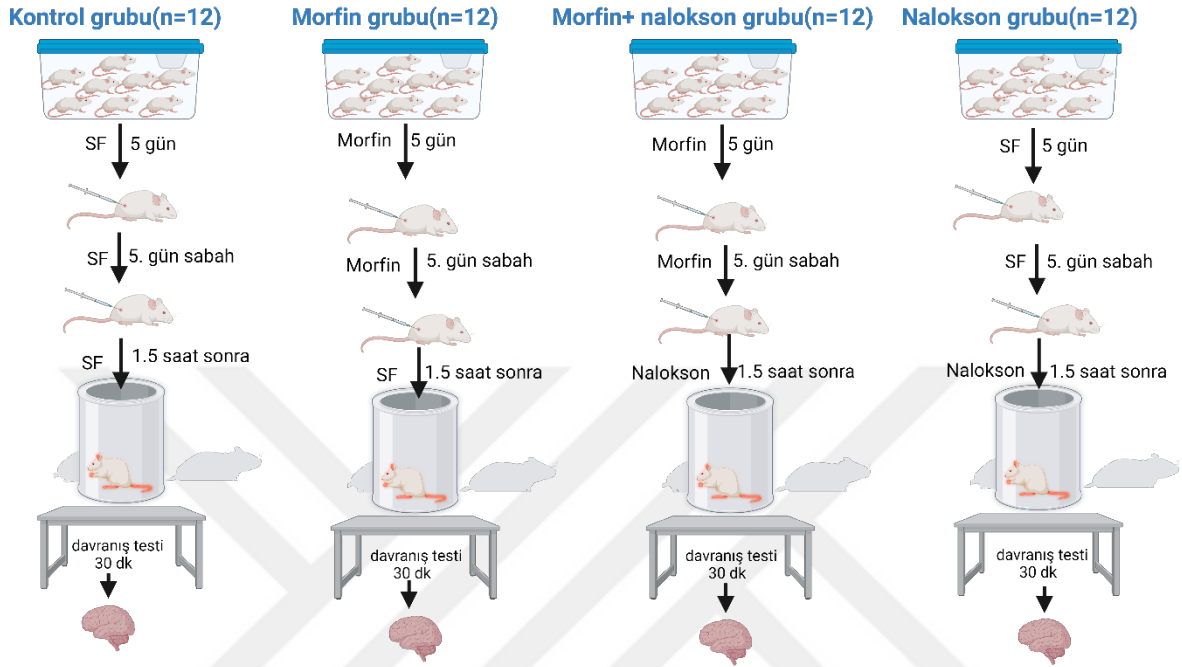
2. grup (morfin bağımlılığı grubu, n=12): Ratlara 5 gün boyunca subkutan yolla 10 mg/kg/gün dozunda morfin infüzyonu yapılmış, 5. gün sabah tekrar 10 mg/kg/gün dozunda morfin enjeksiyonu tek doz olarak uygulanmış ve 1.5 saat sonra SF uygulanarak hayvanlar davranış deneylerine tabi tutulmuştur.

3. grup (morfin bağımlılığı+nalokson grubu, n=12): Hayvanlara 5 gün boyunca subkutan yolla 10 mg/kg/gün dozunda morfin uygulanmış, 5. gün sabah tekrar 10 mg/kg/gün dozunda morfin ve 1.5 saat sonra 3 mg/kg dozda nalokson uygulanarak hayvanlar davranış deneylerine tabi tutulmuştur.

4. grup (nalokson grubu, n=12): Hayvanlara 5 gün boyunca subkutan yolla % 0.9'luk

NaCl çözeltisi (SF) infüzyonu yapılmıştır. 5. günün sabahında tekrar SF uygulanmış, 1.5 saat sonra tek doz nalokson 3 mg/kg dozda uygulanarak hayvanlar davranış yönünden izlenmiştir.

Tüm gruplardaki hayvanlar, randomize olarak seçildiği ilk günde, davranış deneylerinden önce ve sonra tartılarak vücut ağırlık değişim oranları belirlenmiştir.



Şekil 3.1. Deneylerde kullanılan gruplar ve gruplara yapılan uygulamalar (Biorender.com kullanılarak ve lisanslı olarak oluşturulmuştur).

Deney hayvanlarının tümü enjeksiyonların ardından 25 cm çapta ve 65 cm yükseklikte olan pleksiglas şeffaf silindir gözlem kafeslerine alınarak davranışları aynı araştırmacı tarafından çift kör olarak izlenmiştir. 30 dk boyunca Modifiye Gellert ve Holtzman Skalası'nda yer alan davranışlar çizelgesine göre manuel olarak skorlanmıştır. Her hayvan için morfin yoksunluk skoru belirlenerek diğer gruplarla karşılaştırması yapılmıştır (Raghav ve ark. 2018).

### ***Modifiye Gellert ve Holtzman skalası***

Aşağıdaki tabloda davranış skorlamasında kullanılan parametreler yer almaktadır. Bulgular tek yönlü varyans analiziyle değerlendirilmiştir. Sonraki aşamalar ise aşağıdaki sırayla gerçekleştirilmiştir.

Tablo 3.1. Modifiye Gellert ve Holtzman skalası

<b>Davranış</b>	<b>Skor</b>
Gözlerini Kısma Sayısı	1
Sıçrama Sayısı	2
Defekasyon Sayısı	2
Anormal Postur Sayısı	3
%1'lik vücut ağırlık kaybı	1
Tıksırma	1
Diş Çıtırdatma Sayısı	2
Islak köpek silkelenmesi	4
Yuvarlanma hareketi	2
Şahlanma sayısı	1

### 3.2. Deneyin Sonlandırılması ve Dokuların Toplanması

30 dk süren davranış skorlamasından sonra tüm sıçanların beyin dokuları hızla çıkarılarak hipotalamus ve hipokampus bölgeleri alınmış ve akabinde sıvı azot tankına konarak dondurulmuştur. Gen ekspresyon analizleri için -80 °C'de saklanmıştır.

### 3.3. Doku Örneklerinden Total RNA İzolasyonu

Ekspresyon düzey değişimlerini belirleyebilmek için hipotalamus ve hipokampus dokularından TRIzol yöntemi ile RNA izolasyonu yapılmıştır. Beyin doku numunelerinin homojenizasyonu 1000 µl TRIzol (301-001, Geneall) içerisinde yapılmıştır. Homojenatlar oda ısısında 5 dk inkübasyona bırakıldıktan sonra üzerlerine 200 µl kloroform konarak kısa süre vorteksenerek oda sıcaklığında 15 dk inkübasyona bırakılmıştır.

İnkübasyonun ardından numuneler 12000 g'de 15 dk +4 °C'de santrifüj edilerek NA'yı içeren üst faz yeni ependorf tüplere alınarak üzerlerine 500 µl izopropanol konmuş ve birkaç defa alt üst edilerek ve 10 dk oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrasında numuneler 15 dk 12000 g'de +4 °C'de santrifüj edilmiş ve ortaya çıkan RNA peletinin dibeye çöktüğü belirlenmiştir. Süpernatant kısmı atılarak peletin üstüne 1 ml %75'lik etanol konulmasının ardından ependorflar tekrar alt üst edilmiştir. Yıkama işlemin yapıldıktan sonra 12000 g'de 15 dk +4 °C'de santrifüj yapılmış ve süpernatant kısım atılmıştır. Meydana gelen pelet 5-10 dk oda sıcaklığında kurutulup, 50 µl nükleaz free su ile çözündürülerek elde edilmiş olan RNA örnekleri -80 °C'ye kaldırılmıştır.

RNA izolasyonu aşaması bittikten sonra ThermoScientific™ MultiskanSkyHigh (ThermoScientific™ Multiskan™ GO, ABD) cihazıyla RNA'ların saflığı ve miktarı tayin edilmiştir. Blank olarak NanodropPlate'i nükleaz free su eklenmiştir. Protein, fenol, ve genomik

DNA (gDNA) kontaminasyonlarını belirlemek için nanodrop cihazında, UV ölçümleri A260/A280 için  $2\pm 0,1$  ve A260/A230 için

2,0-2,4 arasında olan RNA örnekleri analizlerde kullanılmıştır.

### **3.3.1. Total RNA örneklerinin gDNA kontaminasyonunun temizlenmesi**

Oluşabilecek gDNA kontaminasyonunun önlenmesi için DNase-I (ThermoScientific; #EN0521) enzim reaksiyonu üretici firmanın yönergelerine göre uygulama yapılmıştır. 2 µg total RNA, 2 µl 10 reaction buffer with MgCl<sub>2</sub>, µl/1U DNase-I enziminden 2 µl eklenmiş, 20 µl total hacim nukleaz free su ile tamamlanarak 37 °C’de 30 dk bekletilmiştir. Oluşan reaksiyonu durdurulması için 2 µl 50 mM EDTA eklenmiş ve 65°C 10 dakika inkübasyon sağlanmıştır.

### **3.3.2. cDNA sentezi**

RNA örneklerinden cDNA elde etmek için OneScript® Plus cDNA Synthesis Kiti (ABM, #G236) kullanıldı. cDNA sentez protokolüne başlamadan önce ölçülen RNA konsantrasyonları nukleazfree su ile 100 ng’a eşitlenmiştir.

100 ng’a eşitlenen RNA örneklerini içeren tüpe sırasıyla 4 µl 5 RT Buffer, 1 µl dNTP, 1 µl Random Primers (10 µM), 1 µl OneScript® Plus RTase ile son hacim 20 µl’e nukleaz free su ile tamamlanmıştır. Tüplerin inkübasyonu T100 Thermal Cycler Biorad cihazında 55°C’de 15 dk, 85 °C’de 5 dakika 1 döngü olacak şekilde yapılmıştır. İnkübasyonun ardından tüpler buz üzerine konularak kullanılana kadar -80°C’ye kaldırılmıştır.

### **3.3.3. Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR)**

Referans ve hedef genlere ait olan ekspresyon kantitasyon analizi, gerçek zamanlı PZR cihazı Quant Studio3 cihazı (Thermo, ABD) kullanılmıştır. Reaksiyon için Eva Green (SolisBiodyne, #08-24-00001) kullanılmıştır.

5X Eva Green master mskten 2 µl, forward primerden 10 µM, reverse primerden 10 µM, 2 µl cDNA ve toplam hacim 10 µl olacak şekilde ddH<sub>2</sub>O ile tamamlanarak Polimeraz Zincir Reaksiyonu oluşturulmuştur.

Ekspresyon seviyelerinin belirlenmesi amacıyla SMF 3A, NRF1, PLA1 genlerine spesifik tasarlanan primer dizileri Tablo 3.2’de verilmiştir. Primerler Primer-Blast programı ile tasarlanmıştır.

Tablo 3.2. Ekspresyon analizinde kullanılan genlere spesifik primer dizileri

Gen	Primer dizisi	Referans*
SMF 3A	F:5'- AAGGGCTCTGCTGTGTGTAT-3' R:5'-TGGGTTGTACATGGCTGGAT-3'	NM_017310
	NRF1 F:5'-TTTCCTCCCTCAATCGTGCT-3' R:5'-CCGGGAGATGTAAGGTACCC -3'	NM_145098.2
	PLA1 F:5'- TCCCCAACTACAAGAGCTGG-3' R:5'-CGTCCTTGTACTTGGCGATG-3'	XM_002729398.6
GAPDH	F:5'- TGAACGGGAAGCTCACTGG-3' R:5'- TCCACCACCCTGTTGCTGTA -3'	Lallemant ve ark.
2009		

\*Dizayn edilen primerler için ilgili gen bankası erişim kodu.

Cihazda çalışılacak genler için aşağıda verilen tablodaki gibi program özellikleri ayarlanarak, reaksiyon 40 döngü olarak başlatılmıştır.

Tablo 3.3. qRT-PCR basamaklarının sıcaklık ve süreleri

Denatürasyon	50C' de 2 dk 95 °C' 10 dk
Amplifikasyon (40X)	95 °C' 15 sn Primer bağlanma sıcaklığında 30 sn 72 °C' 1 dk
Uzama	95 °C' 15 sn 60 °C' 1 dk 95 °C' 0.1 sn

Gerçek zamanlı PZR cihazından alınan Ct (eşik döngüsü) değerler kaydedilmiştir. Gen ekspresyon verilerinin analizinde araştırmada kullanılan tüm genlerin ekspresyon seviyelerini gösteren Ct değerleri GAPDH referans geninin Ct değerleri ile normalize edilmiş ve  $\Delta Ct$  değerleri belirlenmiştir. Deneme grupları ve kontrol arasındaki ekspresyonu değişimleri  $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$  yöntemi kullanılarak tayin edilmiştir.

### 3.4. İstatiksel Metot

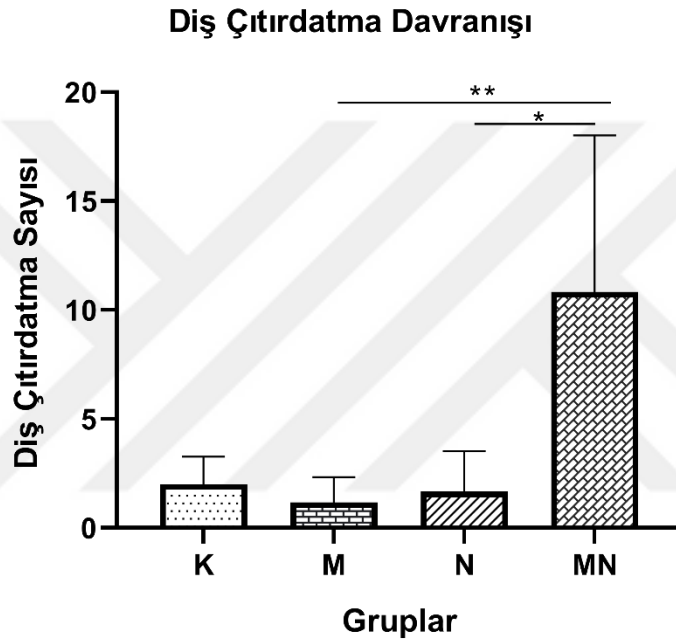
Elde edilen tüm veriler Instat İstatistiksel Paket Programı (Instat Graphad Software 8.0.1, San Diego, CA, USA) aracılığı ile analiz edilmiştir. Verilerin normalliğini test etmek için Shapiro-Wilk testi kullanılmıştır. Tek yönlü ANOVA ve ardından Tukey ikili çoklu karşılaştırma testi, eşit grup varyanslarına sahip normal dağılımlı veriler için kullanılmıştır. Anormal dağılımlı veriler için Kruskal-Wallis testi ve ardından Dunn'ın ikili çoklu karşılaştırma testi kullanılmıştır. Hayvanların ilk ve son ağırlık kıyaslaması iki yönlü ANOVA testi ile yapılmıştır.  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  değerleri ortalama  $\pm$  Ortalamanın standart hatası (SEM) olarak ve davranış deneyleri sonuçları ortalama  $\pm$  standart sapma olarak verilmiştir.  $p < 0.05$  değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

## 4. BULGULAR

### 4.1. Davranış Testi Bulguları

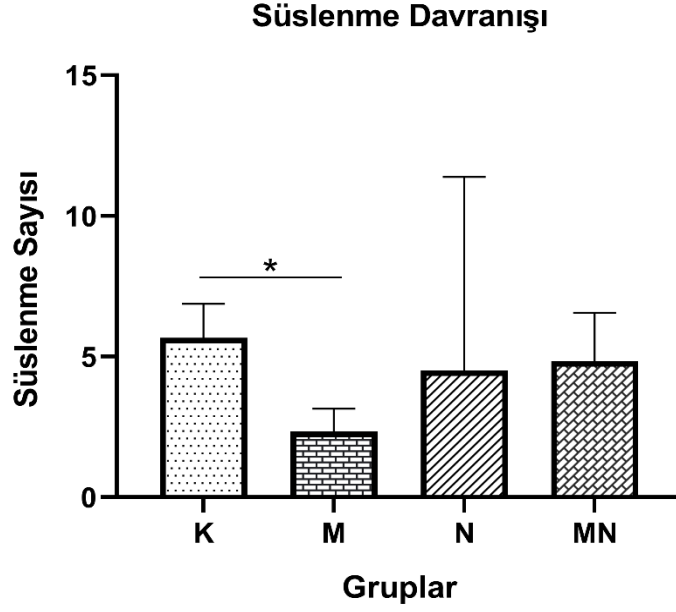
Enjeksiyonlardan sonraki 30 dk içinde tüm gruplara davranış skor testi uygulandı. Davranış skorlamaları belirlenerek  $AO \pm SS$  değerler olarak hesaplandı.

MN grubundaki dış çitirdatma sayısı M ve N gruplarıyla karşılaştırıldığında belirgin şekilde yüksekti ( $p < 0.05$ , Şekil 4.1.).



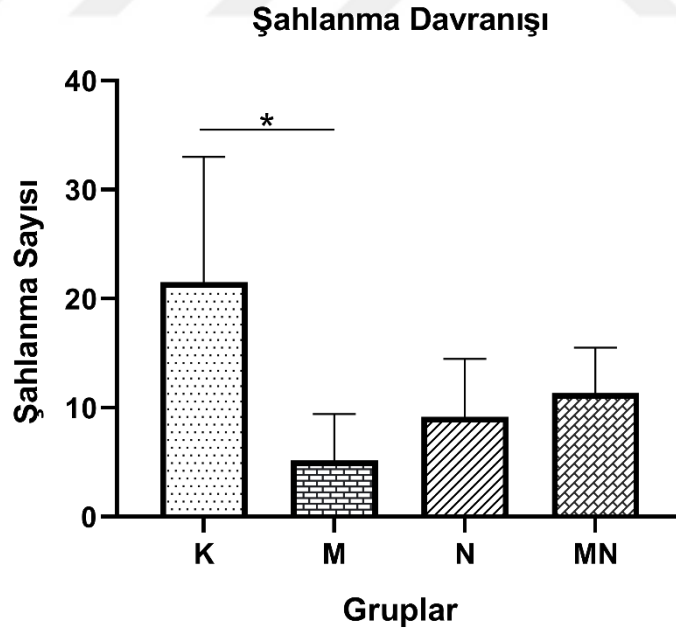
Şekil 4.1. Gruplar arası diş çitirdatma sayıları. Kontrol grubu ( $n=12$ ) (K), Morfin grubu ( $n=12$ ) (M), Nalokson grubu ( $n=12$ ) (N) ve Morfin + Nalokson grubu ( $n=12$ ), (MN) için diş çitirdatma davranış sonuçları. Veriler ortalama  $AO \pm SS$  olarak sunuldu ( $*p < 0.05$ ,  $**p < 0.005$ ).

Süslenme davranış sayıları değerlendirildiğinde M grubunun değerleri K grubuna göre anlamlı düzeyde düşüktü ( $p < 0.05$ , Şekil 4.2.).



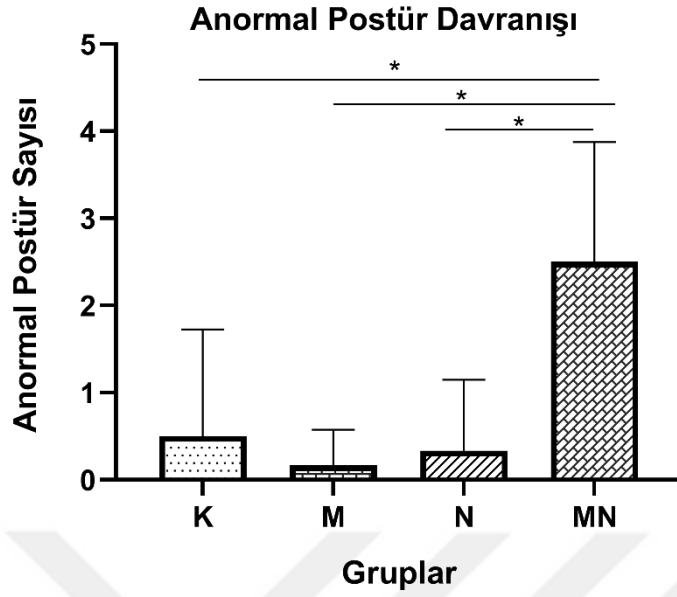
Şekil 4.2. Gruplar arası süslenme sayıları. Kontrol grubu (n=12) (K), Morfin grubu (n=12) (M), Nalokson grubu (n=12) (N) ve Morfin + Nalokson grubu (n=12), (MN) için süslenme davranış sonuçları. Veriler ortalama  $AO \pm SS$  olarak sunuldu (\* $p < 0.05$ ).

Şahlanma davranış sayıları incelendiğinde, M grubunda K grubuna kıyasla anlamlı düzeyde düşüş meydana geldi ( $p < 0.05$ , Şekil 4.3.).



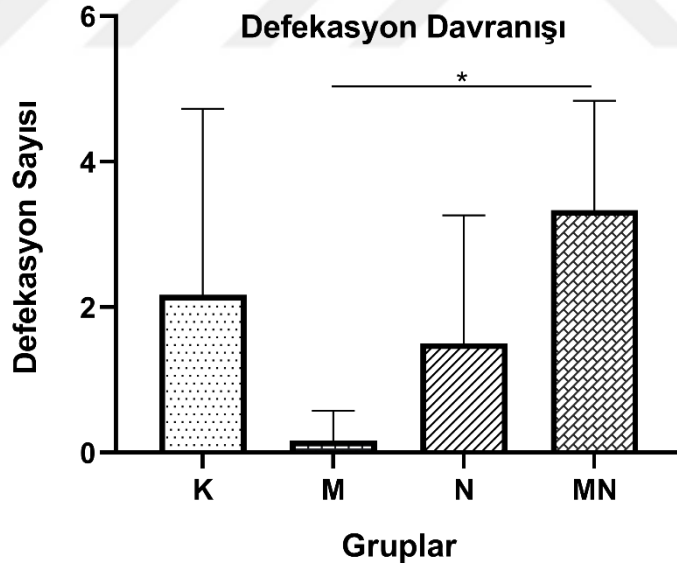
Şekil 4.3. Gruplar arası şahlanma sayıları. Kontrol grubu (n=12) (K), Morfin grubu (n=12) (M), Nalokson grubu (n=12) (N) ve Morfin + Nalokson grubu (n=12), (MN) için şahlanma sonuçları. Veriler ortalama  $AO \pm SS$  olarak sunuldu (\* $p < 0.05$ ).

Anormal postür davranış değerleri karşılaştırıldığında M+N grubunda tüm gruplara kıyasla anlamlı düzeyde artış mevcuttu. ( $p < 0.05$ , Şekil 4.4.).



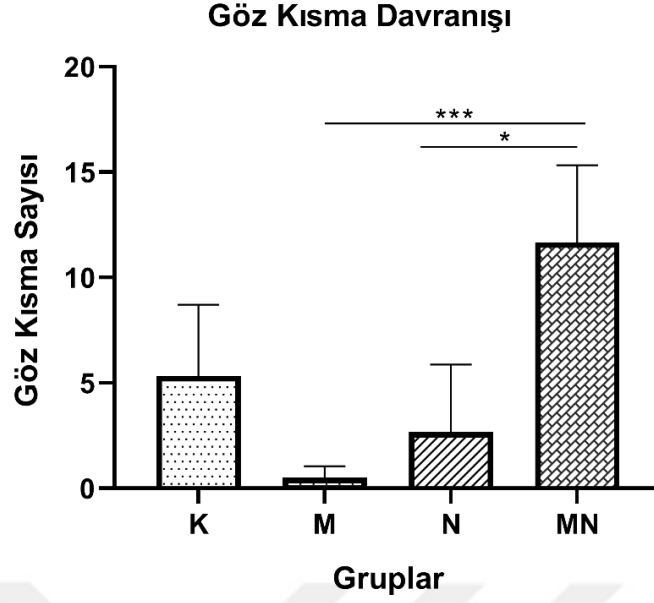
Şekil 4.4. Gruplar arası anormal postür sayıları. Kontrol grubu (n=12) (K), Morfin grubu (n=12) (M), Nalokson grubu (n=12) (N) ve Morfin + Nalokson grubu (n=12), (MN) için anormal postür serileme davranış sonuçları. Veriler ortalama  $AO \pm SS$  olarak sunuldu (\* $p < 0.05$ ).

Defekasyon davranış değerleri karşılaştırıldığında M+N grubunda M grubuna göre anlamlı düzeyde artış mevcuttu ( $p < 0.05$ , Şekil 4.5.).



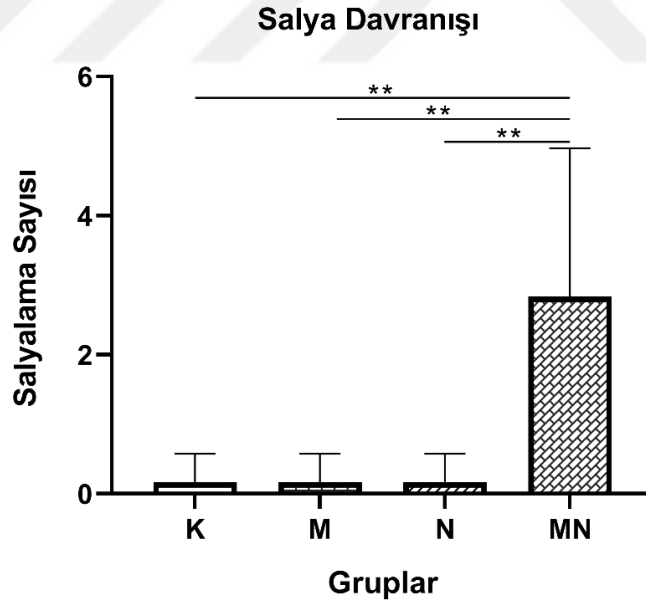
Şekil 4.5. Gruplar arası defekasyon sayıları. Kontrol grubu (n=12) (K), Morfin grubu (n=12) (M), Nalokson grubu (n=12) (N) ve Morfin + Nalokson grubu (n=12), (M+N) için defekasyon davranış sonuçları. Veriler ortalama  $AO \pm SS$  olarak sunuldu (\* $p < 0.05$ ).

Göz kısma davranış değerleri karşılaştırıldığında M+N grubunda M ve N grubuna göre anlamlı düzeyde artış mevcuttu ( $p < 0.05$ , Şekil 4.6.).



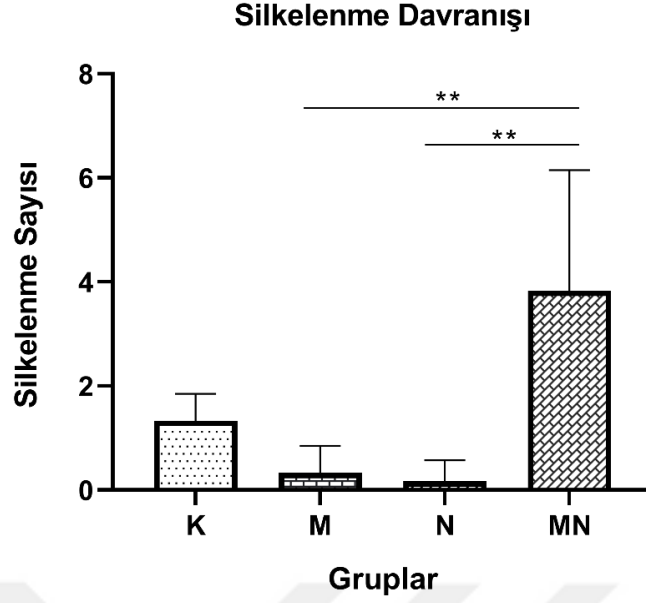
Şekil 4.6. Gruplar arası göz kısma sayıları. Kontrol grubu (n=12) (K), Morfin grubu (n=12) (M), Nalokson grubu (n=12) (N) ve Morfin + Nalokson grubu (n=12), (MN) için göz kısma davranış sonuçları. Veriler ortalama  $AO \pm SS$  olarak sunuldu (\* $p < 0.05$ , \*\*\* $p < 0.001$ ).

Salya davranış değerleri karşılaştırıldığında M+N grubunda tüm gruplara kıyasla belirgin düzeyde artış mevcuttu. ( $p < 0.05$ , Şekil 4.7.).



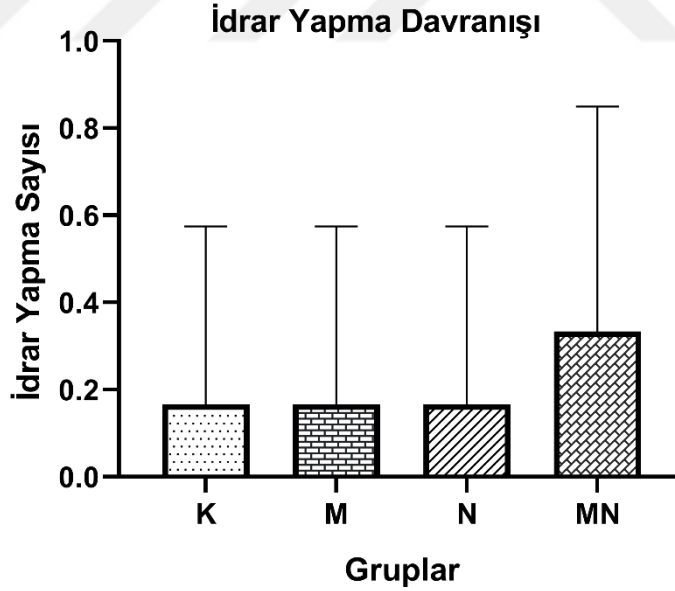
Şekil 4.7. Gruplar arası salya davranış sayıları. Kontrol grubu (n=12) (K), Morfin grubu (n=12) (M), Nalokson grubu (n=12) (N) ve Morfin + Nalokson grubu (n=12), (MN) için salya davranış sonuçları. Veriler ortalama  $AO \pm SS$  olarak sunuldu (\*\* $p < 0.005$ ).

Silkelenme davranış değerleri M+N grubunda hem M grubuna hem de N grubuna kıyasla anlamlı düzeyde yüksekti ( $p < 0.05$ , Şekil 4.8.).



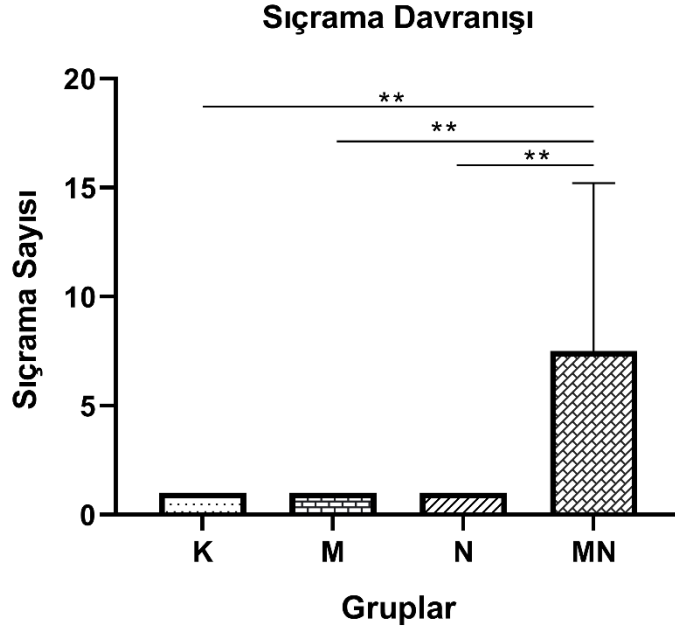
Şekil 4.8. Gruplar arası silkelenme sayıları. Kontrol grubu (n=12) (K), Morfin grubu (n=12) (M), Nalokson grubu (n=12) (N) ve Morfin + Nalokson grubu (n=12), (M+N) için silkelenme davranış sonuçları. Veriler ortalama  $AO \pm SS$  olarak sunuldu (\*\* $p < 0.005$ ).

İdrar yapma değerleri değerlendirildiğinde, gruplar arasında anlamlı bir fark oluşmadı ( $p > 0.05$ , Şekil 4.9.).



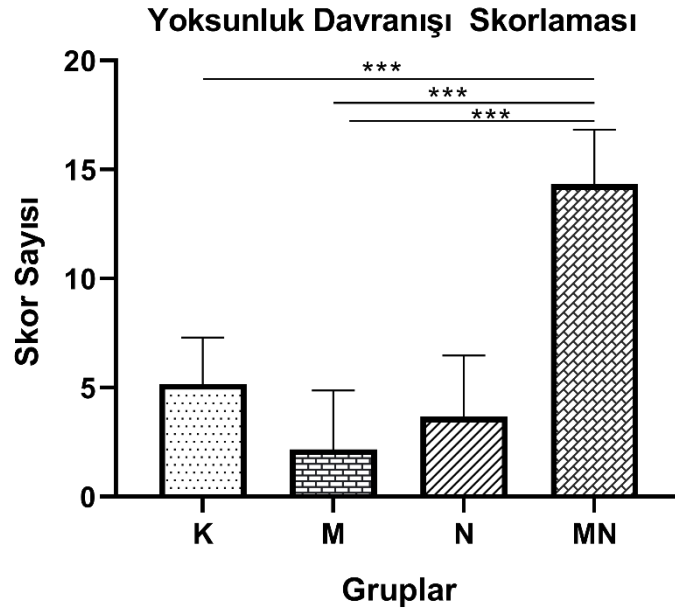
Şekil 4.9. Gruplar arası idrar yapma sayıları. Kontrol grubu (n=12) (K), Morfin grubu (n=12) (M), Nalokson grubu (n=12) (N) ve Morfin + Nalokson grubu (n=12), (MN) için idrar yapma davranış sonuçları. Veriler ortalama  $AO \pm SS$  olarak sunuldu ( $p > 0.05$ ).

M+N grubu sıçrama davranışı değerleri tüm gruplara kıyasla anlamlı düzeyde yüksekti ( $p < 0.05$ , Şekil 4.10.).



Şekil 4.10. Gruplar arası sıçrama sayıları. Kontrol grubu (n=12) (K), Morfin grubu (n=12) (M), Nalokson grubu (n=12) (N) ve Morfin + Nalokson grubu (n=12), (MN) için sıçrama davranış sonuçları. Veriler ortalama  $AO \pm SS$  olarak sunuldu (\*\* $p < 0.005$ ).

M+N grubu yoksunluk davranışı değerleri tüm gruplara kıyasla anlamlı düzeyde yüksekti ( $p < 0.05$ , Şekil 4.11.).



Şekil 4.11. Gruplar arası yoksunluk skor sayıları. Kontrol grubu (n=12) (K), Morfin grubu (n=12) (M), Nalokson grubu (n=12) (N) ve Morfin + Nalokson grubu (n=12), (MN) için yoksunluk davranış skorlama sonuçları. Veriler ortalama  $AO \pm SS$  olarak sunulmuştur (\*\* $p < 0.001$ ).

K, M, N ve MN grubuna ait olan davranış değerleri aşağıdaki tabloda detaylı olarak verilmiştir (Tablo 4.1.).

Tablo 4.1. Morfin yoksunluk bulguları (Ortalama  $\pm$  SS).

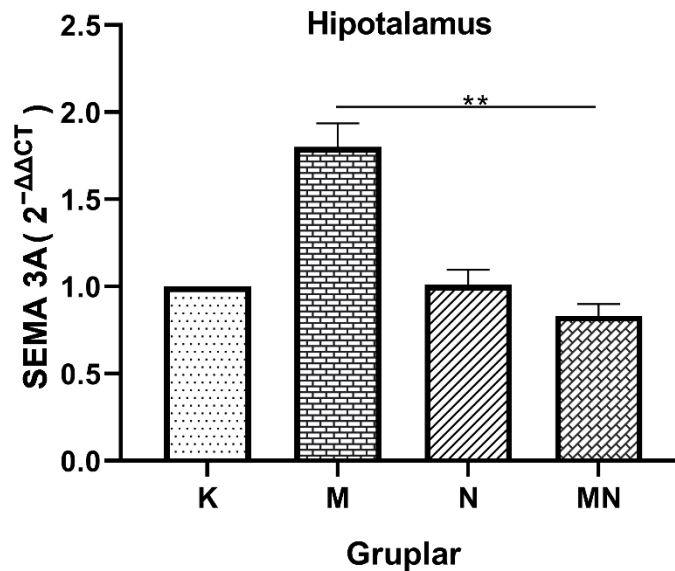
Davranış	Kontrol	Morfin	Nalokson	Morfin+ Nalokson
Silkelenme Sayısı	0	0	0	3,83 $\pm$ 2,31
Sıçrama Sayısı	0	0	0	7,50 $\pm$ 7,71
Anormal Postur Sayısı	0,50 $\pm$ 1,22	0,16 $\pm$ 0,40	0,33 $\pm$ 0,81	2,50 $\pm$ 1,37
Gözlerini Kısma Sayısı	5,33 $\pm$ 3,38	0,50 $\pm$ 0,54	2,66 $\pm$ 3,20	11,67 $\pm$ 3,67
Diş Çıtırdatma Sayısı	2,00 $\pm$ 1,26	1,16 $\pm$ 1,16	1,66 $\pm$ 1,86	10,83 $\pm$ 7,19
Defekasyon Sayısı	2,16 $\pm$ 2,56	0,16 $\pm$ 0,40	1,50 $\pm$ 1,76	3,33 $\pm$ 1,50
Süslenme Sayısı	5,66 $\pm$ 1,21	2,33 $\pm$ 0,81	4,50 $\pm$ 6,89	4,83 $\pm$ 1,72
Şahlanma Sayısı	21,50 $\pm$ 11,50	5,16 $\pm$ 4,26	9,16 $\pm$ 5,30	11,33 $\pm$ 4,17
Salya Davranışı	0	0	0	2,83 $\pm$ 2,13
Silkelenme Davranışı	1,33 $\pm$ 0,51	0,33 $\pm$ 0,51	0,16 $\pm$ 0,40	3,83 $\pm$ 2,31
Yoksunluk Skoru	5,16 $\pm$ 2,13	2,16 $\pm$ 2,71	3,66 $\pm$ 2,80	14,33 $\pm$ 2,50

#### 4.2. SMF 3A, NRF ve PLA1 Gen İfade Bulguları

Her iki dokuda bulunan SMF 3A, NRF ve PLA1 reseptör gen ifadeleri ( $\Delta$ Ct) ve kat artışları ( $\Delta\Delta$ Ct) değerlendirildi ve tek yönlü varyans analizi yapıldı.

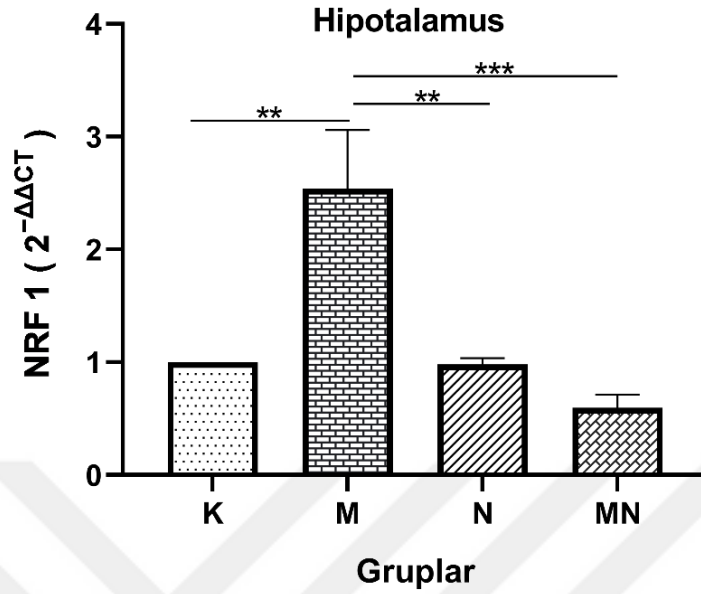
##### 4.2.1. Hipotalamus dokusundaki SMF 3A, NRF ve PLA1 gen ifade bulguları

Hipotalamus SMF 3A reseptör ifade kat artışı değerleri incelendiğinde, MN grubunda M grubuna kıyasla anlamlı düzeyde azalma mevcuttu ( $p < 0.05$ , Şekil 4.12.).



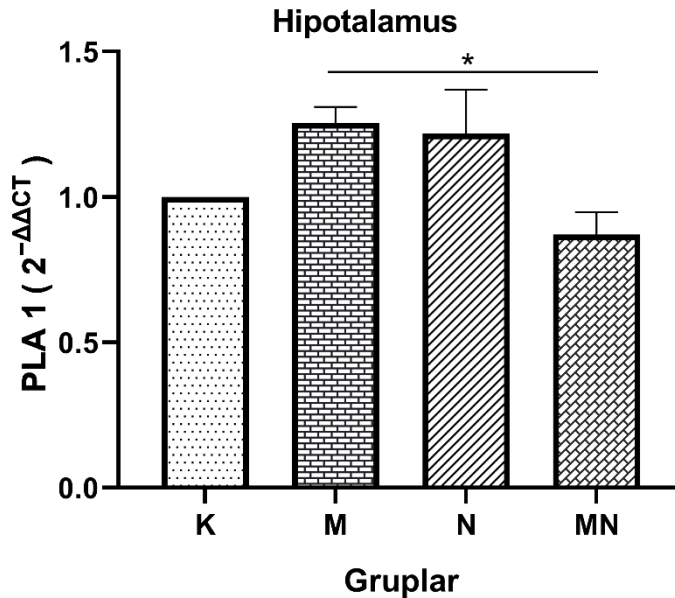
Şekil 4.12. Gruplar arası hipotalamus dokusu SMF 3A/2<sup>-ΔΔCT</sup> kat değişim sayıları. Hipotalamus dokusu için Kontrol grubu (n=12) (K), Morfin grubu (n=12) (M), Nalokson grubu (n=12) (N) ve Morfin + Nalokson grubu (n=12), (MN) SMF 3A gen ekspresyon kat sayısı artışı PCR sonuçları. Veriler ortalama AO $\pm$  SH olarak sunuldu (\*\* $p < 0.005$ )

Hipotalamus dokularından izole edilen NRF1 reseptörüne ait kat artışı bulguları karşılaştırıldığında, M grubunda diğer tüm gruplara kıyasla anlamlı düzeyde artış mevcuttu ( $p<0.05$ , Şekil 4.13.).



Şekil 4.13. Gruplar arası hipotalamus dokusu NRF1/(2<sup>-ΔΔCT</sup>) kat değişim sayıları. Hipotalamus dokusu için Kontrol grubu (n=12) (K), Morfin grubu (n=12) (M), Nalokson grubu (n=12) (N) ve Morfin + Nalokson grubu (n=12), (MN) NRF1 gen ekspresyon kat sayı artışı PCR sonuçları. Veriler ortalama AO± SH olarak sunuldu (\*\* $p<0,005$ , \*\*\* $p<0,001$ ).

Hipotalamus PLA1 reseptör ifade kat artışı değerleri değerlendirildiğinde, M grubunun değerleri MN grubuna kıyasla anlamlı olarak yüksekti ( $p<0.05$ , Şekil 4.14.).



Şekil 4.14. Gruplar arası hipotalamus dokusu PLA1 (2<sup>-ΔΔCT</sup>) kat değişim sayıları. Hipotalamus dokusu için Kontrol grubu (n=12) (K), Morfin grubu (n=12) (M), Nalokson grubu (n=12) (N) ve Morfin + Nalokson grubu (n=12), (MN) PLA1 gen ekspresyon kat sayı artışı PCR sonuçları. Veriler ortalama AO±SH olarak sunuldu. (\* $p<0,05$ )

K, M, N ve MN gruplarının hipotalamus bölgelerindeki SMF 3A, NRF1 ve PLA1 kat artış değerleri aşağıdaki tabloda detaylı olarak verilmiştir (Tablo 4.2.).

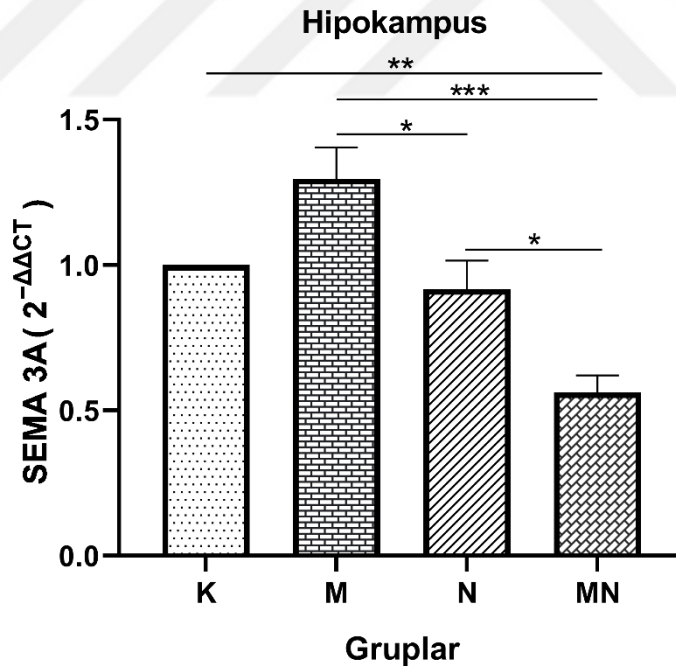
Tablo 4.2. Hipotalamus dokusundan elde edilen SMF 3A, NRF1 ve PLA1 kat artışı sonuçları (Ortalama  $\pm$  SH).

Gen	Kontrol	Morfin	Nalokson	Morfin+ Nalokson
SMF 3A/GAPDH	1,00 $\pm$ 0,00	1,80 $\pm$ 0,13	1,01 $\pm$ 0,08	0,83 $\pm$ 0,06
NRF1/GAPDH	1,00 $\pm$ 0,00	2,54 $\pm$ 0,52	0,98 $\pm$ 0,05	0,59 $\pm$ 0,11
PLA1/GAPDH	1,00 $\pm$ 0,00	1,25 $\pm$ 0,054	1,21 $\pm$ 0,15	0,87 $\pm$ 0,07

#### 4.2.2. Hipokampus dokusundaki SMF 3A, NRF1 ve PLA1 gen ifade bulguları

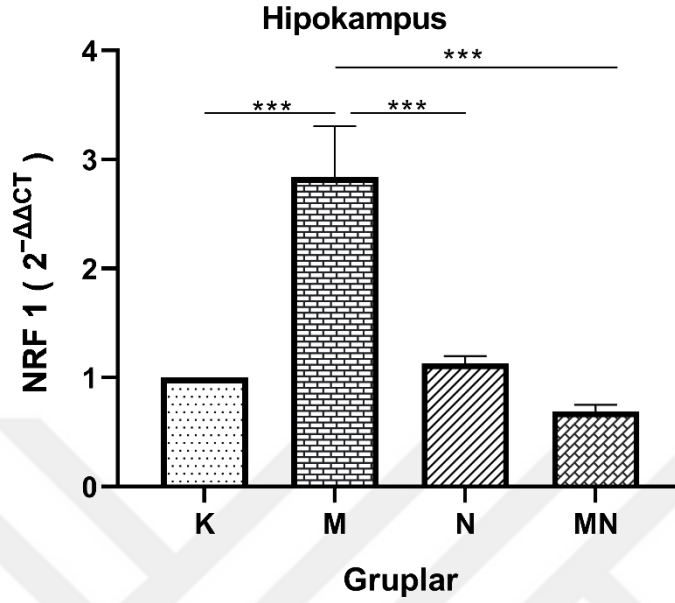
Her iki dokuda bulunan SMF 3A, NRF ve PLA1 reseptör gen ifadeleri ( $\Delta$ Ct) ve kat artışları ( $\Delta\Delta$ Ct) değerlendirildi ve tek yönlü varyans analizi yapıldı.

Hipokampus dokusundaki SMF 3A gen ifade düzeyi incelendiğinde M grubu N ve MN grubuna göre anlamlı düzeyde artış gösterdi. Bununla birlikte K grubunun değeri MN grubuna göre anlamlı düzeyde yüksekti. N grubunda MN grubuna kıyasla anlamlı düzeyde artış mevcuttu ( $p < 0.05$ , Şekil 4.15.).



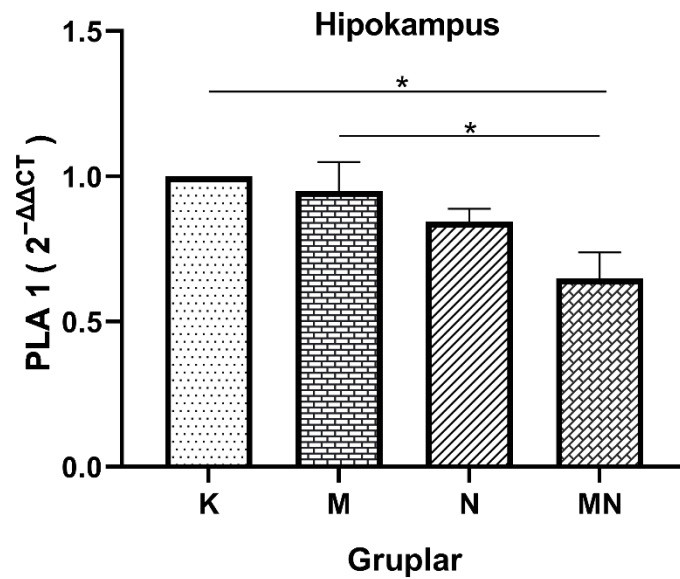
Şekil 4.15. Gruplar arası hipokampus dokusu SMF 3A ( $2^{-\Delta\Delta$ CT) kat değişim sayıları. Hipokampus dokusu için Kontrol grubu (n=12) (K), Morfin grubu (n=12) (M), Nalokson grubu (n=12) (N) ve Morfin + Nalokson grubu (n=12), (MN) SMF 3A gen ekspresyon kat sayısı artışı PCR sonuçları. Veriler ortalama AO $\pm$ SH olarak sunuldu. (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.005$ , \*\*\* $p < 0.001$ )

Hipokampus dokusundaki NRF1 gen ifade düzeyi incelendiğinde M grubu değerinin K ve N gruplarına kıyasla yüksek olduğu belirlendi. Ayrıca, M grubu değerlerinde MN grubuna göre anlamlı düzeyde yükseklik ortaya çıktı ( $p<0.05$ , Şekil 4.16.).



Şekil 4.16. Gruplar arası hipokampus dokusu NRF1 ( $2^{-\Delta\Delta CT}$ ) kat değişim sayıları. Hipokampus dokusu için Kontrol grubu (n=12) (K), Morfin grubu (n=12) (M), Nalokson grubu (n=12) (N) ve Morfin + Nalokson grubu (n=12), (MN) NRF1 gen ekspresyon kat sayısı artışı PCR sonuçları. Veriler ortalama  $AO \pm SH$  olarak sunuldu. (\*\*\*) $p<0,001$

Hipokampus dokusundaki PLA1 gen ifade düzeyi incelendiğinde K ve M grubu değerlerinin MN grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı şekilde daha yüksek olduğu belirlendi ( $p<0.05$ , Şekil 4.17.).



Şekil 4.17. Gruplar arası hipokampus dokusu PLA1/(2-ΔΔCT) kat değişim sayıları. Hipokampus dokusu için Kontrol grubu (n=12) (K), Morfin grubu (n=12) (M), Nalokson grubu (n=12) (N) ve Morfin + Nalokson grubu (n=12), (MN) PLA1 gen ekspresyon kat sayı artışı PCR sonuçları. Veriler ortalama AO±SH olarak sunuldu. (\*p<0.05)

K, M, N ve MN gruplarının hipokampus bölgelerindeki SMF 3A, NRF1 ve PLA1 kat artış değerleri aşağıdaki tabloda detaylı olarak verilmiştir (Tablo 4.3.).

Tablo 4.3. Hipokampus dokusundan elde edilen SMF 3A NRF1 ve PLA1 kat artışı sonuçları (Ortalama ± SH).

<b>Gen</b>	<b>Kontrol</b>	<b>Morfin</b>	<b>Nalokson</b>	<b>Morfin+ Nalokson</b>
<b>SMF 3A</b>	1,00±0,00	1,29±0,10	0,91±0, 0,09	0,56±0,058
<b>NRF1</b>	1,00±0,00	2,83 ±0,46	1,11±0, 0,06	0,68±0,06
<b>PLA1</b>	1,00±0,00	0,94±0,10	0,84±0,04	0,64±0,09

## 5. TARTIŞMA

Bağımlılık oluşturan maddelerin uzun süreli kullanımı sonucunda beyin dokusunda meydana getirdiği hasarlar bilinmekle beraber, bu hasarların patofizyolojik mekanizmaları hala yeterince araştırılmamıştır. Morfin bağımlılığının beyin dokusunda nörogenez ve sinaptogenez üzerinde olumsuz etkilere sahip olduğu, bunun yanı sıra çeşitli hüresel mekanizmaları tetikleyerek nöronal apoptoza yol açabildiği bilinmektedir. SMF 3A sisteminin nöronal apoptoz, akson oluşumunun inhibisyonu ve dentritik dallanmalarda düzensizlikler gibi nöronal işlevlerde rol aldığı belirtilmiştir. Bu çalışmada, morfin bağımlılığı oluşturulmuş sıçanların hipotalamus ve hipokampus dokularında SMF 3A ve reseptörlerinin gen ekspresyon düzeyleri araştırılmıştır.

Morfin uyguladığımız grupta hem SMF 3A hem de reseptörleri olan NRF1 ve PLA1'in gen ekspresyon düzeylerinin arttığını, bunun tam tersi olarak morfin uygulanan gruba nalokson uygulanmasını takiben ekspresyon düzeylerinin belirgin olarak azaldığını belirledik. Mü opioit antagonisti uygulandığı zaman sonucun tersine dönmesi, morfinin etkisinin reseptör aracılı olduğunu göstermektedir. Nalokson bir opioit antagonisti olarak, kontrole göre kıyaslayınca etkiyi tam tersine döndürmüş olsaydı, beyinde endojenik olarak mü-opioiderjik bir aktivitenin olduğunu ve bunların tonik etki oluşturduğunu ve sadece nalokson uygulamasıyla bu etkinin ortadan kalktığını söyleyebilirdik. Ancak bulgularımıza göre nalokson ve kontrol grubunun değerlerinin birbirine çok yakın olması bize sadece nalokson uygulamasının SMF 3A ve reseptörleri üzerinde anlamlı bir etki oluşturmadığını, hipotalamus ve hipokampusta SMF 3A ve reseptörleri üzerinde opioiderjik tonik baskılamanın olmadığını gösterdi.

Morfin uygulaması hipotalamusta ve hipokampusta SMF 3A ve reseptörlerinin düzeyini belirgin olarak arttırdı. Bu durum, endojen B-endorfin veya morfin gibi mü opioit reseptör agonistlerinin beyin dokusunda belli düzeyde yükselmesinin sonucunda SMF 3A, NRF1 ve PLA1 ekspresyon düzeyini arttırabileceğini, bu artışın da semaforinerjik aktivasyonla beraber, nöronal entegrasyon ve nöronlar arası bağlantısallığın belirgin düzeyde azalışına yol açabileceğini göstermektedir.

Hipokampus, kısa süreli belleğin uzun süreli belleğe dönüştürülmesinde, limbik sistemin aktivitelerinde uyarıcı etki oluşturma ve uzamsal belleğin oluşması gibi çeşitli alanlarda rol alan önemli bir beyin bölgesidir. Bu işlevlerde meydana gelebilecek herhangi bir hasar, beynin entegrasyonunun azalmasını beraberinde getirebilmekle beraber, bağımlı olan bireylerde duygusal entegrasyonun önemli ölçüde azaldığı zaten bilinmektedir. SMF 3A ve

PLA1, aksonların gelişimi üzerinde olumsuz bir etkiye sahiptir. Katzman ve arkadaşları, hipokampus dokusunda öğrenmeyle beraber PLA1'in gen ekspresyon düzeyinin azaldığını belirtmişlerdir (Katzman ve ark. 2021). Hücre kültürü çalışmalarında da SMF 3A ve PLA1'in akson oluşumunu baskıladığı bildirilmiştir (Wang ve ark. 2018). SMF 3A'daki biyoaktivite artışı, doğrudan nörodejenerasyona veya nöronların iyileşme yeteneklerini ortadan kaldırarak dolaylı olarak nöronal baskılanmaya sebep olmaktadır. Multipl skleroz hastalığında beyin dokuları postmortem olarak incelenmiş ve SMF 3A ekspresyonunda anlamlı bir artış olduğu ifade edilmiştir (Williams ve ark. 2007). Bu durum bazı nörodejeneratif hastalıklarda SMF 3A sisteminde aktivasyon artışının olabileceğini göstermektedir.

Hipokampus yüksek metabolik aktivitesi nedeniyle reaktif oksijen türleri seviyelerindeki değişikliklere karşı hassas olan bir bölgedir. Metamfetamin ve kokain gibi psikostimülan ilaçların kullanımını takiben hipokampal atrofinin yanı sıra nörotoksik hasarlar oluşur, apoptotik ve inflamatuvar mekanizmalar dâhil olmak üzere nörotoksitenin indüklenmesinde rol oynayan moleküler süreçler tetiklenir (Fox ve ark. 2009; Golsorkhdan ve ark. 2020). Bunun yanı sıra hipokampusun özellikle SVZ'sinde SMF 3A düzey artışının hücre çoğalmasının azalmasına yol açtığı, düşük düzeydeki SMF 3A varlığında ise hücre çoğalmasının ortaya çıktığı bildirilmiştir (Sun ve ark. 2016). Alzheimer hastalarının hipokampal SMF 3A ekspresyon düzeyinin yüksek olduğu ve bu durumun hipokampal nöronların dejenerasyonuna yol açtığı ileri sürülmüştür (Good ve ark. 2004). Yine, şizofreni hastalarının beyincğinde postmortem olarak ve nörogelişimsel bozukluk modelinin uygulandığı farelerden alınan hipokampus dokularında SMF 3A düzeyinin yüksek olduğu gösterilmiştir (Eastwood ve ark. 2003; Fatemi ve ark. 2008). Şizofreni ve epilepsi hastalarının postmortem beyin bölgelerinde nöronal aksonal retraksiyonu ve anormal dentritik dallanmalarla birlikte SMF 3A ekspresyon düzeyinin arttığı ortaya konmuştur ( Feretti ve ark. 2022).

Mevcut çalışmada, morfin grubu hipokampus dokularında SMF 3A ve reseptör düzeylerinin yüksek olması, bağımlılıkla birlikte ortaya çıkan nöronal hasarın SMF sistemi aracılığıyla ortaya çıkabileceğini düşündürmektedir. Benzer bulgular hipotalamus dokusunda da ortaya çıkmıştır. Dolayısıyla bağımlılık süreçlerinde, bazı hipotalamik işlevlerdeki disfonksiyonellitede SMF 3A sisteminin etkili olabileceği varsayılabilir. Ayrıca, NRF1 hipotalamus dokusunda özellikle nöronal apoptozda etkin rol oynamaktadır (Cariboni ve ark. 2011). NRF1 nakavt GnRH nöronların içeren farelerin hipotalamusunda yüksek miktarda

GnRH nöron birikiminin ortaya çıkması yanında, SMF 3A nakavt farelerde ise GnRH hücrelerinde belirgin artışın meydana gelmesi bu düşünceyi desteklemektedir (Cariboni ve ark. 2011). Bu bilgiler ışığında çalışmamızın sonuçları değerlendirildiğinde, morfin maruziyetinin neden olduğu SMF 3A sistemindeki potansiyel aktivite artışının, bu bölgelerdeki nöronal disfonksiyon oluşumunda önemli bir mekanizma oluşturabileceği ifade edilebilir.



## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu tez çalışması, morfin bağımlılığı modeli oluşturulmuş sıçanlarda meydana gelen davranış değişikliklerinin yanı sıra, hipotalamus ve hipokampus dokularında bulunan SMF 3A ve reseptörleri olan NRF1 ile PLA1 gen ifade değişim düzeylerinin araştırıldığı bir çalışmadır. Bulgularımızı değerlendirdiğimizde morfin uygulanan grupta sıçrama davranışı, salya davranışı ve diş gıcırdatma davranışı gibi yoksunluk skorunun belirlenmesinde rol oynayan önemli belirteçlerin anlamlı düzeyde artış gösterdiğini belirledik. Meydana gelen bu değişimler bize bağımlılık protokolünü doğru uyguladığımızı göstermiş oldu. Sonrasında, hipotalamus ve hipokampus dokusunda bulunan SMF 3A, NRF1 ve PLA1 gen ifade düzey değişimlerini rtPCR yöntemini kullanarak belirledik. Morfin bağımlılığı oluşturduğumuz gruptan aldığımız hipotalamus ve hipokampus dokularındaki SMF 3A, NRF1 ve PLA1 gen ifadelerinin morfin+nalokson uyguladığımız gruba kıyasla anlamlı olarak yükseldiği sonucuna ulaştık. Tüm bu sonuçlar bize, morfin bağımlılığının oluşması ile hipotalamus ve hipokampusta meydana gelen nöronal hasarda SMF 3A, NRF1 ve PLA1'in de etkin rol alabileceğini düşündürdü.

## 7. KAYNAKLAR

Abdollahi, H., Ghaemi-Jandabi, M., Azizi, H., & Semnianian, S. (2016). The role of orexin type-1 receptors in the development of morphine tolerance in locus coeruleus neurons: An electrophysiological perspective. *Brain Research*, 1646, 91–97. <https://doi.org/10.1016/J.BRAINRES.2016.05.043>

Al-Hasani, R., & Bruchas, M. R. (2011). Molecular Mechanisms of opioid receptor-dependent signaling and Behavior. *Anesthesiology*, 115(6), 1363. <https://doi.org/10.1097/ALN.0B013E318238BBA6>

Alijanpour, S., Tirgar, F., & Zarrindast, M. R. (2016). Role of dorsal hippocampal orexin-1 receptors in memory restoration induced by morphine sensitization phenomenon. *Neuroscience*, 312, 215–226. <https://doi.org/10.1016/J.NEUROSCIENCE.2015.11.023>

Allouche, S., Noble, F., & Marie, N. (2014). Opioid receptor desensitization: mechanisms and its link to tolerance. *Frontiers in Pharmacology*, 5(DEC). <https://doi.org/10.3389/FPHAR.2014.00280>

Alto, L. T., & Terman, J. R. (2017). Semaphorins and their Signaling Mechanisms. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 1493, 1–25. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6448-2\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6448-2_1)

Amrein, I., Isler, K., & Lipp, H. P. (2011). Comparing adult hippocampal neurogenesis in mammalian species and orders: influence of chronological age and life history stage. *European Journal of Neuroscience*, 34(6), 978–987. <https://doi.org/10.1111/J.1460-9568.2011.07804.X>

Anderson, S. M., & Pierce, R. C. (2005). Cocaine-induced alterations in dopamine receptor signaling: implications for reinforcement and reinstatement. *Pharmacology & Therapeutics*, 106(3), 389–403. <https://doi.org/10.1016/J.PHARMTHERA.2004.12.004>

Arguello, A. A., Fischer, S. J., Schonborn, J. R., Markus, R. W., Brekken, R. A., & Eisch, A. J. (2009). Effect of chronic morphine on the dentate gyrus neurogenic microenvironment. *Neuroscience*, 159(3), 1003–1010. <https://doi.org/10.1016/J.NEUROSCIENCE.2009.01.020>

Baser, T., Ozdemir, E., Filiz, A. K., Taskiran, A. S., & Gursoy, S. (2021). Ghrelin receptor agonist hexarelin attenuates antinociceptive tolerance to morphine in rats. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 99(5), 461–467. <https://doi.org/10.1139/CJPP-2020-0218>

Behar, O., Golden, J. A., Mashimo, H., Schoen, F. J., & Fishman, M. C. (1996). Semaphorin III is needed for normal patterning and growth of nerves, bones and heart. *Nature*, 383(6600), 525–528. <https://doi.org/10.1038/383525A0>

Bekiarı, C., Mutuş, R., & Papadopoulou, G. C. (2017). Erişkin memeli beyninde neurogenesis. *İstanbul gelişim üniversitesi sağlık bilimleri dergisi*, 2, 70–88. <https://Dergipark.Org.Tr/Tr/Pub/İgusabder/İssue/30932/312303>

Belujon, P., & Grace, A. A. (2011). Hippocampus, amygdala and stress: Interacting systems that affect susceptibility to addiction. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1216(1), 114. <https://doi.org/10.1111/J.1749-6632.2010.05896.X>

Bergami, M., Santi, S., Formaggio, E., Cagnoli, C., Verderio, C., Blum, R., Berninger, B., Matteoli, M., & Canossa, M. (2008). Uptake and recycling of pro-BDNF for transmitter-induced secretion by cortical astrocytes. *The Journal of Cell Biology*, 183(2), 213. <https://doi.org/10.1083/JCB.200806137>

Bilecki, W., Zapart, G., Ligęza, A., Wawrzczak-Bargiela, A., Urbański, M. J., & Przewłocki, R. (2005). Regulation of the extracellular signal-regulated kinases following acute and chronic opioid treatment. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 62(19–20), 2369–2375. <https://doi.org/10.1007/S00018-005-5277-Y/METRICS>

Bodnar, R. J. (2013). Endogenous opiates and behavior: 2012. *Peptides*, 50, 55–95. <https://doi.org/10.1016/J.PEPTIDES.2013.10.001>

Bortolotto, V., & Grilli, M. (2017). Opiate analgesics as negative modulators of adult hippocampal neurogenesis:

Potential implications in clinical practice. *Frontiers in Pharmacology*, 8(MAY), 254. <https://doi.org/10.3389/FPHAR.2017.00254>

Brunton LL, Chabner BA, Knollmann BC. Goodman&Gillman the pharmacological basic of therapeutics. Goodman Gilman’s Pharmacol. BasisTher. 2011. UNODC UNO on D and C. International Standards for the Treatment of Drug Use Disorders — Draft for Field Testing. 2016; 01463:1–102

Burgess, N., Maguire, E. A., & O’Keefe, J. (2002). The Human Hippocampus and Spatial and Episodic Memory. *Neuron*, 35(4), 625–641. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(02\)00830-9](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(02)00830-9)

Cao, J. L., He, J. H., Ding, H. L., & Zeng, Y. M. (2005). Activation of the spinal ERK signaling pathway contributes naloxone-precipitated withdrawal in morphine-dependent rats. *Pain*, 118(3), 336–349. <https://doi.org/10.1016/J.PAIN.2005.09.006>

Cariboni, A., Davidson, K., Rakic, S., Maggi, R., Parnavelas, J. G., & Ruhrberg, C. (2011). Defective gonadotropin-releasing hormone neuron migration in mice lacking SEMA3A signalling through NRP1 and NRP2: implications for the aetiology of hypogonadotropic hypogonadism. *Human Molecular Genetics*, 20(2), 336–344. <https://doi.org/10.1093/HMG/DDQ468>

- Castilla-Ortega, E., Serrano, A., Blanco, E., Araos, P., Suárez, J., Pavón, F. J., Rodríguez de Fonseca, F., & Santín, L. J. (2016). A place for the hippocampus in the cocaine addiction circuit: Potential roles for adult hippocampal neurogenesis. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 66, 15–32. <https://doi.org/10.1016/J.NEUBIOREV.2016.03.030>
- Chaker, Z., Codega, P., & Doetsch, F. (2016). A mosaic world: puzzles revealed by adult neural stem cell heterogeneity. *Wiley Interdisciplinary Reviews. Developmental Biology*, 5(6), 640–658. <https://doi.org/10.1002/WDEV.248>
- Chiou, L.-C., Liao, Y.-Y., Fan, P.-C., Kuo, P.-H., Wang, C.-H., Riemer, C., & Prinssen, E. (2007). Nociceptin/orphanin FQ peptide receptors: pharmacology and clinical implications. *Current Drug Targets*, 8(1), 117–135. <https://doi.org/10.2174/138945007779315605>
- Christie, M. J. (2008). Cellular neuroadaptations to chronic opioids: tolerance, withdrawal and addiction. *British Journal of Pharmacology*, 154(2), 384–396. <https://doi.org/10.1038/BJP.2008.100>
- Çimen, Y.A. (2020). Deneysel morfin bağımlılığı modeli oluşturulmuş sıçanlarda hipokampus ve hipotalamustaki melatonin reseptörleri en ifade düzeylerinin araştırılması [Yüksek Lisans Tezi, Necmettin Erbakan Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Fizyoloji Anabilim Dalı]
- Deng, X., Liang, L. N., Zhu, D., Zheng, L. P., Yu, J. H., Meng, X. ling, Zhao, Y. N., Sun, X. X., Pan, T. W., & Liu, Y. Q. (2018). Wedelolactone inhibits osteoclastogenesis but enhances osteoblastogenesis through altering different semaphorins production. *International Immunopharmacology*, 60, 41–49. <https://doi.org/10.1016/J.INTIMP.2018.04.037>
- Dhawan BN, Cesselin F, Raghubir R, Reisine T, Bradley PB, Portoghese PS, Hamon M. International Union of Pharmacology. XII. Classification of opioidreceptors. *Pharmacol. Rev.* 1996;48(4):567- 92
- Di Chiara, G. (2000). Role of dopamine in the behavioural actions of nicotine related to addiction. *European Journal of Pharmacology*, 393(1–3), 295–314. [https://doi.org/10.1016/S0014-2999\(00\)00122-9](https://doi.org/10.1016/S0014-2999(00)00122-9)
- Done, C., Silverstone, P., & Sharp, T. (1992). Effect of naloxone-precipitated morphine withdrawal on noradrenaline release in rat hippocampus in vivo. *European Journal of Pharmacology*, 215(2–3), 333–336. [https://doi.org/10.1016/0014-2999\(92\)90052-6](https://doi.org/10.1016/0014-2999(92)90052-6)
- Eastwood, S. L., Law, A. J., Everall, I. P., & Harrison, P. J. (2003). The axonal chemorepellant semaphorin 3A is increased in the cerebellum in schizophrenia and may contribute to its synaptic pathology. *Molecular Psychiatry*, 8(2), 148–155. <https://doi.org/10.1038/sj.mp.4001233>
- Eiza, N., Sabag, A. D., Kessler, O., Neufeld, G., & Vadasz, Z. (2023). CD72-semaphorin3A axis: A new regulatory pathway in systemic lupus erythematosus. *Journal of Autoimmunity*, 134, 102960. <https://doi.org/10.1016/J.JAUT.2022.102960>
- Elman, I., Borsook, D., & Volkow, N. D. (2013). Pain and suicidality: Insights from reward and addiction neuroscience. *Progress in Neurobiology*, 109, 1. <https://doi.org/10.1016/J.PNEUROBIO.2013.06.003>
- Evans, C. J., & Cahill, C. M. (2016). Neurobiology of opioid dependence in creating addiction vulnerability. *F1000Research*, 5. <https://doi.org/10.12688/F1000RESEARCH.8369.1>
- Fard, D., & Tamagnone, L. (2021). Semaphorins in health and disease. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 57, 55–63. <https://doi.org/10.1016/J.CYTOGFR.2020.05.006>
- Fatemi, S. H., Reutiman, T. J., Folsom, T. D., Huang, H., Oishi, K., Mori, S., Smee, D. F., Pearce, D. A., Winter, C., Sohr, R., & Juckel, G. (2008). Maternal infection leads to abnormal gene regulation and brain atrophy in mouse offspring: implications for genesis of neurodevelopmental disorders. *Schizophrenia Research*, 99(1–3), 56–70. <https://doi.org/10.1016/J.SCHRES.2007.11.018>
- Fenstermaker, V., Chen, Y., Ghosh, A., & Yuste, R. (2004). Regulation of dendritic length and branching by semaphorin 3A. *Journal of Neurobiology*, 58(3), 403–412. <https://doi.org/10.1002/NEU.10304>
- Fox, M. E., Nathan Rodeberg, T., & Mark Wightman, R. (2017). Reciprocal Catecholamine Changes during Opiate Exposure and Withdrawal. *Neuropsychopharmacology*, 42(3), 671. <https://doi.org/10.1038/NPP.2016.135>
- Franco, M., & Tamagnone, L. (2008). Tyrosine phosphorylation in semaphorin signalling: shifting into overdrive. *EMBO Reports*, 9(9), 865. <https://doi.org/10.1038/EMBOR.2008.139>
- Frankowska, M., Wydra, K., Faron-Górecka, A., Zaniewska, M., Kuśmider, M., Dziedzicka-Wasylewska, M., & Filip, M. (2008). Neuroadaptive changes in the rat brain GABAB receptors after withdrawal from cocaine selfadministration. *European Journal of Pharmacology*, 599(1–3), 58–64. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2008.09.018>
- Fuchs, C., Trazzi, S., Torricella, R., Viggiano, R., De Franceschi, M., Amendola, E., Gross, C., Calzà, L., Bartesaghi, R., & Ciani, E. (2014). Loss of CDKL5 impairs survival and dendritic growth of newborn neurons by altering AKT/GSK-3 $\beta$  signaling. *Neurobiology of Disease*, 70(100), 53–68. <https://doi.org/10.1016/J.NBD.2014.06.006>
- Gawel, K., Gibula-Bruzda, E., Dziedzic, M., Jenda-Wojtanowska, M., Marszalek-Grabska, M., Silberring, J., & Kotlinska, J. H. (2017). Cholinergic activation affects the acute and chronic antinociceptive effects of morphine. *Physiology & Behavior*, 169, 22–32. <https://doi.org/10.1016/J.PHYSBEH.2016.11.011>

- Gendron, L., Cahill, C. M., Von Zastrow, M., Schiller, P. W., & Pineyro, G. (2016). Molecular Pharmacology of  $\delta$ -Opioid Receptors. *Pharmacological Reviews*, 68(3), 631. <https://doi.org/10.1124/PR.114.008979>
- Ghanizadeh, A.-Z., Al, M., Anoush, M., Jani, A., Sahebgharani, M., & Jafari, M. R. (2015). Effects of estrogen receptor modulators on morphine induced sensitization in mice memory. *iranian journal of psychiatry*, 10(3), 192. [/pmc/articles/PMC4749689/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC4749689/)
- Gonçalves, J. T., Schafer, S. T., & Gage, F. H. (2016). Adult neurogenesis in the hippocampus: from stem cells to behavior. *cell*, 167(4), 897–914. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2016.10.021>
- Good, P. F., Alapat, D., Hsu, A., Chu, C., Perl, D., Wen, X., Burstein, D. E., & Kohtz, D. S. (2004). A role for semaphorin 3A signaling in the degeneration of hippocampal neurons during Alzheimer's disease. *Journal of Neurochemistry*, 91(3), 716–736. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2004.02766.x>
- Goodman, A. (2008). Neurobiology of addiction. An integrative review. *Biochemical Pharmacology*, 75(1), 266–322. <https://doi.org/10.1016/J.BCP.2007.07.030>
- Gu, Z., Koppel, N., Kalamboglas, J., Alexandrou, G., Li, J., Craig, C., Simon, D. J., Tessier-Lavigne, M., Baccei, M. L., Martin, J. H., & Yoshida, Y. (2020). Semaphorin-Mediated Corticospinal Axon Elimination Depends on the Activity-Induced Bax/Bak-Caspase Pathway. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 40(28), 5402–5412. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3190-18.2020>
- Harris, A. C., & Gewirtz, J. C. (2005). Acute opioid dependence: Characterizing the early adaptations underlying drug withdrawal. *Psychopharmacology*, 178(4), 353–366. <https://doi.org/10.1007/S00213-005-2155-0/METRICS>
- Hassanipour, M., Amini-Khoei, H., Shafaroodi, H., Shirzadian, A., Rahimi, N., Imran-Khan, M., Rezayat, S. 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. <https://doi.org/10.1016/J.BRAINRESBULL.2016.07.002>
- Herscher, M., Fine, M., Navalurkar, R., Hirt, L., & Wang, L. (2020). Diagnosis and management of opioid use disorder in hospitalized patients. *The medical clinics of north america*, 104(4), 695–708. <https://doi.org/10.1016/J.MCNA.2020.03.003>
- Hooshmandi, M., Hosseinmardi, N., Janahmadi, M., Khakpai, F., Rohampour, K., & Doostmohammadi, J. (2017). Antagonism of orexin type-1 receptors (OX1Rs) attenuates naloxone-precipitated morphine withdrawal syndrome in rat dorsal hippocampus. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 158, 39–48. <https://doi.org/10.1016/J.PBB.2017.06.001>
- Ieda, M., Kanazawa, H., Kimura, K., Hattori, F., Ieda, Y., Taniguchi, M., Lee, J. K., Matsumura, K., Tomita, Y., Miyoshi, S., Shimoda, K., Makino, S., Sano, M., Kodama, I., Ogawa, S., & Fukuda, K. (2007). *Sema3a* maintains normal heart rhythm through sympathetic innervation patterning. *Nature Medicine*, 13(5), 604–612. <https://doi.org/10.1038/NM1570>
- Jankovic, B. D. (1994). Neuroimmunomodulation From Phenomenology to Molecular Evidence. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 741(1), 1–38. <https://doi.org/10.1111/J.1749-6632.1994.TB39641.X>
- Johnson, S. W., & North, R. A. (1992). Opioids excite dopamine neurons by hyperpolarization of local interneurons. *The Journal of Neuroscience*, 12(2), 483. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.12-02-00483.1992>
- Jongbloets, B. C., & Jeroen Pasterkamp, R. (2014). Semaphorin signalling during development. *Development*, 141(17), 3292–3297. <https://doi.org/10.1242/DEV.105544>
- Kandasamy, M., Lehner, B., Kraus, S., Sander, P. R., Marschallinger, J., Rivera, F. J., Trümbach, D., Ueberham, U., Reitsamer, H. A., Strauss, O., Bogdahn, U., Couillard-Despres, S., & Aigner, L. (2014). TGF-beta signalling in the adult neurogenic niche promotes stem cell quiescence as well as generation of new neurons. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 18(7), 1444. <https://doi.org/10.1111/JCMM.12298>
- Katritch, V., Cherezov, V., & Stevens, R. C. (2013). Structure-Function of the G-protein-Coupled Receptor Superfamily. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 53, 531. <https://doi.org/10.1146/ANNUREVPHARMTOX-032112-135923>
- Kayaalp S. S. (2000) Rasyonel tedavi yönünden tıbbi farmakoloji. *ıı.cilt* 981-1002
- Kheirbek, M. A., Drew, L. J., Burghardt, N. S., Costantini, D. O., Tannenholz, L., Ahmari, S. E., Zeng, H., Fenton, A. A., & Henl, R. (2013). Differential control of learning and anxiety along the dorsoventral axis of the dentate gyrus. *Neuron*, 77(5), 955–968. <https://doi.org/10.1016/J.NEURON.2012.12.038>
- Kibaly, C., Xu, C., Cahill, C. M., Evans, C. J., & Law, P. Y. (2019). Non-nociceptive roles of opioids in the CNS: opioids' effects on neurogenesis, learning, memory and affect. *Nature Reviews. Neuroscience*, 20(1), 5–18. <https://doi.org/10.1038/S41583-018-0092-2>
- Kiseleva, E. P., & Rutto, K. V. (2022). Semaphorin 3A in the Immune System: Twenty Years of Study. *Biochemistry. Biokhimiia*, 87(7), 640. <https://doi.org/10.1134/S0006297922070069>
- Koob, G. F., Ahmed, S. H., Boutrel, B., Chen, S. A., Kenny, P. J., Markou, A., O'Dell, L. E., Parsons, L. H., & Sanna, P. P. (2004). Neurobiological mechanisms in the transition from drug use to drug dependence. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 27(8), 739–749. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2003.11.007>

- Koob, G. F., Stinus, L., Moal, M. Le, & Bloom, F. E. (1989). Opponent process theory of motivation: neurobiological evidence from studies of opiate dependence. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 13(2–3), 135–140. [https://doi.org/10.1016/S0149-7634\(89\)80022-3](https://doi.org/10.1016/S0149-7634(89)80022-3)
- Kuhn, H. G., Biebl, M., Wilhelm, D., Li, M., Friedlander, R. M., & Winkler, J. (2005). Increased generation of granule cells in adult Bcl-2-overexpressing mice: a role for cell death during continued hippocampal neurogenesis. *The European Journal of Neuroscience*, 22(8), 1907–1915. <https://doi.org/10.1111/J.1460-9568.2005.04377.X>
- Lagace, D. C., Whitman, M. C., Noonan, M. A., Ables, J. L., DeCarolis, N. A., Arguello, A. A., Donovan, M. H., Fischer, S. J., Farnbauch, L. A., Beech, R. D., DiLeone, R. J., Greer, C. A., Mandyam, C. D., & Eisch, A. J. (2007). Dynamic contribution of nestin-expressing stem cells to adult neurogenesis. *the journal of neuroscience*, 27(46), 12623. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3812-07.2007>
- Lazarov, O., & Hollands, C. (2016). Hippocampal neurogenesis: Learning to remember. *Progress in Neurobiology*, 138–140, 1–18. <https://doi.org/10.1016/J.PNEUROBIO.2015.12.006>
- Li, G. X., Zhang, S., Liu, R., Singh, B., Singh, S., Quinn, D. I., Crump, G., & Gill, P. S. (2021). Tetraspanin18 regulates angiogenesis through VEGFR2 and Notch pathways. *Biology Open*, 10(2). <https://doi.org/10.1242/BIO.050096/266426/AM/TETRASPANIN18-REGULATES-THROUGH>
- Lichtenwalner, R. J., Forbes, M. E., Bennett, S. A., Lynch, C. D., Sonntag, W. E., & Riddle, D. R. (2001). Intracerebroventricular infusion of insulin-like growth factor-I ameliorates the age-related decline in hippocampal neurogenesis. *Neuroscience*, 107(4), 603–613. [https://doi.org/10.1016/S0306-4522\(01\)00378-5](https://doi.org/10.1016/S0306-4522(01)00378-5)
- Listos, J., Baranowska-Bosiacka, I., Talarek, S., Listos, P., Orzelska, J., Fidecka, S., Gutowska, I., Kolasa, A., Rybicka, M., & Chlubek, D. (2013). The effect of perinatal lead exposure on dopamine receptor D2 expression in morphine dependent rats. *Toxicology*, 310, 73–83. <https://doi.org/10.1016/J.TOX.2013.05.007>
- Listos, J., Baranowska-Bosiacka, I., Wąsik, A., Talarek, S., Tarnowski, M., Listos, P., Łupina, M., Antkiewicz-Michaluk, L., Gutowska, I., Tkacz, M., Pilutin, A., Orzelska-Górka, J., Chlubek, D., & Fidecka, S. (2016). The adenosinergic system is involved in sensitization to morphine withdrawal signs in rats—neurochemical and molecular basis in dopaminergic system. *Psychopharmacology*, 233(12), 2383. <https://doi.org/10.1007/S00213016-4289-7>
- Liu, S., Yao, J. L., Wan, X. X., Song, Z. J., Miao, S., Zhao, Y., Wang, X. L., & Liu, Y. P. (2018). Sonic hedgehog signaling in spinal cord contributes to morphine-induced hyperalgesia and tolerance through upregulating brain-derived neurotrophic factor expression. *Journal of Pain Research*, 11, 649–659. <https://doi.org/10.2147/JPR.S153544>
- Lledo, P. M., Alonso, M., & Grubb, M. S. (2006). Adult neurogenesis and functional plasticity in neuronal circuits. *Nature Reviews. Neuroscience*, 7(3), 179–193. <https://doi.org/10.1038/NRN1867>
- Lu, Q., & Zhu, L. (2020). The Role of Semaphorins in Metabolic Disorders. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(16), 1–19. <https://doi.org/10.3390/IJMS21165641>
- Lunzer, M. M., & Portoghese, P. S. (2007). Selectivity of delta- and kappa-opioid ligands depends on the route of central administration in mice. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 322(1), 166–171. <https://doi.org/10.1124/JPET.107.120279>
- Madhavan, A., Bonci, A., & Whistler, J. L. (2010). Opioid-Induced GABA Potentiation after Chronic Morphine Attenuates the Rewarding Effects of Opioids in the Ventral Tegmental Area. *The Journal of Neuroscience*, 30(42), 14029. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3366-10.2010>
- Marker, C. L., Luján, R., Loh, H. H., & Wickman, K. (2005). Spinal G-Protein-Gated Potassium Channels Contribute in a Dose-Dependent Manner to the Analgesic Effect of  $\mu$ - and  $\delta$ - But Not  $\kappa$ -Opioids. *The Journal of Neuroscience*, 25(14), 3551. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4899-04.2005>
- Matinfar, M., Esfahani, M., Aslany, N., Davoodi, S. R., Parsaei, P., Zarei, G., & Reisi, P. (2013). Effect of repeated morphine withdrawal on spatial learning, memory and serum cortisol level in mice. *Advanced Biomedical Research*, 2(1), 80. <https://doi.org/10.4103/2277-9175.120868>
- Matrone, C., & Ferretti, G. (2023). Semaphorin 3A influences neuronal processes that are altered in patients with autism spectrum disorder: Potential diagnostic and therapeutic implications. In *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* (Vol. 153). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2023.105338>
- Matsuda, I., Shoji, H., Yamasaki, N., Miyakawa, T., & Aiba, A. (2016). Comprehensive behavioral phenotyping of a new Semaphorin 3 F mutant mouse. *Molecular Brain*, 9(1). <https://doi.org/10.1186/S13041-016-0196-4>
- Matsuzaki, K. (2009). Control of cell selectivity of antimicrobial peptides. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1788(8), 1687–1692. <https://doi.org/10.1016/J.BBAMEM.2008.09.013>
- Matsuzaki, K., Katakura, M., Hara, T., Li, G., Hashimoto, M., & Shido, O. (2009). Proliferation of neuronal progenitor cells and neuronal differentiation in the hypothalamus are enhanced in heat-acclimated rats. *Pflügers Archiv : European Journal of Physiology*, 458(4), 661–673. <https://doi.org/10.1007/S00424-009-0654-2>
- McDermott, J. E., Goldblatt, D., & Paradis, S. (2018). Class 4 Semaphorins and Plexin-B receptors regulate GABAergic and glutamatergic synapse development in the mammalian hippocampus. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 92, 50–66. <https://doi.org/10.1016/J.MCN.2018.06.008>
- McDermott, J. E., Goldblatt, D., & Paradis, S. (2018). Class 4 Semaphorins and Plexin-B receptors regulate


- GABAergic and glutamatergic synapse development in the mammalian hippocampus. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 92, 50–66. <https://doi.org/10.1016/J.MCN.2018.06.008>
- Meye, F. J., van Zessen, R., Smidt, M. P., Adan, R. A. H., & Ramakers, G. M. J. (2012). Morphine Withdrawal Enhances Constitutive  $\mu$ -Opioid Receptor Activity in the Ventral Tegmental Area. *The Journal of Neuroscience*, 32(46), 16120. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1572-12.2012>
- Micheli, L., Ceccarelli, M., D'Andrea, G., & Tirone, F. (2018). Depression and adult neurogenesis: Positive effects of the antidepressant fluoxetine and of physical exercise. *Brain Research Bulletin*, 143, 181–193. <https://doi.org/10.1016/J.BRAINRESBULL.2018.09.002>
- Migaud, M., Batailler, M., Segura, S., Duittoz, A., Franceschini, I., & Pilon, D. (2010). Emerging new sites for adult neurogenesis in the mammalian brain: a comparative study between the hypothalamus and the classical neurogenic zones. *The European Journal of Neuroscience*, 32(12), 2042–2052. <https://doi.org/10.1111/J.14609568.2010.07521.X>
- Ming, G. L., & Song, H. (2005). Adult neurogenesis in the mammalian central nervous system. *Annual Review of Neuroscience*, 28, 223–250. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV.NEURO.28.051804.101459>
- Mitra, S., & Sinatra, R. S. (2004). Perioperative Management of Acute Pain in the Opioid-dependent Patient. *Anesthesiology*, 101(1), 212–227. <https://doi.org/10.1097/00000542-200407000-00032>
- Mochida, S. (2018). Presynaptic calcium channels. *Neuroscience Research*, 127, 33–44. <https://doi.org/10.1016/J.NEURES.2017.09.012>
- Morales-Garcia, J. A., Luna-Medina, R., Alonso-Gil, S., Sanz-Sancristobal, M., Palomo, V., Gil, C., Santos, A., Martinez, A., & Perez-Castillo, A. (2012). Glycogen Synthase Kinase 3 Inhibition Promotes Adult Hippocampal Neurogenesis in Vitro and in Vivo. *ACS Chemical Neuroscience*, 3(11), 963. <https://doi.org/10.1021/CN300110C>
- Movassagh, H., Khadem, F., & Gounni, A. S. (2018). Semaphorins and Their Roles in Airway Biology: Potential as Therapeutic Targets. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 58(1), 21–27. <https://doi.org/10.1165/RCMB.2017-0171TR>
- Nakahara, S., Miyake, S., Tajinda, K., & Ito, H. (2015). Mossy fiber mis-pathfinding and semaphorin reduction in the hippocampus of  $\alpha$ -CaMKII hKO mice. *Neuroscience Letters*, 598, 47–51. <https://doi.org/10.1016/J.NEULET.2015.05.012>
- Nakamoto, K., Kawasaki, S., Kobori, T., Fujita-Hamabe, W., Mizoguchi, H., Yamada, K., Nabeshima, T., & Tokuyama, S. (2012). Involvement of matrix metalloproteinase-9 in the development of morphine tolerance. *European Journal of Pharmacology*, 683(1–3), 86–92. <https://doi.org/10.1016/J.EJPHAR.2012.03.006>
- Ngai, S. H., Berkowitz, B. A., Yang, J. C., Hempstead, J., & Spector, S. (1976). Pharmacokinetics of naloxone in rats and in man: basis for its potency and short duration of action. *Anesthesiology*, 44(5), 398–401. <https://doi.org/10.1097/00000542-197605000-00008>
- Osborne, N. J., Begbie, J., Chilton, J. K., Schmidt, H., & Eickholt, B. J. (2005). Semaphorin/neuropilin signaling influences the positioning of migratory neural crest cells within the hindbrain region of the chick. *Developmental Dynamics*, 232(4), 939–949. <https://doi.org/10.1002/DVDY.20258>
- Ozdemir E. The pathophysiological role of serotonin receptor systems in opioid analgesia and tolerance. *Int J Basic Clin Pharmacol*. 2017;6(2):217
- Paredes, M. F., Sorrells, S. F., Garcia-Verdugo, J. M., & Alvarez-Buylla, A. (2016). Brain Size and Limits to Adult Neurogenesis. *The Journal of Comparative Neurology*, 524(3), 646. <https://doi.org/10.1002/CNE.23896>
- Pasternak, G. W. (2014). Opioids and their receptors: Are we there yet? *Neuropharmacology*, 76(0 0), 198. <https://doi.org/10.1016/J.NEUROPHARM.2013.03.039>
- Pasternak, G. W. (2018). Mu Opioid Pharmacology: 40 Years to the Promised Land. *Advances in Pharmacology (San Diego, Calif.)*, 82, 261–291. <https://doi.org/10.1016/BS.APHA.2017.09.006>
- Pencea, V., Bingaman, K. D., Freedman, L. J., & Luskin, M. B. (2001). Neurogenesis in the subventricular zone and rostral migratory stream of the neonatal and adult primate forebrain. *Experimental Neurology*, 172(1), 1–16. <https://doi.org/10.1006/EXNR.2001.7768>
- Peng, J., Sarkar, S., & Chang, S. L. (2012). Opioid receptor expression in human brain and peripheral tissues using absolute quantitative real-time RT-PCR. *Drug and Alcohol Dependence*, 124(3), 223. <https://doi.org/10.1016/J.DRUGALCDEP.2012.01.013>
- Pergolizzi, J., Böger, R. H., Budd, K., Dahan, A., Erdine, S., Hans, G., Kress, H. G., Langford, R., Likar, R., Raffa, R. B., & Sacerdote, P. (2008). Opioids and the management of chronic severe pain in the elderly: Consensus statement of an international expert panel with focus on the six clinically most often used world health organization step III opioids (Buprenorphine, Fentanyl, Hydromorphone, Methadone, Morphine, Oxycodone). *Pain Practice*, 8(4), 287–313. <https://doi.org/10.1111/j.1533-2500.2008.00204.x>
- Pert, C. B., & Snyder, S. H. (1973). Opiate Receptor: Demonstration in Nervous Tissue. *Science*, 179(77), 1011–1014. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.179.4077.1011>

- Pomrenze, M. B., Cardozo Pinto, D. F., Neumann, P. A., Llorach, P., Tucciarone, J. M., Morishita, W., Eshel, N., Heifets, B. D., & Malenka, R. C. (2022). Modulation of 5-HT release by dynorphin mediates social deficits during opioid withdrawal. *Neuron*, 110(24), 4125. <https://doi.org/10.1016/J.NEURON.2022.09.024>
- Reidy, K., & Tufro, A. (2011). Semaphorins in kidney development and disease: modulators of ureteric bud branching, vascular morphogenesis, and podocyte-endothelial crosstalk. *Pediatric Nephrology (Berlin, Germany)*, 26(9), 1407–1412. <https://doi.org/10.1007/S00467-011-1769-1>
- Reith, M. E. A., Li, M. Y., & Yan, Q. S. (1997). Extracellular dopamine, norepinephrine, and serotonin in the ventral tegmental area and nucleus accumbens of freely moving rats during intracerebral dialysis following systemic administration of cocaine and other uptake blockers. *Psychopharmacology*, 134(3), 309–317. <https://doi.org/10.1007/S002130050454>
- Sahraei, H., Zarei, F., Eidi, A., Oryan, S., Shams, J., Khoshbaten, A., & Zarrindast, M. R. (2007). The role of nitric oxide within the nucleus accumbens on the acquisition and expression of morphine-induced place preference in morphine sensitized rats. *European Journal of Pharmacology*, 556(1–3), 99–106. <https://doi.org/10.1016/J.EJP.2006.10.044>
- Schulteis, G., Markou, A., Gold, L. H., Stinus, L., & Koob, G. F. (1994). Relative sensitivity to naloxone of multiple indices of opiate withdrawal: a quantitative dose-response analysis. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 271(3)
- Sepulveda, M. J., Hernandez, L., Rada, P., Tucci, S., & Contreras, E. (1998). Effect of Precipitated Withdrawal on Extracellular Glutamate and Aspartate in the Nucleus Accumbens of Chronically Morphine-Treated Rats: An In Vivo Microdialysis Study. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 60(1), 255–262. [https://doi.org/10.1016/S0091-3057\(97\)00550-9](https://doi.org/10.1016/S0091-3057(97)00550-9)
- Shiflett, M. W., Gavin, M., & Tran, T. S. (2015). Altered hippocampal-dependent memory and motor function in neuropilin 2-deficient mice. *Translational Psychiatry*, 5(3), e521. <https://doi.org/10.1038/TP.2015.17>
- Singh, V. P., Jain, N. K., & Kulkarni, S. K. (2003). Fluoxetine suppresses morphine tolerance and dependence: Modulation of NO-cGMP/DA/serotonergic pathways. *Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology*, 25(4), 273–280. <https://doi.org/10.1358/MF.2003.25.4.769675>
- Sora, I., Takahashi, N., Funada, M., Ujike, H., Revay, R. S., Donovan, D. M., Miner, L. L., & Uhl, G. R. (1997). Opiate receptor knockout mice define mu receptor roles in endogenous nociceptive responses and morphine-induced analgesia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(4), 1544–1549. <https://doi.org/10.1073/PNAS.94.4.1544>
- Southwell, A. L., Franciosi, S., Villanueva, E. B., Xie, Y., Winter, L. A., Veeraraghavan, J., Jonason, A., Felczak, B., Zhang, W., Kovalik, V., Walt, S., Hall, G., Pouladi, M. A., Smith, E. S., Bowers, W. J., Zauderer, M., & Hayden, M. R. (2015). Anti-semaphorin 4D immunotherapy ameliorates neuropathology and some cognitive impairment in the YAC128 mouse model of Huntington disease. *Neurobiology of Disease*, 76, 46–56. <https://doi.org/10.1016/J.NBD.2015.01.002>
- Souza, G. F. P., Solon, C., Nascimento, L. F., De-Lima-Junior, J. C., Nogueira, G., Moura, R., Rocha, G. Z., Fioravante, M., Bobbo, V., Morari, J., Razolli, D., Araujo, E. P., & Velloso, L. A. (2016). Defective regulation of POMC precedes hypothalamic inflammation in diet-induced obesity. *Scientific Reports*, 6. <https://doi.org/10.1038/SREP29290>
- Squire, L. R. (2004). Memory systems of the brain: A brief history and current perspective. *Neurobiology of Learning and Memory*, 82(3), 171–177. <https://doi.org/10.1016/J.NLM.2004.06.005>
- Sun, T., Li, W., & Ling, S. (2016). miR-30c and semaphorin 3A determine adult neurogenesis by regulating proliferation and differentiation of stem cells in the subventricular zones of mouse. *Cell Proliferation*, 49(3), 270–280. <https://doi.org/10.1111/cpr.12261>
- Tashiro, A., Sandler, V. M., Toni, N., Zhao, C., & Gage, F. H. (2006). NMDA-receptor-mediated, cell-specific integration of new neurons in adult dentate gyrus. *Nature*, 442(7105), 929–933. <https://doi.org/10.1038/NATURE05028>
- Taylor, A. M. W., Castonguay, A., Ghogha, A., Vayssiere, P., Pradhan, A. A. A., Xue, L., Mehrabani, S., Wu, J., Levitt, P., Olmstead, M. C., De Koninck, Y., Evans, C. J., & Cahill, C. M. (2016). Neuroimmune Regulation of GABAergic Neurons Within the Ventral Tegmental Area During Withdrawal from Chronic Morphine. *Neuropsychopharmacology : Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 41(4), 949–959. <https://doi.org/10.1038/NPP.2015.221>
- Toledano, S., & Neufeld, G. (2023). Plexins as Regulators of Cancer Cell Proliferation, Migration, and Invasivity. *Cancers*, 15(16). <https://doi.org/10.3390/CANCERS15164046>
- Toll, L., Bruchas, M. R., Calo, G., Cox, B. M., & Zaveri, N. T. (2016). Nociceptin/Orphanin FQ Receptor Structure, Signaling, Ligands, Functions, and Interactions with Opioid Systems. *Pharmacological Reviews*, 68(2), 419. <https://doi.org/10.1124/PR.114.009209>


- Torreccilla, M., Quillinan, N., Williams, J. T., & Wickman, K. (2008). Pre- and postsynaptic regulation of locus coeruleus neurons after chronic morphine treatment: a study of GIRK knockout mice. *The European Journal of Neuroscience*, 28(3), 618. <https://doi.org/10.1111/J.1460-9568.2008.06348.X>
- Torres-Berrio, A., & Nava-Mesa, M. O. (2019). The opioid system in stress-induced memory disorders: From basic mechanisms to clinical implications in post-traumatic stress disorder and Alzheimer's disease. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 88, 327–338. <https://doi.org/10.1016/J.PNPBP.2018.08.011>
- Toubia, T., & Khalife, T. (2019). The Endogenous Opioid System: Role and Dysfunction Caused by Opioid Therapy. *Clinical Obstetrics and Gynecology*, 62(1), 3–10. <https://doi.org/10.1097/GRF.0000000000000409>
- Uhl, G. R., Koob, G. F., & Cable, J. (2019). The neurobiology of addiction. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1451(1), 5. <https://doi.org/10.1111/NYAS.13989>
- Uprety, R., Che, T., Zaidi, S. A., Grinnell, S. G., Varga, B. R., Faouzi, A., Slocum, S. T., Allaoa, A., Varadi, A., Nelson, M., Bernhard, S. M., Kulko, E., Rouzic, V. Le, Eans, S. O., Simons, C. A., Hunkele, A., Subrath, J., Pan, Y. X., Javitch, J. A. Majumdar, S. (2021). Controlling opioid receptor functional selectivity by targeting distinct subpockets of the orthosteric site. *ELife*, 10, 1–58. <https://doi.org/10.7554/ELIFE.56519>
- Wadenberg, M. L. G. (2003). A review of the properties of spiradoline: a potent and selective kappa-opioid receptor agonist. *CNS Drug Reviews*, 9(2), 187–198. <https://doi.org/10.1111/J.1527-3458.2003.TB00248.X>
- Waldhoer, M., Bartlett, S. E., & Whistler, J. L. (2004). Opioid Receptors. <https://doi.org/10.1146/Annurev.Biochem.73.011303.073940>, 73, 953–990.
- Weinstein, S. H., Pfeffer, M., Schor, J. M., Indindoli, L., & Mintz, M. (1971). Metabolites of naloxone in human urine. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 60(10), 1567–1568. <https://doi.org/10.1002/JPS.2600601030>
- Wilson-Poe, A. R., Lau, B. K., & Vaughan, C. W. (2015). Repeated morphine treatment alters cannabinoid modulation of GABAergic synaptic transmission within the rat periaqueductal grey. *British Journal of Pharmacology*, 172(2), 681. <https://doi.org/10.1111/BPH.12809>
- Xia, Y., & Haddad, G. G. (1991). Ontogeny and distribution of opioid receptors in the rat brainstem. *Brain Research*, 549(2), 181–193. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(91\)90457-7](https://doi.org/10.1016/0006-8993(91)90457-7)
- Xiao, T., Shoji, W., Zhou, W., Su, F., & Kuwada, J. Y. (2003). Transmembrane Sema4E Guides Branchiomotor Axons to Their Targets in Zebrafish. *Journal of Neuroscience*, 23(10), 4190–4198. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.23-10-04190.2003>
- Yang, W.-J., Hu, J., Uemura, A., Tetzlaff, F., Augustin, H. G., & Fischer, A. (2015). Semaphorin-3C signals through Neuropilin-1 and PlexinD1 receptors to inhibit pathological angiogenesis. *EMBO Molecular Medicine*, 7(10), 1267. <https://doi.org/10.15252/EMMM.201404922>
- Yin, L., Li, J., Wang, J., Pu, T., Wei, J., Li, Q., & Wu, B. J. (2021). MAOA promotes prostate cancer cell perineural invasion through SEMA3C/PlexinA2/NRP1-cMET signaling. *Oncogene*, 40(7), 1362–1374. <https://doi.org/10.1038/S41388-020-01615-2>
- Yudin, Y., & Rohacs, T. (2018). Inhibitory Gi/O-coupled receptors in somatosensory neurons: Potential therapeutic targets for novel analgesics. In *Molecular Pain* (Vol. 14). SAGE Publications Inc. <https://doi.org/10.1177/1744806918763646>
- Yuferov, V., Zhang, Y., Liang, Y., Zhao, C., Randesi, M., & Kreek, M. J. (2018). Oxycodone self-administration induces alterations in expression of integrin, semaphorin and ephrin genes in the mouse striatum. *Frontiers in Psychiatry*, 9(JUN), 257. <https://doi.org/10.3389/FPSYT.2018.00257>
- Zainuddin, M. S. A., & Thuret, S. (2012). Nutrition, adult hippocampal neurogenesis and mental health. *British Medical Bulletin*, 103(1), 89–114. <https://doi.org/10.1093/BMB/LDS021>
- Zarrindast, M. R., Dinkoub, Z., Homayoun, H., Bakhtiarian, A., & Khavandgar, S. (2002). Dopamine receptor mechanism(s) and morphine tolerance in mice. <http://dx.doi.org/10.1177/026988110201600312>, 16(3), 261–266. <https://doi.org/10.1177/026988110201600312>
- Zhang, G., Wu, X., Zhang, Y. M., Liu, H., Jiang, Q., Pang, G., Tao, X., Dong, L., & Stackman, R. W. (2016). Activation of serotonin 5-HT<sub>2C</sub> receptor suppresses behavioral sensitization and naloxone-precipitated withdrawal symptoms in morphine-dependent mice. *Neuropharmacology*, 101, 246. <https://doi.org/10.1016/J.NEUROPHARM.2015.09.031>
- Zhang, J., Haddad, G. G., & Xia, Y. (2000). Delta-, but not mu- and kappa-, opioid receptor activation protects neocortical neurons from glutamate-induced excitotoxic injury. *Brain Research*, 885(2), 143–153. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(00\)02906-1](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(00)02906-1)
- Zhang, Z., & Schulteis, G. (2008). Withdrawal from acute morphine dependence is accompanied by increased anxiety-like behavior in the elevated plus maze. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*, 89(3), 392. <https://doi.org/10.1016/J.PBB.2008.01.013>
- Zhou, Y., Bendor, J., Hofmann, L., Randesi, M., Ho, A., & Kreek, M. J. (2006). Mu opioid receptor and orexin/hypocretin mRNA levels in the lateral hypothalamus and striatum are enhanced by morphine withdrawal. *Journal of Endocrinology*, 191(1), 137–145. <https://doi.org/10.1677/JOE.1.06960>

## 8. EKLER

### 8.1. EK 1 Etik Kurul Kararı



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



KONÜDAM

**Karar Sayısı: 2024 – 032** **Karar Tarihi: 22.03.2024**

**Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Kararı**

NEÜ Tıp Fakültesi Fizyoloji ABD'den Prof. Dr. Selim KUTLU ve Kaniye Zeynep ÇALIŞKAN SAK'ın sunduğu 06 / 07 / 2022 tarih ve 2022 / 23 sayı ile onaylanan **"Deneysel Morfin Bağımlılığı Modeli Oluşturulmuş Sıçanlarda Merkezi Sinir Sistemindeki Semaforin 3A ve Reseptörleri Gen İfade Düzeylerinin Araştırılması"** isimli projenin başlığının **"Deneysel Morfin Bağımlılığı Modelinde Hipotalamik ve Hipokampal Semaforin 3A ve Reseptörleri Gen İfadelerinin Araştırılması"** olarak değiştirilmesi hususu 7 üyenin katılımı ile değerlendirildi.

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.

Prof. Dr. M. YILMAZ

---

**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/deneyseltip>