



T.C.
NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı
Tıbbi Biyoloji

Yüksek Lisans Tezi

**KISA SÜRELİ OPIOİT UYGULAMASININ EPİGENETİK MEKANİZMALAR
ÜZERİNE ETKİSİ**

Hadice EDİSON
ORCID: 0000-0002-9681-7351

Danışman
Prof. Dr. Ercan KURAR
ORCID: 0000-0002-9234-1560

Bu tez çalışması Necmettin Erbakan Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri
Koordinatörlüğü tarafından 221318007 numaralı proje ile desteklenmiştir.

Konya – 2023

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans eğitimim sürecinde eğitimimde önemli katkıda bulunan değerli danışman hocam Prof.Dr. Ercan KURAR'a;

Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof.Dr. Hasibe VURAL ve Prof.Dr. H. Gül DURSUN'a,

Tez çalışmasında kullanılan *in vivo* deneysel bağımlılık modeli dokularının sağlanmasındaki katkılarından dolayı Fizyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi sayın Prof.Dr. Selim KUTLU'ya,

Deneyimlerinden ve bilgisinden yararlandığım Doç.Dr. Canan EROĞLU GÜNEŞ'e,

Tezimin her aşamasında yardımını, deneyimlerini ve bilgisini esirgemeyen Arş.Gör. Sedef AKÇAALAN'a ve yüksek lisans öğrencisi Ebru Nur DURSUN'a,

Her daim beni destekleyen eşim Ruslan EDİSON'a, kızım Sabrina EDİSON'a ve kız kardeşim Farida NAZAROVA'ya,

Necmettin Erbakan Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'ne 221318007 numaralı proje ile desteklerinden dolayı,

Teşekkür ederim.

Hadice EDİSON

Eylül, 2023

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER.....	iv
TEZ ONAY SAYFASI.....	vi
TEZ ÇALIŞMASI ORJİNALLİK RAPORU	vii
BİLİMSEL ETİK BEYANNAMESİ	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	ix
ÖZET	xiv
ABSTRACT	xv
1.GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Madde bağımlılığı	3
2.1.1. Opioit bağımlılığı	6
2.1.2. Opioit reseptörleri	9
2.2. Beyin ödüllendirme mekanizmaları	11
2.3. Morfin.....	15
2.3.1. Morfin reseptörleri	16
2.3.2. Akut ve kronik kullanımda morfinin moleküler etkileri	17
2.4. Nalokson.....	20
2.5. Hipotalamus	21
2.6. Epigenetik.....	21
2.6.1. Epigenetik mekanizmalar	22
2.6.2. DNA metilasyonu.....	23
2.6.3. DNA-Metil-Transferazlar.....	23
2.7. MikroRNA	24
2.7.1. MikroRNA biyogenezi	25
3.GEREÇ VE YÖNTEMLER.....	27
3.1. Hipotalamus dokularının ve nöroblastoma hücrelerinin elde edilmesi	27
3.1.1. İn vivo model	27
3.1.2. İn vitro model	27
3.2. Total RNA izolasyonu.....	28
3.2.1. Total RNA örneklerinin kalitesinin belirlenmesi	28
3.2.2. DNase-I uygulamasıyla total RNA'dan gDNA'nın giderilmesi	28
3.3. Total RNA'lardan cDNA sentezi	28
3.4. qPZR primer dizaynı	29
3.5. Kantitatif PZR analizleri	30
3.6. İstatiksel analiz	30

4.BULGULAR	31
4.1. İn vitro model	31
4.2. İn vivo model	31
4.3. Total RNA izolasyonu ve cDNA sentezi	31
4.4. qPZR analizleri.....	33
5. TARTIŞMA	39
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	45
7. KAYNAKLAR	47
8. EKLER	55



TEZ ONAY SAYFASI

Necmettin Erbakan Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Öğrencisi **Hadice EDİSON**'nun "*Kısa Süreli Opioid Uygulamasının Epigenetik Mekanizmalar Üzerine Etkisi*" başlıklı tezi tarafımızdan incelenmiş; amaç, kapsam ve kalite yönünden Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Konya/19/09/2023

Tez Danışmanı	Prof.Dr. Ercan KURAR Necmettin Erbakan Üniversitesi Tıp Fakültesi/Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı	İmzası
Jüri Üyesi	Prof.Dr. Selim KUTLU Necmettin Erbakan Üniversitesi Tıp Fakültesi/Fizyoloji Anabilim Dalı	İmzası
Jüri Üyesi	Doç.Dr. Bahriye HORASANLI KTO Karatay Üniversitesi Tıp Fakültesi/Nöroloji Anabilim Dalı	İmzası

Yukarıdaki tez, Necmettin Erbakan Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunun 04/10/2023 tarih ve 26/11 sayılı kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Hasibe VURAL
Enstitü Müdürü

TEZ ÇALIŞMASI ORJİNALLİK RAPORU

“*Kısa Süreli Opioid Uygulamasının Epigenetik Mekanizmalar Üzerine Etkisi*” başlıklı tez çalışmamın toplam **56** sayfalık kısmına ilişkin, 21/08/2023 tarihinde tez danışmanım tarafından **Turnitin** adlı intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan orijinallik raporuna göre, tezimin benzerlik oranı **%3** 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

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.

19/09/2023

Hadice EDİSON

Prof. Dr. Ercan KURAR

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.

19.09.2023

Hadice EDİSON

SİMGELER VE KISALTMALAR

SİMGELER

Ca ²⁺	: Kalsiyum
K ⁺	: Potasyum
C	: Sitozin
G	: Guanin



KISALTMALAR

AC	: Adenilat siklaz
cAMP	: Siklik Adenozin Monofosfat
cDNA	: Komplementar deoksiribonükleik asit
CREB	: cAMP'ye Duyarlı Element Bağlayıcı Protein
DA	: Dopamin
DAG	: Diaçilgliserol
DICER	: RNAaz III enzimi
DNA	: Deoksiribonükleik asit
DGCR8	: Di George kritik sendrom bölgesi 8
DOR	: Delta Opioit Reseptörü
DNMT	: DNA metil transferaz
DROSHA	: RNAaz III enzimi
GABA	: Gama Aminobütirik Asit
GTP	: Guanosin-5'-trifosfat
gDNA	: Genomik DNA
IP3	: İnositol 1,4,5-Trisfosfat
KOR	: Kappa Opioit Reseptörü
MAP	: Mitojenle Aktifleştirilmiş Protein
mRNA	: mesajcı RNA
miRNA	: mikroRNA
MOR	: Mü Opioit Reseptörü
MSS	: Merkezi Sinir Sistemi
M3G	: Morfin-3-Glukuronid
M6G	: Morfin-6-Glukuronid
NAc	: Nükleus Akumbens
ncRNA	: Kodlanmayan RNA
PFC	: Prefrontal Korteks
PIP2	: Fosfatidilinositol 4,5-bifosfat
PKA	: Protein Kinaz A
PLC	: Fosfolipaz-C
Pri-miRNA	: Primer- ilk RNA
Pre-RNA	: Prekürsor – öncül RNA

qRT-PZR

: Kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu

VTA

: Ventral Tegmental Alan



TABLolar LİSTESİ

Tablo No	Sayfa No
Tablo 2.1. Opioid reseptörleri ve etkileri.....	10
Tablo 3.1. Çalışmada kullanılan genlere ait primer bilgileri	29



ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil No	Sayfa No
Şekil 2.1. Opioid sinyal ileti mekanizmaları.....	8
Şekil 2.2. Presinaptik nöronlardan transmitterlerin sinaptik boşluğa boşalması.....	8
Şekil 2.3. Dopaminerjik yollar.....	13
Şekil 2.4. Morfine bağlı ödüllendirme etkisinin mekanizmaları.....	14
Şekil 2.5. Morfinin moleküler yapısı.....	15
Şekil 2.6. Akut ve kronik morfin etkisinin moleküler mekanizması.....	18
Şekil 2.7. Naloksonun moleküler yapısı.....	21
Şekil 2.8. Genel mikroRNA yolağı.....	25
Şekil 4.1. Morfinin SH-SY5Y hücrelerinde canlılık üzerine etkisi	31
Şekil 4.2. DNA metil transferaz (DNMT) ve referans genlerine ait agaroz jel elektroforez görüntüsü	32
Şekil 4.3. miRNA biyogenez yolağı genlerine ait agaroz jel elektroforez görüntüsü	32
Şekil 4.4. DNA metil transferaz (DNMT) ve referans genlerine melting curve analizi.....	32
Şekil 4.5 . miRNA biyogenez yolağı genlerine ait melting curve analizi	33
Şekil 4.6. <i>İn vitro</i> bağımlılık modelinde DNMT genlerinin ifade düzeyleri.....	34
Şekil 4.7. <i>İn vitro</i> bağımlılık modelinde miRNA biyogenez yolağı genlerinin ifade düzeyleri.....	35
Şekil 4.8. <i>İn vivo</i> bağımlılık modelinde DNMT genlerinin ifade düzeyleri	36
Şekil 4.9. <i>İn vivo</i> bağımlılık modelinde miRNA biyogenez yolağı genlerinin ifade düzeyleri.....	37

ÖZET

Necmettin Erbakan Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı
Tıbbi Biyoloji
Yüksek Lisans Tezi

KISA SÜRELİ OPIOİT UYGULAMASININ EPIGENETİK MEKANİZMALAR ÜZERİNE ETKİSİ

Hadice EDİSON

Konya-2023

Morfin, şiddetli ağrıların tedavisinde kullanılan güçlü analjezik etkiye sahip bir opioit alkaloiddir. Morfinin kötüye kullanımı; beyin nöronlarında meydana gelen adaptasyon ile nöron fonksiyonlarını değiştirmektedir. Morfin bağımlılığını açıklamaya yönelik bazı teoriler ileri sürülmüştür, ancak henüz kesin olarak ispatlanmamıştır. Morfin ve diğer opioitlerin epigenetik etkilerini ortaya koyan çalışmalar bulunmaktadır. Farklı transkripsiyon faktörlerini etkileyerek ve dolaylı epigenetik modifikasyonlar sonucunda bazı genlerin ifadesinde değişikliğe neden olabilmektedir. Bu tez çalışmasının amacı; kısa süreli opioit uygulamasının miRNA biyogenez yoluyla ve metilasyon profili üzerine etkili DNMT (DNA metil transferaz) genlerinin ifadeleri üzerine etkisinin *in vitro* ve *in vivo* model kullanılarak araştırılmasıdır.

İn vivo morfin bağımlılığı ve çekilmesi sıçan modelinde; kontrol (K), 7 gün 10 mg/kg morfin (M) ve 10 mg/kg morfin bağımlılığı + 1 mg/kg nalokson (M+N) grubu sıçanların hipotalamus dokuları kullanılmıştır. *İn vitro* modelde ise sinir bilim çalışmalarında altın standart olarak tercih edilen SH-SY5Y insan nöroblastom hücre hattı kullanılmıştır. Kontrol, en yüksek toksik olmayan morfin (10 µM), 10 µM nalokson ve 10 µM morfin +10 µM nalokson grubu oluşturulmuştur. Doku ve hücre örneklerinden total RNA izolasyonu ve cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir. miRNA biyogenezi yolağı ve DNMT genlerin ifadesi qPCR ile tespit edilmiş ve gruplar arası farklar istatistiksel analizler ile karşılaştırılmıştır.

XTT analizi sonucunda SH-SY5Y hücrelerinde en yüksek toksik olmayan morfin dozu 10 µM olarak tespit edilmiş ve *in vitro* bağımlılık modelinde kullanılmıştır. Morfin uygulamasının DNMT1 DNMT2 ve DNMT3B genlerinin ifadesini artırdığı, nalokson uygulamasının ise baskıladığı gözlenmiştir. TRBP2 hariç, miRNA biyogenez yolağında bulunan genlerin morfin grubunda artmış ifadesinin nalokson uygulaması ile baskılandığı gözlenmiştir. *İn vitro* ve *in vivo* bağımlılık modellerinde gen ifadesi düzeyleri genel olarak benzer bulunmuştur. DNMT genlerinin ifadesinin M grubuna ait hipotalamus dokusunda artmış, M+N grubunda ise baskılanmıştır, ancak yalnızca DNMT3A geninde anlamlı fark tespit edilmiştir. Morfin grubunda artmış DGRC8, XPO5 ve AGO1 ifadesinin nalokson uygulaması ile baskılandığı gözlenmiştir.

Morfin ve nalokson uygulamasının epigenetik düzeyde çalışmaya konu olan genlerin ifadesini genel olarak etkilediği tespit edilmiştir. Bu tez projesi kapsamında; *in vivo* ve *in vitro* subkronik opioit bağımlılık modellerinin etkinliğinin karşılaştırılması gerçekleştirilmiştir. *İn vitro* modelin etkin bulunması; farklı farmakojik uygulamalar ve opioit bağımlılığın fizyopatolojisinin daha iyi anlaşılmasına katkı sağlaması beklenmektedir. Deney hayvan modellerine olan gereksinime alternatif olarak, sağlayacağı etik ve teknik kolaylıklar nedeniyle transkripsiyonel düzeyde benzer çalışmaların gerçekleştirilmesine olumlu yönde etkisi beklenmektedir.

Anahtar Kelimeler: Epigenetik, mikroRNA biyogenezi, Morfin.

ABSTRACT

Necmettin Erbakan University, Graduate School of Health Sciences
Department of Medical Biyology
Medical Biyology
Master Thesis

THE EFFECT OF SHORT-TERM OPIOID ADMINISTRATION ON EPIGENETIC MECHANISMS

Khadija EDISON

Konya-2023

Morphine is an opioid alkaloid with a strong analgesic effect, used in the treatment of severe pain. Abuse of morphine changes neuron functions with the adaptation occurring in brain neurons. Some theories have been proposed to explain morphine addiction, but have not yet been conclusively proven. Indirect epigenetic modifications and influencing different transcription factors cause changes in gene expression. There are also studies revealing the epigenetic effects of morphine and other opioids. It is known that some miRNA levels change and even affect the next generations epigenetically. The aim of this thesis is to investigate the effect of short-term opioid administration on the expression of miRNA biogenesis pathway and DNMT (DNA methyl transferase) genes, which are effective on methylation profile using an *in vitro* and *in vivo* model.

In the *in vivo* morphine addiction and withdrawal rat model, hypothalamus tissues of control (C), 7 days of 10 mg/kg morphine (M) and 10 mg/kg morphine addiction+ 1 mg/kg naloxone (M+N) groups were used. In the *in vitro* model, the SH-SY5Y human neuroblastoma cell line, preferred as the gold standard in neuroscience studies, was used. The control, 10 µM highest non-toxic morphine dose, 10 µM naloxone and 10 µM morphine+10 µM naloxone groups were formed. Total RNA isolation and cDNA synthesis were performed from tissue and cell samples. The expression levels of miRNA biogenesis pathway and DNMT genes were determined by qPCR and the differences between groups were compared by statistical analysis.

Based on the XTT analysis, highest non-toxic morphine dose was determined as 10 µM in SH-SY5Y cells, which was used in *in vitro* morphine addiction model. Expression levels of DNMT1, DNMT2 and DNMT3B were found to be elevated in morphine group; however, naloxone administration downregulated this increase. Except TRBP2, increased expression levels of miRNA biogenesis genes in morphine group were downregulated in morphine+naloxone groups. Gene expression profiles were generally found to have similar profile in both *in vivo* and *in vitro* models. Steady-state levels DNMTs were upregulated in M groups and downregulated in M+N group of hypothalamus tissues. However, this difference was significant for DNMT3A. Increased levels of DGRC8, XPO5 and AGO1 in morphine group were decreased by naloxone application.

Morphine and naloxone administration affected gene expression levels, which indicated an epigenetic regulation mechanisms. This thesis project allows comparison of the effectiveness of *in vivo* and *in vitro* subchronic opioid addiction models. Findings suggested that *in vitro* model is found to be effective. Therefore, it is expected to contribute to a better understanding of different pharmacological applications and the physiopathology of opioid addiction. As an alternative to the need for experimental animal models, it is expected to have a positive effect on similar studies at the translational level due to the ethical and technical conveniences.

Keywords: Epigenetics, miRNA biogenesis, Morphine.



1.GİRİŞ VE AMAÇ

Opioit ve benzeri maddelerin asıl kullanım amaçları tıbbi yardımdır. Ancak, kötüye kullanıma açık olması ve doğal birçok maddeden veya ucuz şekilde sentetik olarak üretilmesi madde bağımlılığına yol açmaktadır. Morfin, şiddetli ağrıların tedavisinde kullanılan güçlü analjezik etkiye sahip bir opioit alkaloididir (National Institute on Drug Abuse, 2021). Morfinin kötüye kullanımı; beyin nöronlarında meydana gelen adaptasyon ile nöron fonksiyonlarını değiştirmektedir ve zamanla tolerans ve yoksunluk belirtileri ortaya çıkmaktadır (Thompson ve ark., 2012). Morfin bağımlılığını açıklamaya yönelik bazı teoriler ileri sürülmüştür, ancak henüz kesin olarak ispatlanmamıştır. Kronik maruziyet, merkezi sinir sisteminde (MSS) bazı yolakları baskılar ve/veya aktif olmayan yedek yolaklar etkin duruma gelir. Kullanım aniden kesilince, normal yolaklar tekrardan çalışmaya başlar. Ancak, yedek yolakların aktif kalması yoksunluk belirtilerinin ortaya çıkmasına sebep olur (Kayaalp ve Uzbay, 2009). Ayrıca nöronal yolaklarda sinyal akışını baskılayarak, reseptör duyarlılığının artmasına sebep olur. Maddeye kronik maruz kalma nörotransmitterlerin salınımını baskılar ve nöronal aktiviteyi azaltır. Bu durum reseptör sayısını artırır. Bu durum; yeni reseptörlerin sentezi ve/veya latent reseptörlerin etkin hale gelmesi olarak açıklanmaktadır. Akut ve kronik opioit bağımlılığın gelişiminde etkili olan farklı moleküler düzeyde araştırıldığı literatür bilgi bulunmaktadır (Allahverdiyev, 2014).

Morfin farklı transkripsiyon faktörlerini etkileyerek, farklı gen(ler)in ifadesinde değişikliğe neden olmaktadır. Morfin ve diğer opioitlerin epigenetik etkilerini ortaya koyan çalışmalar bulunmaktadır. Özellikle, farklı genlerin promotör bölgelerinde modifikasyonlar ile gen ifadesini etkilemektedir. Ayrıca, morfin bağımlılığında bazı miRNA seviyelerinin değişiklik gösterdiği hatta epigenetik olarak bir sonraki nesilleri etkilediği bilinmektedir.

Kısa süreli opioit uygulamasının epigenetik mekanizmalar üzerindeki etkisi, son zamanlarda yapılan araştırmalarla daha iyi anlaşılmaktadır. Epigenetik mekanizmalar, DNA diziliminde kalıcı değişiklikler yapmayan ancak gen ifadesini etkileyen mekanizmalardır. Bu mekanizmalar, çevresel faktörler, stres ve diğer faktörler tarafından etkilenebilir ve çeşitli hastalıkların gelişiminde önemli bir rol oynayabilir (Jaenisch ve Bird, 2003).

Kısa süreli morfin uygulamasının farelerde beyin dokusunda DNA metilasyonunda değişikliklere neden olduğu bulunmuştur. Bu değişiklikler, morfinin belirli genleri nasıl etkilediğini ve bağımlılık riskini nasıl arttırdığını açıklayabilir (Munoa-Hoyos ve ark., 2021; Yu ve ark., 2003). Benzer şekilde, bir başka araştırmada, kısa süreli fentanil uygulamasının

insan beyin dokusunda DNA metilasyonunda değişikliklere neden olduğu ve bu değişikliklerin kronik ağrıya neden olan genleri etkilediği gösterilmiştir (Caputi ve ark., 2021).

Kısa süreli oksikodon uygulamasının farelerde beyin dokusunda histon değişikliklerine neden olduğu ve bu değişikliklerin uzun vadeli ağrıya neden olan genleri etkilediği gösterilmiştir. Histon, DNA ile birlikte kromozomların yapısal bileşenleridir ve histon değişiklikleri, gen ifadesini etkileyerek çeşitli hastalıklara neden olabilir (Pryce ve ark., 2023).

Bu bulgular, kısa süreli opioit uygulamasının epigenetik mekanizmalar üzerinde etkili olduğunu ve bu etkilerin uzun vadeli sonuçlara yol açabileceğini göstermektedir. Bu sonuçlar, opioitlerin kullanımını düzenlemek ve bağımlılık riskini azaltmak için daha fazla önleyici tedbir alınmasını gerektirmektedir.

Ayrıca, opioitlerin epigenetik etkilerinin yanı sıra, opioit kullanımının bağırsak mikrobiyotası üzerinde de etkisi olduğu gösterilmiştir. Bağırsak mikrobiyotası, sindirim sistemindeki mikroorganizmaların toplamıdır ve sağlık üzerinde önemli bir etkiye sahiptir. Literatür bulgular opioit kullanımının bağırsak mikrobiyotasında değişikliklere neden olduğunu ve bu değişikliklerin bağırsak iltihabı, depresyon ve anksiyete gibi hastalıklara neden olabileceğini göstermiştir (Banerjee ve ark., 2016).

Literatürde, opioit uygulamasının miRNA biyogenez yolağı (dolaylı) ve metilasyon profili üzerine etkili DNMT (DNA metil transferaz) genlerinin (direkt) ifadeleri üzerine etkisinin araştırıldığı çalışma bulunamamıştır. Bu tez çalışmasının amacı; kısa süreli opioit uygulamasının miRNA biyogenezi ve metilasyon profili üzerine etkili DNMT genlerinin ifadeleri üzerine etkisinin *in vitro* ve *in vivo* model kullanılarak araştırılmasıdır. Özellikle *in vitro* modelin etkin bulunması durumunda; farklı farmokojik uygulamalar ve opioit bağımlılığın fizyopatolojisinin daha iyi anlaşılmasına katkı sağlaması beklenmektedir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Madde Bağımlılığı

Bağımlılık, karşılaşılan bir deneyimin tekrar-tekrar yaşama isteği ve sıklıkla arama motivasyonu olarak değerlendirilir. Bağımlılık, kronik bir ihtiyaç olup, eğer karşılanamaz ise psikolojik ya da fiziksel huzursuzluk oluşturur (Townsend, 2011). Zaman içerisinde iyice yerleşmiş olan bağımlılık durumu kişiye manevi ve maddi zarar verse de, kişi bu durumdan vazgeçememektedir (Furnham, 2014). Madde bağımlılığı ise, bağımlılık yapan bir maddenin insan sağlığını ve hayatını olumsuz yönde etkilemesine rağmen madde alma ve kullanma arzusunu durduramamasıdır (Merikangas ve McClair, 2012). Diğer bir ifade ile madde bağımlılığı, beyinin ödül devrelerinde yerleşen farklı nörotransmitterlerin adaptif değişikliklerine yol açan kronik bir beyin bozukluğudur.

Madde, vücuda girdiğinde bağımlılık yapan ruhsal, davranışsal ve fiziksel değişikliklere neden olan bir kimyasaldır (Trigo ve ark., 2010). Bağımlılık yapan maddelerin temel farmakolojik özelliği ödüllendirici ve pekiştirici etkisinin olmasıdır (Balster, 1991). Zevk alma sebebiyle kişi tekrar-tekrar bu maddeyi kullanmaya teşvik olursa “pozitif pekiştirici”, madde almayı bırakınca keyifte azalmaya neden oluyorsa “negatif pekiştirici” olarak adlandırılır. Madde kesilince ise olumsuz belirtiler belirginleşip yoksunluk sendromununun gelişmesine sebebiyet verir (Kayaalp, 2005).

Bağımlılık psikolojik ve fiziksel bağımlılık olarak ikiye ayrılır (Ögel, 2010). İyi olma algısını iyileştirmek için kompulsif madde alma isteği psikolojik bağımlılık olarak tanımlanır. Fiziksel bağımlılık ise beyindeki hedef nöron reseptörlerinde, bu reseptörlere bağlı efektör membran proteinlerinde ve postreseptör fonksiyonlarında, maddenin yaptığı değişiklikler sonucu oluşan nöroadaptasyonlardır (Kayaalp, 2005). Fiziksel bağımlılıkta bu değişiklikler madde alımının kesilmesinden sonra karakteristik yoksunluk belirtilerinin ortaya çıkmasına yol açar. Bu belirtilerin şiddeti, kullanılan maddenin türü, dozu, kullanım süresi, kullanıcının yaşı ve genetik yatkınlığı gibi çeşitli faktörlere bağlıdır (Goodman, 2008; Bodnar, 2016).

Dünya Uyuşturucu Raporuna göre, 2019 yılında dünya genelinde 275 milyon kişi en az bir kere madde kullanmıştır. Bu kişilerden 62 milyonu opioit kullanıcısıdır. Dünya genelinde yaklaşık 0,5 milyon insan ise madde kullanımı sebebiyle ölmektedir. Bu ölümlerin %70’i opioit bağımlılığı, %30’u ise aşırı doza bağlıdır (UNODC, 2021).

Opioit ve benzeri maddelerin asıl kullanım amaçları tıbbi yardımdır. Ancak, bu maddelerin kötüye kullanıma açık olması ve doğada var olan birçok maddeden ucuz veya sentetik olarak üretilmesi madde bağımlılığına yol açmaktadır. Bağımlılık yapan maddeleri; tütün, alkol, esrar, kokain, kafein, uçucu maddeler, opioitler (eroïn, morfin, kodein, afyon) ve amfetamin olarak sıralayabiliriz.

Madde bağımlılığı, genellikle madde kullanımının dozu veya kullanım sıklığını artırarak başlar. Daha sonra, kullanıcı bu maddeyi bırakmak için istekli olsa bile, yoksunluk belirtileri, fiziksel ve zihinsel rahatsızlıklar ve diğer olumsuz sonuçlar nedeniyle bırakamayabilir (National Institute on Drug Abuse, 2021).

Sürekli opioit kullanımı, opioit reseptörlerinin hassasiyetini ve sayını değiştirir. Bu zaman tolerans ve yoksunluk belirtileri ortaya çıkar. Tolerans, istenen ilk etkiyi elde etmek için artan miktarlarda maddeye başvurma ihtiyacıdır. Yoksunluk ise uzun zaman kullanılan bir maddenin dozunun azaltıldığında veya alımının kesildiğinde ortaya çıkan fizyolojik bir olaydır. Yoksunluk belirtilerinin ortaya çıkmasından sonra kişi bu durumu ortadan kaldırmak için madde kullanımını tekrarlar. Maddeye ara verildiğinde kişide yoksunluk belirtileri ortaya çıkmışsa, bu kişilerde maddeye karşı fiziksel bağımlılık oluşmuştur.

Tolerans, fiziksel bağımlılığın ve yoksunluk sendromunun mekanizmaları henüz net bilinmemektedir. Kullanılan maddenin kendi reseptörlerinin MSS'ne etki etmesi sonucu MSS'de ortaya çıkan adaptif cevaplar tolerans gelişmesine sebep gösterilse de halen etki mekanizması net olarak açıklanmamıştır. Tolerans metabolik ve fizyolojik olmak üzere iki farklı etki gösterebilir. Metabolik tolerans; alınan maddeyi metabolize eden enzimin aşırı faaliyeti ile vücuttan atılımının hızlandırılmasıdır. Fizyolojik tolerans veya hücresele tolerans ise devamlı kullanılan bir maddenin etkisini dengelemek için organizmanın farklı etki mekanizmaları kullanarak vücudun kendini ayarlayabilmesidir. Bu durum bir çeşit homeostazdır. Madde ilk olarak alındığında organizma yeni duruma alışmaya çalışırken, homeostaz ile eski dengeyi tekrardan ayarlamaya çalışmaktadır. Tolerans alınan maddenin birden fazla etkisine karşı geliştirilir ise nonspesifik tolerans, yalnızca bir etkisine karşı ise spesifik tolerans olarak adlandırılır. Örneğin, vücut ısısı normalin altına düştüğünde organizma bu durumu dengelemek için birçok savunma mekanizmaları yaratabilir. Bu durum spesifik toleranstır. Eğer madde postsinaptik reseptörlerden birini baskılar ve nörotransmitterlerin reseptörleri üzerinde etkisi azalır, iki mekanizma kullanılarak nörotransmitterleri yeniden etkinleştirir. İlk olarak postsinaptik membrandaki reseptörlerin sayını azaltır, sonra presinaptik

nöronlardan daha çok nörotransmitterlerin salınımını gerçekleştirir. Bu ise nonspesifik toleransdır (Kayaalp ve Uzbay, 2009).

Akut ve kronik tip tolerans zamana bağımlı olarak gelişen iki tip toleranstır. Akut, madde alınımından hemen sonra, kronik tolerans ise sürekli madde alınımı esnasında zamanla gelişir (Uzbay, 2009). Maddenin tekrar kullanımında kullanılan maddenin etkilerinin artması duyarlaşma olarak adlandırılır (Robinson ve Berridge, 1993). Duyarlaşmanın etki mekanizması mezolimbik dopaminerjik sistemle ilişkilidir (Uzbay, 2009).

Fiziki bağımlılığa ve yoksunluk sendromuna neden olan MSS değişkenliklerinin neler olduğu net bilinmemektedir. Morfin bağımlılığını açıklamaya yönelik bazı teoriler ileri sürülmüştür, ancak henüz kesin ispatlanmamıştır. Bu teorilerden ilki; maddeye kronik maruz kalma MSS'de belli bir sinir yolağını baskılar. Kullanımdan önce aktif olmayan bazı yedek yolaklar etkin duruma gelir. Kullanım aniden kesilince normal yolak tekrardan çalışmaya başlar. Ancak, yedek yolakların da aktif kalması yoksunluk belirtilerinin ortaya çıkmasına sebep olur. İkinci teori; zamanla postsinaptik reseptörlerin aktivasyonu baskılayıcı yolağın faaliyetini artırır. Aynı zamanda madde presinaptik otoreseptörleri de etkiler. Presinaptik uçtan nöromediyatorların salınımı baskılanır. Bu ise postsinaptik membranda reseptör artışına sebep olur. Madde kesilince nöromediyatörler eskisi gibi salgılansa da, artan postsinaptik reseptör sayısı daha kuvvetli etki oluşturmaktadır (Kayaalp ve Uzbay, 2009). Morfin tipi bağımlılıkta ileri sürülen diğer bir teori; madde uzun süre kullanıldığında nöronal yolaklarda sinyal akışını baskılayarak, reseptör duyarlılığının artmasına sebep olur. Başka bir teori ise reseptör sayısındaki artıştır. Maddeye kronik maruz kalma nörotransmitterlerin salınımını baskılar ve nöronal aktiviteyi azaltır. Bu durum reseptör sayısını artırır. Buna sebep yeni reseptörlerin sentezi ve ya latent reseptörlerin etkin hale gelmesi gösterilmektedir (Allahverdiyev, 2014).

Fiziksel bağımlılığın şiddeti madde kullanılmadığında yaranan yoksunluk belirtileri ile kıymetlendirilir. Bu belirtiler kişisel özelliklerin yanı sıra, bağımlılık yapan maddenin türüne göre de farklılık göstermektedir. Yoksunluk belirtileri; kusma, bulantı, baş ağrısı, terleme, uykusuzluk, burun akıntısı, anksiyete, dikkat dağınıklığı, halsizlik, karın krampları, ishal gibi ortaya çıkan istenmeyen fizyolojik durumlardır. Yoksunluk belirtileri madde kullanımının kesilmesinden 4 saat sonra ortaya çıkar, 48-72 saatte maksimuma ulaşır.

Morfinin aniden kesilmesi sonucu ortaya çıkan yoksunluk sendromunda glutamaterjik aktivitenin attığı ve buna bağlı olarak NMDA reseptörlerinde artmış duyarlaşma olduğuna dair

ireli sürülmüş çalışmalar vardır. Deney hayvanları üzerinde yapılan MK-801 gibi NMDA reseptör antagonistinin verilmesi ve buna bağlı olarak yoksunluk belirtilerinin şiddetini hafifletilmesinin gözlemlenmesi bu sonuçları desteklemektedir (O'Brien, 1996).

Stresi azaltma, sosyal ödüllendirme, aidiyet duygusunu kuvvetlendirme, cinsel tatmin ve performans artırma madde kullanımının birçok sebepleri arasında yer almaktadır (Çakmak ve Eren, 2006). Bağımlılığın oluşmasında kişisel ve sosyo-kültürel faktörler de rol oynamaktadır (Kayaalp, 2005). Madde bağımlılığında ayrıca fiziksel sağlık sorunları (örneğin; hepatit B ve C, tromboz, HIV, solunum ve kalp sorunları), zihinsel sağlık sorunları (kaygı, depresyon, paranoya ve intihar girişimleri), sosyal zorluklar (işsizlik, ilişki sorunları, finansal zorluklar) ve hukuki sorunlar ile karşılaşmaktadır (British Psychological Society, 2008). Madde bağımlılığı olgusunu azaltmaya yönelik çok sayıda sosyal, psikolojik ve tıbbi çalışmalara rağmen, opioit kullanım bozukluğu olan kişilerin sayısı dünya çapında giderek artmaktadır.

2.1.1. Opioit bağımlılığı

Opioit bağımlılığı, özellikle A.B.D.'de bir halk sağlığı krizi haline gelmiştir. Opioitler, ağrı kesici olarak kullanılan ve genellikle morfin veya kodein gibi doğal olarak bulunan maddeler veya sentetik opioitler olarak adlandırılan fentanil gibi yapay olarak üretilen maddelerdir. Bu ilaçlar, uzun süreli ağrı tedavisi için reçete edilebilir veya uyuşturucu olarak kötüye kullanılabilir (Volkow ve McLellan, 2016).

Opioit bağımlılığı, opioitlerin düzenli olarak kullanılmasıyla gelişir ve hangi sıklıkta, ne kadar süre kullanılması ve miktarın yanı sıra kişiye yapacağı hassasiyet faktörlerine göre de değişir (World Health Organisation, 2006). Opioitler, dokularda kendi reseptörlerine bağlanarak analjezi tedavisinde kullanılan ajanlardır. Analjezik etkilerini merkezi ve periferik sinapslar ile yaparlar (Bodnar ve Klein, 2005). Kalsiyum kanallarının baskılanması, potasyum kanallarının aktivasyonu ve cAMP düzeyini azaltarak pre- ve postsinaptik mekanizmalar ile ağrı iletimini bloke ederler (Holden ve ark., 2005). Analjezik etkisinin yanı sıra, öksürük, ishal, postoperatif ağrıların ve birçok rahatsızlığın tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Al-Hasani ve Bruchans, 2011).

Opioitler endojen, doğal, sentetik ve yarı sentetik olarak sınıflandırılır. Vücutta doğal olarak sentezlenen: endorfin, enkefalin ve dinorfin endojen opioitlerdir. Doğal opioitler: morfin, kodein ve tebaindir. Doğal opioitlerden kimyasal yolla sentezlenen eroin, hidromorfin ve

oksikodon yarı sentetik opioidlerdir. Tam sentetik opioidler ise: metadon, tramadol, petidin ve fentanildir (Allahverdiyev, 2014).

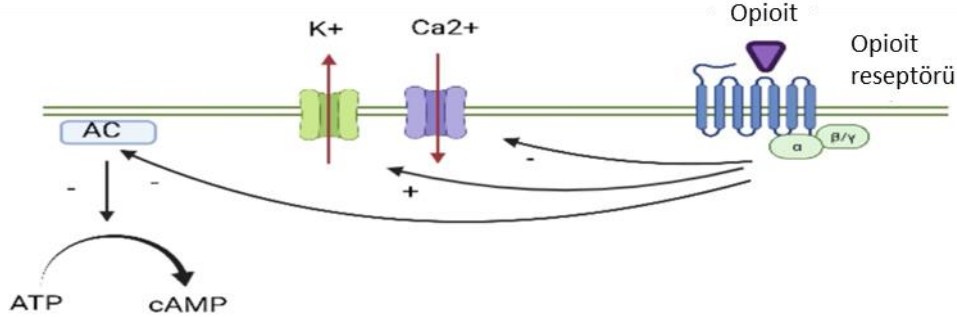
Opioidler etkilerini, merkezi ve periferik sinir sisteminde yaygın olarak bulunan opioid reseptörleri ve transmitterlerden, endojen opioid peptidlerinden oluşan endojen opioid sistemini uyarak göstermektedir. Endojen opioid sistemi sinir sisteminin yanı sıra immün sistem, üreme sisteminde de bulunur.

Endojen opioidler doğal analjezik etkiye sahiptirler. Etkilerini G proteine bağlı MOR, DOR ve KOR reseptörleri üzerinden gösterirler. Bu peptidler ve reseptörleri öğrenme, bellek, nosisepatif ve emosyonel davranış ile ödül sistemi gibi birçok fizyolojik süreçlere aracılık ederler (Bodnar, 2016). Endojen opioidler kendi reseptörlerine bağlanarak beyin zevk ve ödül maddesi olan dopamin (DA) salınımı gerçekleştirir (Mcbride ve ark., 1999). Ekzojen opioidler, endojen opioid salınımını baskılayarak fiziksel bağımlılık gelişmesine sebep olur. Uzun süre opioid alımı, bradikardi, bulantı, kusma, baş ağrısı, solunum baskılanması, hipertansiyon, kaşıntılı deri, kabızlık, osteoporoz, aritmiler, seksual disfonksiyon, periferik ödem, ağız kuruluğu, azalmış böbrek fonksiyonu, gastroözofajiyal reflü gibi yan etkilere sebep olur (Harris, 2008).

Opioidler, kendi reseptörlerini direk uyarak endojen opioidlerle benzer özellikler gösterebilirler (De Vries ve Shippenberg, 2002). Opioidler nöronlara inhibisyonla ve membran potansiyelindeki değişkenliklere neden olur (Jordan ve Devi, 1998). Hücresel etki mekanizmaları; adenilat siklaz inhibisyonu, kalsiyum kanallarının bloke edilmesiyle Ca^{2+} alımının azalması ve $G\alpha_i$ protein etkileşimi ile hücre dışına K^+ iyonlarının diffizyonudur (Rosenbaum ve ark., 2009). Tüm opioid reseptörleri G_i/o - proteinleri üzerinden adenilat siklaz enzimini baskırlar. Ardından siklik adenzin monofosfat (cAMP) seviyesinin azalması ve inhibisyon etkisidir (Şekil 2.1).

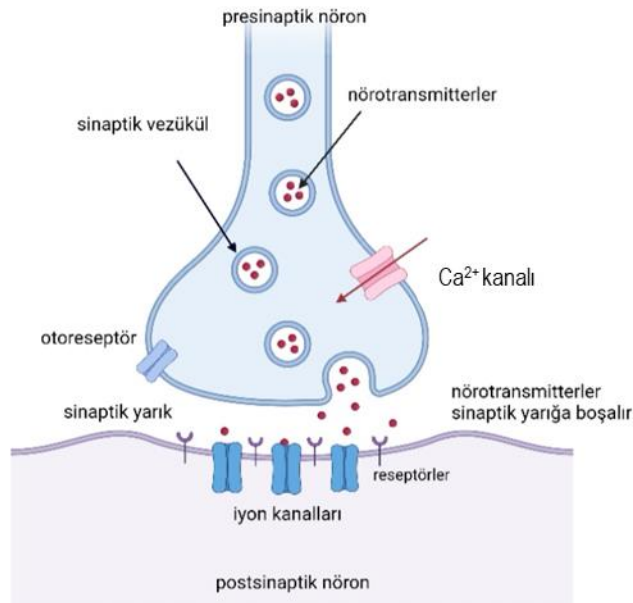
Opioid reseptörler G proteinin alt birimi ile eşleşmiş 7 transmembran üniteye sahiptir. Bu reseptörlerinin hücre dışında kalan kısmı N-terminal, hücre içi kısmı ise C-terminal olarak adlanır. N-terminale opioid reseptör agonisti, C-terminale ise G proteini bağlanır. G_s proteinine birleşik reseptörler AC enziminin faaliyetini arttırır. AC enziminin aktif hale gelmesi cAMP sentezini arttırır ve Protein Kinaz A (PKA)'yı etkinleştirir. Bu durum çok sayıda protein, iyon kanalı ve birçok enzimlerin fosforilasyonuna neden olur. G_i proteini ise cAMP aktivasyonu baskırlar. Ligand reseptöre bağlanınca G proteinin α alt birimi GTP (guanosen 5' trifosfat) ile

birleşir ve G proteinin β ve γ alt birimleri α alt biriminden ayrılır. Ligand reseptörden ayrılınca α alt birimi GTP'den ayrılır, yeniden β ve γ alt birimlerine bağlanır. Adenilat siklaz Gi tarafından baskılanır ve cAMP üretimi önlenir (Al-Hasani ve Bruchans, 2011).



Şekil 2.1. Opioid sinyal ileti mekanizmaları (Chen ve ark., 2006). Adenilat siklaz, Gi tarafından baskılanır ve cAMP üretimi önlenir. Aynı zamanda Gi proteini Ca^{2+} kanallarını baskımlarken, K^{+} kanallarının aktivasyonunu artırarak hücre içine potasyum girişini artırır.

Ca^{2+} kanalları merkezi ve periferik sinir sisteminde yerleşmiş nöronların hücre zarında bulunmaktadır. Presinaptik nöronların içerisine kalsiyum akışına neden olur, bu durum nörotransmitterlerin sinaptik boşluğa salınımına neden olur. Opioid, agonist tarafından uyarıldığında G proteinin β ve γ alt birimleri Ca^{2+} kanallarıyla etkileşmesi sonucu Ca^{2+} kanallarını kapatarak, nörotransmitterlerin salınımını baskılar (Mochida, 2018; Şekil 2.2).



Şekil 2.2. Presinaptik nöronlardan transmitterlerin sinaptik boşluğa boşalması (tr.wikipedia.org).

Üçüncü etki mekanizması ise; nöron membranında potasyum kanallarının aktivasyonu sonucu hücrenin içerisine potasyum (K^+) girişinin artmasıdır. Bu olay hiperpolarizasyona neden olur.

Opioitler, beyindeki opioit reseptörleri ile etkileşime girerek ağrıyı azaltan ve zevk hissi veren doğal kimyasallar olan endorfinlere benzer şekilde çalışır. Ancak, opioitlerin dozu arttıkça, beyindeki opioit reseptörlerine aşırı miktarda bağlanır ve endorfin üretimini engeller. Bu, kullanıcının ağrıyı azaltmak veya keyifli hissetmek için daha fazla opioit kullanmasına neden olur. Bu döngü, kullanıcının opioitlere bağımlı hale gelmesine neden olur.

Opioit bağımlılığı ile mücadele etmek için birçok tedavi seçeneği mevcuttur. Bu tedaviler arasında ilaç tedavisi, davranış terapisi, rehabilitasyon merkezleri ve destek grupları yer alır. İlaç tedavisi, opioit bağımlılığı olan kişilere opioit antagonistleri (buprenorfin ve naltrekson) veya opioit yoksun kalma tedavisi için methadone gibi opioit agonistleri kullanılmaktadır. Bu ilaçlar, opioit reseptörlerine bağlanarak opioit bağımlılığına neden olan diğer opioitlerin etkisini engeller veya azaltır (Kosten ve George, 2002).

Sonuç olarak, opioit bağımlılığı, yaygın ve ciddi bir sağlık sorunudur. Ancak, uygun tedaviler ve destek hizmetleri ile kontrol altına alınabilir. Tedavi edilmeyen opioit bağımlılığı, kullanıcının hayatını tehdit eden sonuçlar doğurabilir. Bu nedenle, opioit bağımlılığı olan kişilerin tedaviye erişimi ve destek hizmetleri sağlanması önemlidir (Centers for Disease Control and Prevention, 2021).

2.1.2. Opioit reseptörleri

Opioit reseptörleri, vücudumuzdaki ağrıyı kontrol etmek için önemli bir rol oynarlar. Endojen opioitler (örneğin endorfinler, enkefalinler ve dynorphinler) ve sentetik opioitler (örneğin morfin ve fentanil), bu reseptörlere bağlanarak ağrıyı azaltır veya engellerler. Opioit reseptörleri, opioitlerin etkilerinden sorumlu olan hücresel bileşenlerdir. Bu reseptörler, nöronlarda ve diğer hücrelerde bulunur ve ağrı, memnuniyet ve bağımlılık gibi birçok biyolojik süreci düzenleyen nörokimyasallarla etkileşime girerler.

İlk kez 1954 yılında ortaya atılan opioit reseptörlerinin beyindeki varlığı 1973 yılında ispat edilmiştir (Demirkapı, 2014). Opioitler işlevlerini G proteine bağlı opioit reseptörüne bağlanarak göstermektedirler. G proteinine bağlı reseptörler 7 transmembrandan oluşmaktadır (Waldhoer ve ark., 2004). Bu reseptörlerinin hücre dışında kalan kısmı N-terminal, hücre içi kısmı ise C-terminal olarak adlanır. N-terminale opioit reseptör agonisti, C-terminale ise G

proteini bağlanır (Al-Hasani ve Bruchans, 2011). Bütün opioit reseptörler G protein kenetlidirler ve adenilat siklazı baskılayarak, iyon kanallarını etkilerler. Na⁺ iyonlarının hücre dışına göçünü artırır, Ca²⁺ iyonlarının hücre içerisine girişini azaltarak nörotransmitterlerin salınmasının önüne geçerler (Howland ve Mycek, 2006).

G proteine bağlı dört opioit reseptörü bulunmaktadır. Bunlar; mü (μ_1 , μ_2 , μ_3), kappa (κ_1 , κ_2 , κ_3), delta (δ_1 , δ_2 , δ_3) ve nosiseptin/orfanin FQ'dür (Waldhoer ve ark., 2004). Etkilerini bu reseptörleri uyararak, analjezi, öfori, sedasyon ve solunum baskılanması gibi belirtilerin ortaya çıkmasıyla göstermektedirler. Opioitler tedavi edici ve yan etkilerini özellikle μ reseptörleri uyararak gösterirler (Bender ve ark, 2014). Delta reseptörleri, özellikle kapsamlı opioitlerin etkilerinde rol oynar. Kappa reseptörleri, ağrı kesici etkileri olan ancak aynı zamanda birçok yan etkisi olan opioitlerin etkilerinde rol oynar (Kieffer ve Gaveriaux-Ruff, 2002). Opioit reseptörleri serebral korteks, hipotalamus, talamus, orta beyin, substantia jelatinosa, ekstrapiramidal alan ve sempatik preganglionik sinirlerde bulunur. Beyaz maddeye oranla gri maddede daha fazladır. Ağrı ile ilgili yapılar ve yollarda daha yoğun olarak bulunurlar (James ve ark., 1991).

Tablo 2.1. Opioit reseptörleri ve etkileri

Opioit reseptörler		Etkisi
μ (mü)	μ_1	Analjezi Öferi Bulantı Kusma Hipertansiyon
	μ_2	Miyozis Solunum depresyonu Bağımlılık Bradikardi
κ (kappa)		Spinal analjezi Sedasyon Miyozis
δ (delta)		Analjezi Davranışsal Epileptojenik

- **Mü** opioit reseptörü (MOR): Supraspinal lokasyonda, özellikle presinaptik bölgelerde yüksek yoğunlukta bulunur ve genellikle çıkan (afferent) yolları etkisiz hale getirirken, inen (efferent) yolları etkinleştirir. Limbik sistem'de, hipotalamus'ta yüksek yoğunlukta bulunur. Ağrı ve strese yanıtın düzenlenmesinde önemli role sahiptir (Friedman ve Nabong, 2020).

- **Kappa** opioit reseptörü (KOR): Omurilikte daha yüksek yoğunlukta bulunur. Hiperaleji üretiminde önemli role sahiptir.
- **Delta** opioit reseptörü (DOR): Orta beyinde μ ve κ reseptörlerine oranla daha düşük yoğunlukta. Periferik sinirlerin dorsal kök ganglionlarında yüksek yoğunlukta bulunur. Akut ağrıda düşük, kronik ağrıda ise daha önemli etkiye sahiptir (Friedman ve Nabong, 2020; Pradhan ve ark., 2011).
- **Nosiseptin/orfanin FQ reseptörü:** Opioit reseptör ailesinin opioit olmayan bir dalı olarak kabul edilir (Bodnar, 2016). Opioit reseptörleri ve etkileri Tablo 2.1'de özetlenmiştir.

μ -reseptörleri, narkotik ağrı kesicilerin (opioitlerin) ağrı kesici etkilerinden sorumlu olan opioit reseptörleridir (Kieffer ve Gaveriaux-Ruff, 2002). δ -reseptörleri, ödül sistemi ve bağımlılık davranışlarıyla ilişkilendirilirken (Pasternak ve Pan, 2013), κ -reseptörleri, ağrıyı azaltmak gibi etkileri olan, ancak diğer iki reseptöre göre daha az araştırılmış olan opioit reseptörleridir (Bruchas ve Chavkin, 2010).

Opioit reseptörlerine bağlı olarak etkileri değişen birçok opioit ilaç vardır. Bunlar arasında morfin, hidromorfon, fentanil ve metadon gibi güçlü opioid analjezikler bulunur. Opioit reseptörlerine bağlanarak ağrıyı azaltırken aynı zamanda mutluluk, uyuşukluk ve rahatlama hissi de yaratabilir. Ancak bu ilaçlar aynı zamanda bağımlılık yapıcıdır ve aşırı kullanımı ölümcül olabilir.

Opioit reseptörlerinin rolü hala tam olarak anlaşılmamıştır ve araştırmalar, bu reseptörlerin kontrol edilmesinin ağrı tedavisinde daha iyi sonuçlar sağlayabileceğini göstermektedir (Bruchas ve Chavkin, 2010).

2.2. Beyin Ödüllendirme Mekanizmaları

Beyin ödüllendirme mekanizmaları, davranışların ve etkinliklerin tekrarlanmasını sağlayan önemli bir role sahiptir. Bu mekanizmalar, beynin limbik sistemdeki yapıları aracılığıyla çalışır ve dopamin salınımı ile ilişkilidir. Beyin ödüllendirme mekanizmaları, özellikle mesolimbik dopamin yolu olarak bilinen bir dizi beyin bölgesinde yer alan dopaminerjik nöronlar tarafından modüle edilir. Bu yol, ventral tegmental alan (VTA) ve nükleus accumbens (NAc) dahil olmak üzere birçok beyin bölgesini içerir (Lammel ve ark., 2011).

Araştırmalar, ödüllendirici uyanların beyinde dopamin salınımını arttırdığını ve davranışın tekrarlanmasına neden olduğunu göstermektedir (Volkow ve Morales, 2015). Beyin ödüllendirme mekanizmaları, bağımlılık davranışlarının tedavisi için hedef alınan bir alandır. Nöroplastisite ve farmakolojik tedaviler, ödüllendirme mekanizmalarını hedef alarak bağımlılık davranışlarını değiştirmeyi amaçlamaktadır (Koob ve Volkow, 2010).

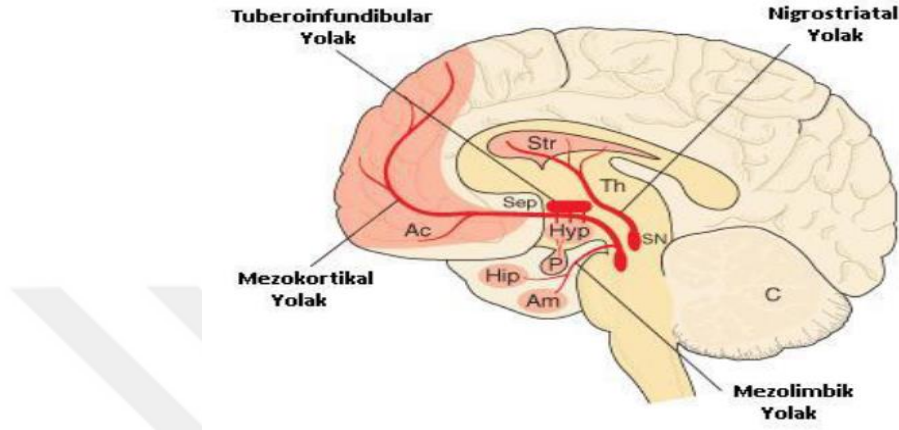
Ödül davranış biçimlerini kuvvetlendiren bilişsel uyarıcıdır, davranışın sürdürülmesini ve olumlu duyguların yaranmasını sağlar (Koob, 1996; Shultz, 1997). Beynin ödül merkezleri medial ön beyin demeti boyunca, başlıca olarak hipotalamusun lateral ve ventromedial çekirdeğinde yerleşmiştir. Septum, amigdala, talamus ve bazal gangliyonlar da az güçlü ödül merkezleridir (Bardo, 1998).

Kötüye kullanılan maddeler bağımlılık oluşturarak, beyinin ödül sistemiyle ilgili yapılarda değişkenliklere sebep olur. Mezokortikolimbik sistem ödül sisteminin önemli bir parçasıdır. Mezolimbik ve mezokortikal dopaminerjik yolların birleşmesinden oluşur. Bu sistemin ana nörotransmitteri dopamindir (Kaya ve ark., 2019). Dopamin (DA) insan vücudunda doğal olarak üretilen bir nörohormon ve transmitterdir. Nörohormon olarak hipotalamustan sentezlenir, periferik kan dolaşımına karışarak görev yapar. Görevi hipofiz bezinden prolaktin sentezini baskılamaktır. Nörotransmitter olarak beyindeki DA resöptörlerine bağlanarak etki etmektedirler. Parkinson ve şizofreni hastalıkları DA bozukluklarıyla ilişkili en iyi bilinen patolojilerdir. Şizofreni hastalarında mezokortikal yolda, parkinson hastalarında ise nigrostriatal yolda DA yoğunluğunda azalma görülmüştür.

Dopaminerjik iletim G protein kenetli D1 (D1 ve D5) ve D2 (D2, D3, D4) dopamin reseptör ailesi ile gerçekleştirilir. D1 ve D5 ailesi Gs ile kenetli reseptördür, cAMP düzeyini artırır. D2, D3 ve D4 reseptörler ise Gi protein kenetlidir, cAMP düzeyini azaltır (Franken ve ark., 2005). Bağımlılıkta postsinaptik nöronlarda D2 reseptörünün azalması şiddetli kullanma arzusuna ve bağımlılığa yol açar (Lingford-Hughes ve ark., 2010). Mezokortikal, mezolimbik, nigrostriatal ve tuberoinfundibular olmak üzere dört dopaminerjik yolak bulunmaktadır (Şekil 2.3. Harsing, 2008).

Mezokortikal yolak; ventral tegmental alandan (VTA) başlayıp prefrontal kortekse kadar, mezolimbik yolak ise; VTA'dan başlayıp, ventral striatum, amigdala ve hipokampusa kadar uzanır (Kaya ve ark., 2019; Kobb, 1992). Bağımlılığa yol açan maddeler motivasyon ve pekiştirmenin öğrenilmesinde önemli rolü olan beyinin ventral striatum'da DA salınımını

arttırır, mezolimbik yolağı aktive eder ve ödüllendirmede önemli rol oynar (Kaya ve ark., 2019). Nigrostriatal yolak; substantia nigradan (kara madde) başlar ve dorsal striatumda sonlanır. Dorsal striatum hareket ile ilişkilidir; eylem seçimi, hedefe yönelik davranış ve alışkanlıkların ortaya çıkmasında önemli rolü vardır (Kaya ve ark., 2019). Tuberoinfundibular yolakta ise DA hipofizden prolaktin salgılanmasını düzenler (Harsing, 2008).

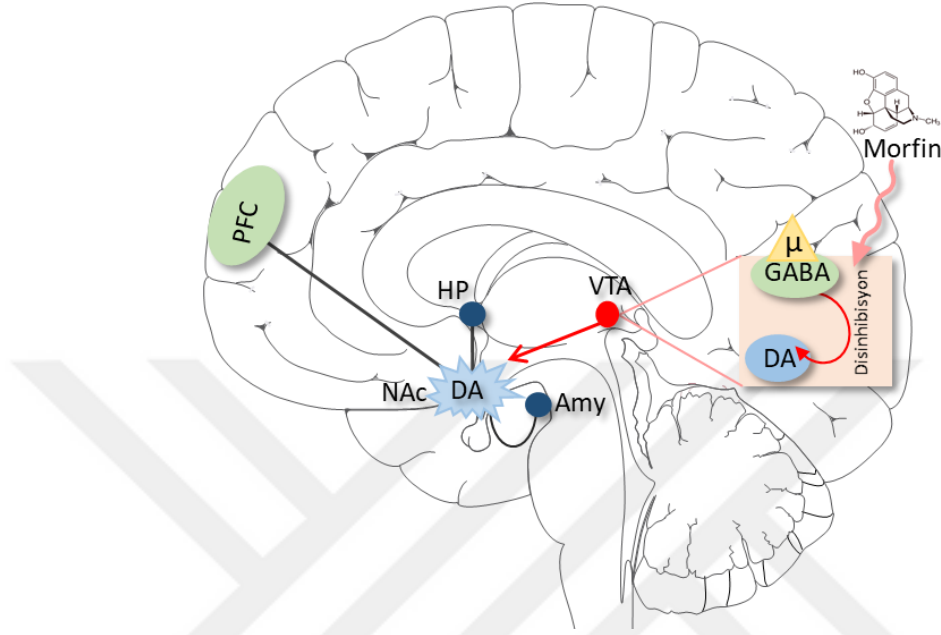


Şekil 2.3. Dopaminerjik yollar (Kaya ve ark., 2019).

NAc ve diğer beyin alanlarına giden mezokortikolimbik yolak; ödül, uyanç, iştah, besin arayışı, lokomotor aktivite, duygu durumu, cinselliğin düzenlenmesi ve davranışsal yanıtın oluşmasında önemli rol oynar. Ödül ile ilişkili uyarıların düzenlenmesi hipotalamusun lateral bölgesi ve NAc ile ilgilidir. Amigdala, hipokampus, prefrontal korteks ve VTA'dan gelen sinyeller NAc'ta birleşir. NAc beyinin ödüllendirme merkezi olarak bilinmektedir. Aynı zamanda VTA'ya prefrontal korteksten, amigdaladan, lokus coreuleustan, VTA'daki ara nöronlardan ve NAc'tan inhibitör veya eksitator sinyaller gelir. VTA'daki DA nöron uyarılması ile NAc'ta büyük miktarda dopamin salınır. Bu mekanizmada; GABA'erjik, kolinerjik, serotonerjik, glutamaterjik, noradrenaljik ve NMDA mekanizmalarında görev yaparlar. Ödül sisteminin nöronlarından çoğu dopaminerjiktir (Spanagel ve Weiss, 1999; Di Ciano ve ark., 2001; Nestler, 2005).

Morfine bağlı ödüllendirme ve bağımlılık mekanizması mezolimbik dopaminerjik sistemle işlevini sürdürür ve bu sistemde dopamin major nörotransmitterdir (Di Chiara, 2000). VTA'dan NAc'a giden dopaminerjik yolak en etkili yoldur. VTA ve NAc yapıları uyarılır ve bununla birlikte ventral striatum, hipokampus, PFC ve amigdaladan gelen uyarılar da mezolimbik sistemi uyarır. Sonuçta NAc'ta haz duygusunu belirleyen dopamin salınımını artırır. Morfin kullanımında ligand VTA'nın GABAerjik sisteminde yer alan GABA

nöronlarındaki μ opioid reseptörle birleşir ve GABA aracılı sinaptik iletimi baskılar. Bu durum dopaminerjik nöronları baskılar. Sonuç olarak öfori duygularını indükleyen ve bağımlılığın gelişmesini sağlayan NAc'ta dopamin salınımına yol açar. Dopaminin artması ise ödül etkisinin ortaya çıkmasına neden olur (Bodnar, 2016; Johnson ve North, 1992; Wise, 1989; Şekil 2.4).



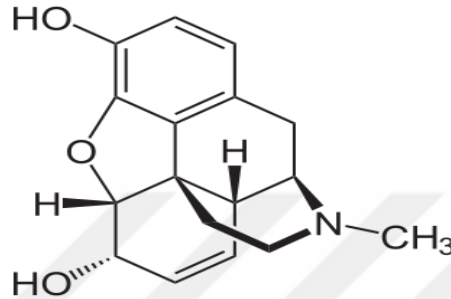
Şekil 2.4. Morfine bağlı ödüllendirme etkisinin mekanizmaları (Listos ve ark., 2019). Morfinin ödüllendirici etkisi, VTA'daki GABAerjik terminallerde lokalize olan μ opioid reseptörlerinin uyarılması ile ilişkilidir. GABA salınımını baskılar ve NAc'ta dopamin salınımına yol açar. PFC: prefrontal korteks, VTA: ventral tegmental alan, NAc: nükleus akkumbens, Amy: amigdala, HP: hipotalamus, DA: dopamin, GABA: gama aminobütirik asit.

Morfine bağlı yoksunlukta dopamin düzeyi önemli derecede azalmaktadır (Shaham ve ark., 1996). Akut kullanımda dopamin düzeyi yükselirken, kronik kullanımda dopamin düzeyi azalır (Lingford- Hugas ve ark., 2010).

Özetlemek gerekirse, beyindeki ödüllendirme mekanizmaları, kişilerin haz, mutluluk ve keyif hissetmelerine yardımcı olan karmaşık süreçlerdir. Bu mekanizmalar, doğal olarak oluşan ödüllendirici uyarıcılarla tetiklenebildiği gibi, bağımlılık yapan maddelerin kullanımıyla da etkilenebilir. Bağımlılık yapan maddelerin tekrarlanan kullanımı, beyindeki ödüllendirme mekanizmalarının bozulmasına neden olabilir ve sürekli daha yüksek dozda kullanım gerektiren bir kısır döngüye yol açabilir. Sonuç olarak, beyin ödüllendirme mekanizmaları, davranışların tekrarlanmasını sağlayan önemli bir rol oynar ve dopamin salınımı ile ilişkilidir.

2.3. Morfin

Morfin, *Papaver somniferum* L.'de bulunan doğal bir opioit alkaloiddir. Bitkinin yaş meyvesinin kabuğu çizilerek ortaya çıkan özsuynunun kurutulmasıyla elde edilir (Koç ve ark., 2006). Morfin ismi Eski Yunan Mitolojisinde uyku tanrısı olan Morpheus'tan gelmektedir. İlk kez 1805 yılında Hannover'li eczacı Frederich Serturner tarafından afyondan izole etmiştir (Özmen, 2009). 1953 yılından klinik olarak kullanılmıştır. Morfinin kimyasal formu: $C_{17}H_{19}NO_3$ 'tür (Şekil 2.5).



Şekil 2.5. Morfinin moleküler yapısı (tr.wikipedia.morfin). Sistematik adı: 3,6-dihidroksi 4,5-epoksi - 17 metilmorfinan-7-en.

Halkasal yapısındaki 5, 6, 9, 13 ve 14 numaralı karbonları asimetrik olan morfin renksiz kristal haldedir. Yapısında bir fenol ve bir alkol hidroksil vardır. Morfinin kristalleşmesi için bir ve ya da üç mol su gereklidir. 110 °C'de kristalin suyu kaybolur. Erime noktası ise 230 °C'dir. Suda çözünür, ancak lipitlerdeki çözünürlüğü zayıftır. Eczacılıkta klorhidratı ve ya sülfatı formu analjezik olarak kullanılır (wikiwand.com/tr/morfin). Morfin günümüzde orta-şiddetli ağrıların tedavisinde kullanılan en güçlü analjeziktir. Postoperatif ağrıların ve kansere bağlı ağrı yaşayan kişilerin tedavisinde de kullanılır (Christie, 2008). Ağrı tedavilerinde etkili olmakla beraber, kullanım esnasında bağımlılık, tolerans, bırakıldığında ise yoksunluk belirtilerinin ortaya çıkmasına sebep olur.

Merkezi sinir sistemini etkileyerek ağrı hissini azaltır, uykuya neden olur ve zihinsel durumu değiştirir. Morfin ayrıca, yüksek dozlarda kullanıldığında solunum baskısı yapabilir ve ölümcül olabilir. Oral yolla alındığı zaman gastriontestinal sisteminde tamamen emilir. Karaciğerden ilk geçişte önemli kısmı eliminasyona uğrar. Bu yüzden etki düzeyi düşüktür. Kas içine ve ya cilt altına enjekte edildikten 20 dakika sonra analjezi etki eder, 45-90 dakikada maksimuma ulaşır, ancak etkisi kısa sürer. Uygulanan dozun %90'ı 24 saatte metabolize edilerek vücuttan atılır (Brunton ve Parker, 2011). Morfinin ana metabolitleri morfin-3-glukuronid (M3G) ve morfin-6-glukuronid (M6G)'dir. M6G morfinin 2 katı kadar güçlü

metabolitdir. M3G ise inaktiftir (Penson ve ark., 2000). Morfinin metabolizması sadece karaciğerde gerçekleşmez, beyin ve böbreklerde de gerçekleşebilir. Glukuronidler esas olarak safra ve idrar yoluyla atılır. Glukuronidler, kan-beyin bariyerini geçemeyen polar metabolitler olarak kabul edilir (Christrup, 1997). Morfinin az bir kısmı ise karaciğerde sülfat konjugatlarına dönüştürülür (Kayaalp, 2005). Bu metabolitlerin %90'ı böbrekler, %10'ı ise dışkı yoluyla vücuttan atılır. Morfinin yarılanma ömrü 2-3,5 saattir (Brunton ve Parker, 2011).

Morfinin MSS üzerindeki en büyük etkisi analjezidir. Diğer etkileri ise öfori, sedasyon, solunum depresyonu, bulantı-kusma ve hipotermidir. Endişe, anksiyete ve ruhi gerginliği ortadan kaldırarak öfori yapar. Psikomotor ve kognitif performansta belirgin olmayan bir azalma yapabilir. En önemli yan etkisi ise biriken karbondioksit nedeniyle solunumu baskılamasıdır (Kayaalp, 2005). Periferik etkileri ise; gastrointestinal, kardiyovasküler, boşaltım sistemi üzerindedir. Ayrıca, uterus, safra yolları ve histamin salınımıyla ilgili etkileri de vardır. Kardiyovasküler sistemdeki etkileri hipotansiyon, hipertansiyon ve bradikardi olarak kendini gösterir. Gastrointestinal sistemde düz kas tonusunu artırarak ciddi spazma neden olur (Wolf ve ark., 1998).

Morfin, opioit reseptörleri üzerinde etki ederek etkisini gösterir. Bu nedenle, morfin endorfinlerin yerini alarak ağrıyı azaltır ve hoş bir his uyandırır. Morfin, kronik ağrı tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Ancak, yüksek bağımlılık potansiyeli nedeniyle kötüye kullanım ve bağımlılık riski vardır. Morfinin bağımlılık yapan etkilerinin nedenleri arasında, opioit reseptörleri üzerindeki etkileri ve beyindeki ödüllendirici mekanizmaların aktive edilmesi yer almaktadır. Morfinin bağımlılık yapıcı etkilerinin nedeni, beynin ödüllendirici mekanizmalarının aktive edilmesidir. Bu nedenle, morfinin kronik kullanımı dopamin sistemini değiştirerek bağımlılığa neden olabilir (Thompson ve ark., 2012).

2.3.1. Morfin reseptörleri

Morfin reseptörleri, opioit reseptör ailesinin bir parçasıdır. Bu reseptörler, beyinde ağrı duyusu gibi duyuşal işlevlerin yanı sıra keyif ve ödül gibi duygusal işlevlerin de düzenlenmesinde rol oynarlar. Morfin, bu reseptörlere yüksek afiniteli bir agonisttir ve bağlandığında ağrı kesici etkileri oluşur.

Morfin reseptörlerinin farklı beyin bölgelerinde farklı işlevlere sahip olduğu bilinmektedir. Örneğin, prefrontal korteks ve hipokampus gibi beyin bölgelerinde, morfin reseptörleri hafıza, öğrenme ve duygusal işlevlerin düzenlenmesinde önemli bir rol oynar.

Diğer araştırmalar ise, ventral tegmental alan (VTA) gibi beyin bölgelerinde, morfin reseptörlerinin ödöl yolu ve bağımlılıkla ilgili işlevleri olduğunu göstermektedir.

Morfin reseptörleri, morfinin hedef aldığı nörotransmitter reseptörlerinden biridir. Morfinin etki mekanizması, bu reseptörlerin agonisti olarak hareket etmesine dayanır. Morfin reseptörleri, G proteinine bağı reseptör ailesinin bir üyesidir. Bu reseptörler, presinaptik membranlarda bulunur ve nöronların birbirleriyle etkileşimlerinde önemli bir rol oynarlar. Morfin reseptörleri, üç farklı alttipi vardır: MOR-1, MOR-2 ve MOR-3. Bu alt tipinin her biri, farklı nöronlarda bulunur ve farklı işlevlere sahiptir. MOR-1, beyindeki en yaygın morfin reseptörüdür ve ağrı kesici etkilere neden olan morfinin ana hedefidir. MOR-2 ve MOR-3, beyinde daha az yaygın olarak bulunur ve sadece belirli nöronlarda görülür (Kieffer ve Evans, 2009).

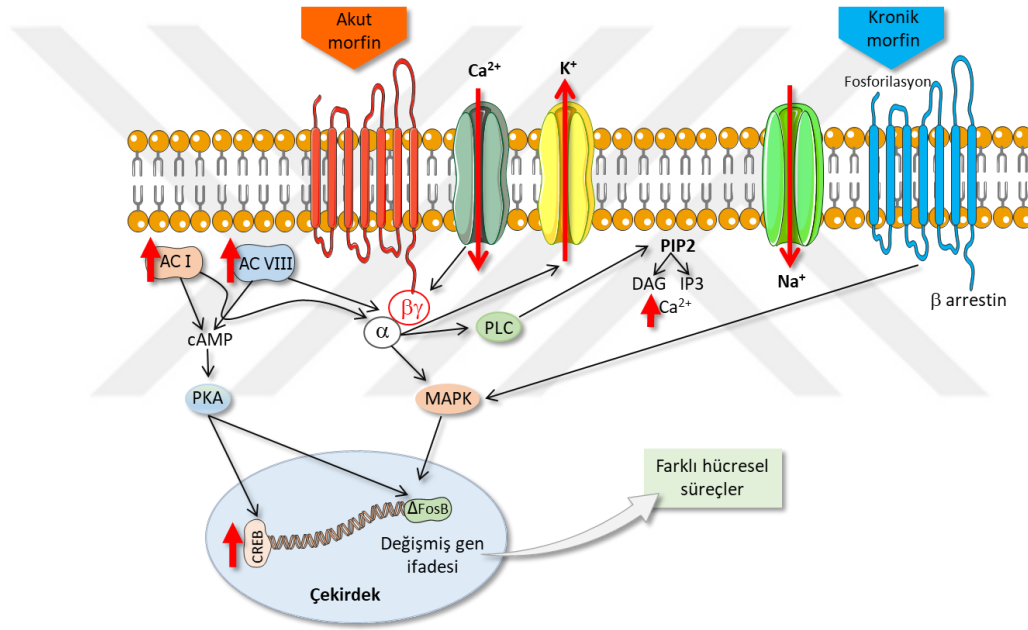
Morfin reseptörlerinin etki mekanizması, G proteinlerinin aktivasyonu ile başlar. Morfin, MOR-1 reseptörlerine bağlanır ve G proteinlerinin alfa alt birimlerinin aktivasyonunu indükler. Aktif G protein alt birimleri, adenilil siklaz enzimini uyarır ve cAMP üretimini artırır. Bu, hücresel sinyal yollarında değişikliklere neden olur ve sonuçta morfinin ağrı kesici ve diğer etkilerini üretir. Morfin reseptörleri, beyindeki dopamin sistemi üzerinde de etkilidir. Dopamin, beyindeki ödöl sistemlerinde önemli bir rol oynar ve morfinin keyifli etkileri de bu mekanizma aracılığıyla gerçekleşir. MOR-1 reseptörleri, DA salınımını artırır ve beyindeki ödöl mekanizmalarını uyarır (Lutz ve ark., 2019).

Morfin reseptörleri hakkında yapılan araştırmalar, bu reseptörlerin sadece ağrı kesici etkilere neden olmadığını, aynı zamanda bağımlılık yapıcı özelliklere de sahip olduğunu göstermiştir. Morfin bağımlılığı, MOR-1 reseptörlerinin aktivasyonuna bağıdır ve bu reseptörlerin bloke edilmesi, morfin bağımlılığının tedavisinde kullanılan yöntemlerden biridir (McPherson ve ark., 2010).

2.3.2. Akut ve kronik kullanımda morfinin moleküler etkileri

Morfine akut maruz kalma durumunda; morfin ligandının μ opioit reseptörle bağlanması Go veya Gi proteininin aktivasyonuna, ardından adenilat siklaz (AC) aktivasyonunun baskılanmasına ve beyindeki birçok nöronlarda cAMP yolağının bloke edilmesine sebep olur. Opioit reseptörüne bağı G proteini (α , β ve γ) alt birimlerinden oluşur. Ligand reseptörle bağlanınca guanosin 5' trifosfat (GTP) α alt birimiyle birleşerek, β/γ dimerinden ayrılır. Her ikisi hücre içi sinyal iletimine katılır. AC aktivitesinin baskılanması, siklik adenozin monofosfat

(cAMP) seviyesinin azalmasına ve protein kinaz A (PKA) aktivitesinin de baskılanmasına sebep olur (Chakrabarti ve ark., 2016). α -GTP kompleksi fosfolipaz C (PLC) ve MAP protein kinaz yollarını aktive eder. Aynı zamanda K^+ kanalını aktive ederek, hücrenin hiperpolarizasyonunu artırır. Hücrede aktif hale gelen PLC, fosfatidilinositol 4,5-bifosfatı (PIP2), inositol 1,4,5-trifosfata (IP3) ve diasilgliserole (DAG) hidroliz eder. IP3, kalsiyum bağımlı sinyalleşmeyi aktif ederek endoplazmik retikulumdan Ca^{2+} salınımını artırır. β/γ dimeri ise doğrudan Ca^{2+} kanalını bloke eder. Ca^{2+} kanalları merkezi ve periferik sinir sistemindeki nöronların membranında yerleşir. Ca^{2+} kanallarının baskılanması presinaptik nöron içerisine Ca^{2+} alımını durdurur ve nörotransmitterlerin sinaptik boşluğa salınmasını engeller (Mochida, 2018; Şekil 2.6).



Şekil 2.6. Akut ve kronik morfin etkisinin moleküler mekanizması (Listos ve ark., 2019).

Bağımlılık yapan ilaçlara kronik maruziyet, hücre içi sinyal iletim yollarının tekrar-tekrar bozulmasına neden olarak, nükleer fonksiyonlarda değişkenliklere ve belirli hedef genlerin transkripsiyon seviyelerinin değişmesine yol açmaktadır. Bu genlerin değiştirilmiş ifadesi, meydana geldiği nöronların aktivitesinin farklılaşmasına ve nöral networkta değişkenliklere yol açmaktadır (Nestler ve Aghajanian, 1997).

Maddeye kronik maruz kalmada en iyi bilinen moleküler adaptasyon cAMP yolağının aktivasyonudur. AC seviyesi cAMP bağımlı PKA ile artar, bağımlılık ve yoksunluk özelliklerinde katkıda bulunur. Kronik maruz kalma opioit reseptörlerin G protein reseptör kinazlar (GRKs) tarafından fosforilasyonu ile indüklenir. Opioit reseptörlerinin fosforilasyonu

β -arrestin (sitolik protein) ile bağlanmasına izin verir ve G protein aracılı sinyalleşmeyi bloke eder. Reseptörler duyarsızlaşır ve G proteinden ayrılır (Allouche ve ark., 2014). Duyarsızlaşma artan AC aktivitesinden ve CREB aktivitesini etkileyen yüksek cAMP seviyesinden kaynaklanır (Nestler, 2016).

Nöronlardaki AC I ve AC VIII olmak üzere 2 tip adenilat siklaz, seviyesi artar ve bu durum farklı mekanizmalar ile gerçekleştirilir. Nöranal genlerin ifadesi yüzlerce farklı transkripsiyon faktörleri tarafından düzenlenir. Tekrarlanan ilaca maruziyet durumunda CREB (cAMP cevap elemanı bağlayan protein) ve Δ FosB transkripsiyon faktörleri bağımlılıkla ilişkilendirilmiştir. AC VIII enziminin seviyesinin artması major transkripsiyon faktör CREB tarafından düzenlenir. CREB, konsensüs TGACGTCA CRE dizi bölgesi içeren genlerin transkripsiyonunu düzenler. CREB dimer olarak CRE bölgesine bağlanır, sadece iki alt birimi de ser133 üzerinde fosforile edildiğinde transkripsiyonu aktive eder. Bunun sebebi yalnız fosforile edilmiş CREB, bazal transkripsiyon kompleksini uyaran adaptör protein CBP (CREB bağlayan protein) ile etkileşime girebilmesidir (Shaywitz ve Greenberg, 1999; De Cesare ve Sassone-Corsi, 2000). CREB geninin artan transkripsiyonu tekrarlanan ilaç alınımında cAMP yolağını aktive eder, Adenilat siklaz VIII ve tirozin hidroksilaz'ın ifadesini arttırır (Lane-Ladd, 1997). Artan CREB seviyeleri kısa ömürlüdür, ancak daha uzun süreli bağımlılık belirtilerinin altında ek mekanizmaların yattığı düşünülür (Nestler, 2001). Antisense oligonükleotid tedavisinde CREB seviyesinde azalma morfine bağımlılığı engellemektedir. AC I enziminin artmış seviyesi antisense oligonükleotid tedavisinden etkilenmemektedir. Antisense oligonükleotid tedavisi yoksunlukta görülen lokus coeruleusda nöronların aktivasyonunu ve yoksunluk davranış şiddetini hafifletir.

Maddeye kronik maruz kalma beyinin birçok bölgesinde nöronlarda cAMP yolağının aktivasyonuna sebep olabilmektedir. Striatum bölgesinde artan cAMP seviyesi, CREB fosforilasyonu veya ifadesinin değiştirilmesidir. Bu genlerde gözlenen değişiklikler farklı gen ifadelerine sebep olur. Lokus coeruleusda'taki noradrenerjik nöronlar dikkat durumu ve otomatik sinir sistemini düzenler ve somatik yoksunlukla ilişkilendirilmiştir. Bu nöronlarda cAMP yolağının artmış seviyesi katyon kanallarının aktivasyonu ile nöronların seviyesini arttırır. Glutamaterjik iletimin artmış aktivasyonu yoksunluk sırasında artmış lokus coeruleus aktivitesine neden olur. Kronik maruz kalma VTA'da dopaminerjik ve serotonerjik hücreleri inerve eden GABAerjik nöronlar içerisinde olan cAMP yolağının aktivasyonuna neden olur.

cAMP artması yoksunluk sırasında GABA salınımını artırır, dopaminerjik ve serotonerjik nöronların seviyesinde azalmaya yol açar (Nestler ve Aghajanian,1997).

Diğer bir transkripsiyon faktörü Δ FosB, bağımlılık ile ilişkili beyindeki uzun vadeli adaptif değişkenliklerde önemli role sahiptir. Morfinin akut uygulaması NAc ve dorsal striatum da birkaç Fos ailesi üyesinin (c-Fos, FosB) indüksiyonuna neden olmaktadır (Hope,1994; Kelz ve Nestler, 2000). Δ FosB, akut ilaca maruz kalmada hafif indüklenir. Ancak tekrarlanan ilaç uygulamaları ile beyinde birikmeye başlar. Uzun süreli adaptasyonlar için moleküler şalter olarak rol alır (Kelz ve Nestler, 2000).

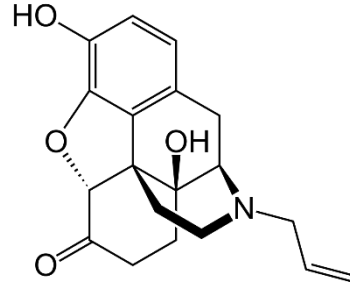
İlaç uygulamasından sonra meydana gelen transkripsiyondan bağımsız diğer modifikasyonlar ise azaltılmış protein bozulması ve reseptör duyarlılığının düzenlenmesidir. Reseptör-G protein bağlanmasında adaptasyonlar: G proteine bağlı opioit ve dopamin reseptörleri akut etkide reseptörlerde karmaşık duyarsızlaşmaya neden olur. Kısa süreli duyarsızlaşmaların nedeni GRKs ve diğer proteinler tarafından reseptörlerin fosforilasyonudur. Bu reseptörlerin internalizasyonuna neden olur ve G protein bağlanmasını azaltır. GRKs sadece reseptörün agonist bağlanan kısmını ve fosforile reseptöre bağlanmış arrestin proteinlerini fosforile eder. GRKs ve arrestin seviyesi kronik alımdan sonra beyinin özel bölgelerinde artmaktadır. Kronik etkide reseptörlerdeki bir başka adaptasyon reseptör-G protein bağlanmasından kaynaklanan değişkenliktir. Diğeri ise G proteinin alt birimlerinin bolluğunda gözlenen adaptasyonlardır. Kronik maruz kalmada D2 reseptörün bağlanma yeri olan G proteinin α alt ünitesinin, Gi/o ailesinin azaldığı bilinmektedir (Nestler ve Aghajanian, 1997).

2.4. Nalokson

Nalokson, akut opioit zehirlenmelerinde veya solunum depresyonu, hipertansiyon ve koma gibi acil durumlarda kullanılan bir ilaçtır. İlaç, opioitlerin solunum merkezlerini etkilemesini engelleyerek nefes almaya yardımcı olur (Hardman ve ark., 2001). 1961 yılında Jack Fishman ve Mozes J. Lewenstein tarafından patentlenmiştir. $C_{19}H_{21}NO_4$ kimyasal yapısı ile morfine benzemektedir (Şekil 2.7).

Nalokson, hiçbir agonist aktivitesine sahip değildir. Tüm opioit reseptörlerinin alt tipleri için kullanılan saf opioit reseptör antagonistidir. Bu nedenle her hangi bir opioitin tüm eylemlerini engelleyebilir (Clarke ve ark., 2005). Nalokson, merkezi sinir sistemindeki opioit reseptörlerine bağlanarak, agonistlerin reseptörlere bağlanmasını bloke eder veya

reseptörlerden uzaklaştırır. μ reseptörle yüksek, κ ve δ -reseptörlere daha düşük afiniteyle bağlanır. Bunun yanı sıra beyin depaminerjik ve GABAerjik sistemlerine de etki etmektedir.



Şekil 2.7. Naloksonun moleküler yapısı (wikipedia.org/wiki/Naloxone).

Tolerans ve ilaç bağımlılığı yapmaz. Ancak madde bağımlılığı olan kişilerde ani yoksunluk belirtilerinin gelişmesine sebep olabilir (Roberts, 1984). Nalokson, interamüsküler, intravenöz veya intranasal olarak uygulanabilir. Yarılanma ömrü yarım 0,5-1 saat kadardır. Karaciğerde metabolizesi hızlı olduğu için oral kullanımı etkisizdir. Naloksonun etki süresi 60-100 dakika arasındadır (tr.wikipedia.org/wiki/Nalokson).

2.5. Hipotalamus

Beyin merkezinde bulunan birçok küçük çekirdekte oluşan hipotalamus, talamusun altında hipofiz bezinin üzerinde yerleşir. Küçük olmasına rağmen, nöral bağlantılarla vücuttaki birbirinden bağımsız birçok önemli işlevleri kontrol altına alır. Hipotalamus, hipofiz bezi yolu ile sinir sistemi ve endokrin sistem arasında bağlantı kurar. En önemli görevlerinden biri, homeostaz ile vücudu dengede tutmaktır. Homeostaz işlevinin birçoğunu doğrudan otonom sistemini etkileyerek veya hormonları kontrol ederek gerçekleştirmektedir (Boeree, 2009). Hipotalamus vücudun sinir sistemindeki hücrelerden kimyasal bir uyarı aldığında nörohormonlar salgılayarak, hipofiz bezinin çalışmasını düzenler (Sargis, 2021). Hipotalamus, kan dolaşımının düzenlenmesi (kan basıncı, damar geçirgenliği), ısı transferi, tokluk, açlık ve susuzluk, uyku döngüleri, kadınlarda adet döngüsü, zevk, bağırsaklardan enzim ve hormonların salgılanması, metabolik ve zehinsel aktiviteler gibi birçok önemli fonksiyonların düzenlenmesinden sorumludur.

2.6. Epigenetik

Epigenetik, DNA diziliminde değişiklik olmaksızın gen ifadesini etkileyen modifikasyonları tanımlamaktadır. Epigenetik modifikasyonlar, gen ifadesini düzenleyerek, hücrelerin farklılaşması, gelişimi ve işlevi için önemli bir rol oynamaktadır (Feinberg, 2018).

Epigenetik modifikasyonlar, DNA metilasyonu, histon modifikasyonları ve kromatin yapısındaki değişiklikler gibi farklı mekanizmalar aracılığıyla gerçekleşmektedir (Lande-Diner ve Zhang, 2019). Bu modifikasyonlar, çevresel, yaş ve diğer faktörler tarafından etkilenebilmekte ve sonuç olarak, gen ifadesini değiştirmesi mümkündür (Jirtle ve Skinner, 2007).

Epigenetik modifikasyonlar, insan sağlığı üzerinde de etkili olabilmektedir. Örneğin, epigenetik değişiklikler kanser, nörolojik bozukluklar ve diğer hastalıkların gelişiminde rol oynayabilir (Szyf, 2013). Bu nedenle, epigenetik değişikliklerin anlaşılması, hastalıkların tedavisi için yeni yöntemlerin keşfedilmesine yardımcı olabilir.

Opioitler gibi bazı ilaçlar da epigenetik modifikasyonlar üzerinde etkili olabilir. Örneğin, opioitlerin uzun vadeli kullanımı, histon modifikasyonları ve DNA metilasyonu gibi epigenetik mekanizmaları etkileyebilir dolayısıyla opioit toleransını arttırabilir ve bağımlılığı geliştirebilir (Mao ve Huang, 2013). Sonuç olarak, epigenetik değişikliklerin, gen ifadesini etkilediği ve insan sağlığı üzerinde önemli bir rol oynadığı açıktır.

2.6.1. Epigenetik mekanizmalar

Epigenetik mekanizmalar, DNA dizileri üzerinde değişiklikler yapmaz, ancak DNA moleküllerine bağlı proteinlerin düzenlenmesi, histon modifikasyonları, RNA işlemesi ve hücre bölünmesi sırasında gerçekleşen değişiklikler yoluyla genlerin ifadesini düzenleyebilir. Bu mekanizmalar, gen ifadesinin kontrolünde önemli bir rol oynar ve aynı DNA dizisi, farklı epigenetik modifikasyonlara sahip farklı fenotiplere neden olabilir (Jaenisch ve Bird, 2003). Bu nedenle, epigenetik değişiklikler kalıtsal olabilir, ancak aynı zamanda çevresel faktörler tarafından da etkilenebilir (Jones, 2012).

Epigenetik mekanizmalar arasında DNA metilasyonu, histon modifikasyonları ve kodlanmayan RNA'lar (ncRNA'lar) yer alır. DNA metilasyonu, DNA üzerindeki metil gruplarının eklenmesi ile modifikasyondur. Bu metil grupları, gen ekspresyonunu baskılar ve gen ifadesinin düzenlenmesinde önemli bir rol oynar.

DNA metilasyonu, gen ifadesinin düzenlenmesinde önemli bir rol oynayan DNA'nın metil grupları ile modifikasyondur. Histonlar, DNA molekülünün çevresindeki proteinlerdir. Histon modifikasyonları, histon proteinlerinin N-terminal uçlarındaki post-translasyonel modifikasyonlardır ve gen ifadesinin düzenlenmesinde önemli bir rol oynar. Bu proteinler, DNA molekülünün düzenlenmesinde önemli bir rol oynarlar. ncRNA'lar, protein kodlamayan

RNA molekülleridir ve DNA'dan protein sentezine kadar birçok hücresel işlemde rol oynarlar. DNA, RNA ve proteinlerle etkileşime girerek gen ifadesi düzenlenmesinde ve kromatin yapısının değiştirilmesinde rol oynarlar (Li ve Reinberg, 2011).

Epigenetik mekanizmaların sağlıklı gelişim, çevresel uyum, hastalıklar ve yaşlanma gibi birçok farklı biyolojik süreçte önemli bir rolü olduğu düşünülmektedir. Bu nedenle, epigenetik değişiklikler, özellikle kanser, kalp hastalıkları, Alzheimer gibi hastalıkların tedavisi ve tanısında araştırmalar için önemli bir alan haline gelmiştir (Turner, 2009). Sonuç olarak, epigenetik mekanizmalar, gen ifadesinin düzenlenmesinde önemli bir rol oynar ve farklı fenotiplere neden olabilen aynı DNA dizisindeki farklılıkların açıklanmasına yardımcı olur.

2.6.2. DNA metilasyonu

Metilasyon, DNA yapısını bozmadan genleri (DNA'nın protein kodlayan bölümlerini) susturarak, transkripsiyonu engeller. DNA metilasyonu spesifik olarak CpG (1 fosfat grubu aracılığı ile bağlantı kuran sitozin (C) ve guanin (G)) bölgesinde meydana gelmektedir. Metilasyon, farklı DNA metiltransferaz enzimleri tarafından kataliz edilir (Tost, 2010). Bu spesifik enzimler, C'nin primidin halkasındaki 5. karbonuna bir metil (-CH₃) grubu ekler ve bu durumda o genin ifadesi baskılanır. Bütün omurgalıların somatik hücrelerinde DNA metillenmesi bu pozisyonda, embriyonik kök hücrelerinin metilasyonu ise CpG dışında gerçekleşir (Dodge ve ark, 2002; Haines ve ark, 2001). İnsan DNA'sının tahmini olarak %80-90'ı metillenmektedir. Ancak, DNA'da CpG adaları adlandırılan bölgelerde (%65 oranda C ve G içerir) metillenme görülmez (Salozhin ve ark, 2005). DNA metilasyonu, nükleotit dizisini değiştirmeden, bir DNA molekülünde oluşan kimyasal modifikasyonları ifade eder.

DNA metilasyonu gen ifadesinin düzenlenmesine önemli katkıda bulunur. CpG metilasyonu kararlı hale gelerek, hücre bölünmesinden epigenetik kalıtıma katkıda bulunabilir (Salozhin ve ark, 2005). Ayrıca gelişim, T hücre fonksiyonu, X kromozom aktivasyonu, parental imprinting, kanser gibi önemli hücresel olaylarda rol oynar. Aynı zamanda transpozan, virüs gibi istilacıların hücre içi çoğalmasını engeller.

2.6.3. DNA- Metil-Transferaz'lar

DNA metilasyon sürecinde farklı DNA-metil-transferazlar (DNMT) görev alır. İnsan genomunda DNMT'ların beş türü (DNMT1, DNMT2, DNMT3a, DNMT3b ve DNMT3L) bulunmaktadır. DNMT'lar DNA'nın belirli bölgelerini metilleyerek, organizmanın büyüme, gelişme, gen düzenlenmesi gibi önemli süreçlerde rol oynarlar (Haines ve ark., 2001). Bu

enzimler; sürdürme metilasyonu (DNMT1) ve yeni baştan (*de nova*) metilasyonu (DNMT3A, DNMT3B, DNMT3L) olmak üzere 2 sınıfa ayrılmaktadır.

İnsan 19. kromozomunda bulunan DNMT1 geni tarafından kodlanan DNMT1 enzimi 1620 amino asitten oluşur. N-terminal düzenleyici ve C-terminal katalitik alana sahiptir. Diğer DNMT'lara oranla memeli hücrelerde daha çok ifade olunur. DNMT1, her DNA replikasyonundan sonra DNA'nın metilasyon durumunu koruyarak, oluşan yavru ipliklere kopyalanmasını sürdürür. Fareler üzerine yürütülen çalışmalarda DNMT1 geninin her 2 kopyasının silinmesi durumunda gelişimlerinin 9. gününde embriyonun öldüğü gözlemlenmiştir (Goll ve ark., 2006).

DNMT3A ve DNMT3B enzimleri embriyonik gelişim sırasında *de nova* metilasyonunu düzenler (Takahashi, 2014). DNMT3L enzimi yapısal olarak DNMT3 aile üyelerine benzerlik gösterse de hiçbir metiltransferaz aktivitesine sahip değildir. DNMT3A ve DNMT3B'nin C-terminal bölgesine bağlanarak enzimin aktivitesini artırır (Suetake ve ark., 2004). DNMT3A ve DNMT3B genleri embriyonik kök hücrelerinde bol miktarda bulunurken, farklılaşmış hücrelerde ifadesinin düştüğü görülmüştür.

DNMT2, eskiden bir DNA metil transferaz enzimi olarak biliniyordu. Ancak, DNMT2'nin DNA'yı metillemediği yalnız aspartik asit tRNA'nın 38. pozisyonunu metillediği bulunmuştur. Enzim sadece C-terminal katalitik alandan oluşmaktadır ve N-terminal düzenleyici alanı yoktur. DNA hasarı, rekombinasyon ve mutasyon onarımının belirlenmesine katkıda bulunduğu tahmin edilmektedir.

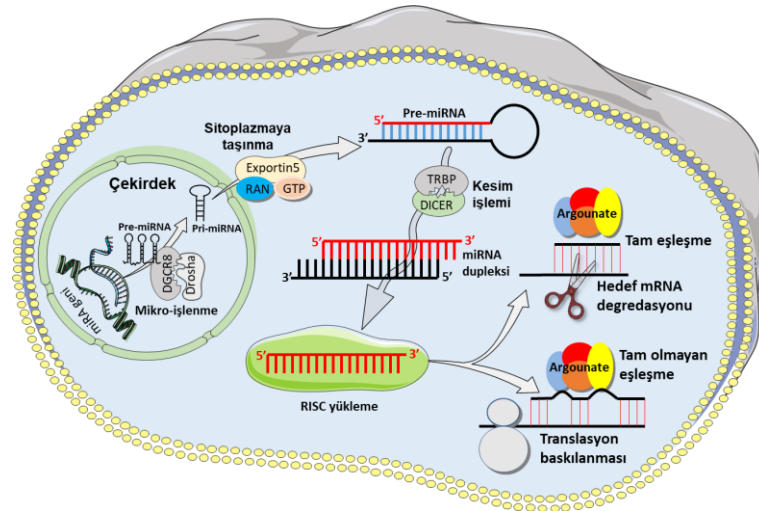
2.7. mikroRNA

1993 yılında V. Ambros ve arkadaşları *Caenorhabditis elegans* nematodunda Lin14 genini kapsayan çalışmalarında; lin14 protein miktarının kısa bir RNA gen ürünü Lin4 tarafından düzenlendiğini keşfetmiştir (Lee ve ark., 1993). mikroRNA (miRNA), küçük RNA molekülleri olarak bilinen bir sınıf ncRNA molekülleridir. Yaklaşık 22 nükleotitten oluşurlar. Özgün mRNA'larla etkileşime giren miRNA'lar, hücre içi gen ifadesini düzenlemek için önemli bir role sahiptirler. Bu küçük moleküller insan genomunun yaklaşık üçte birini düzenlemektedir. miRNA'ların hücre döngüsü, hücre farklılaşması, apoptoz, bağışıklık yanıt gibi biyolojik süreçte ve kanser, nörolojik ve kalp-damar hastalıklarda rol oynadığı bilinmektedir (Ha ve Kim, 2014).

miRNA'ların kan, idrar, beyin omurilik sıvısı, tükürük gibi biyolojik sıvılarında da bulunduğu tesbit edilmiştir (Weber ve ark., 2010). Plazmadaki miRNA'lar kararlı yapıya sahiptirler. pH değişkenliklerine dayanıklıdırlar ve oda sıcaklığında 4 güne kadar bozunmadan kalabilmektedirler (Lewis ve ark., 2005). miRNA'ların hastalık tanısı ve tedavisinde de potansiyel bir rol oynayabileceğini göstermiştir (Bartel, 2004).

2.7.1. mikroRNA biyogenezi

miRNA'ların biyogenezi, çeşitli enzimatik adımlar gerektiren kompleks bir süreçtir. miRNA'lar, genomik DNA'da kodlanan öncü-RNA (pri-miRNA) moleküllerinin öncelikle nükleus içinde çeşitli enzimatik işlemlerden geçerek kısaltılmasıyla oluşur. miRNA'ların ifadesi genel olarak protein kodlamayan DNA bölgelerinde gerçekleşir. Bir miRNA molekülü, farklı RNA polimeraz tarafından ifade edilen bir pri-miRNA olarak başlar. Ancak genellikle RNA polimeraz II tarafından ifade edilir. pri-miRNA, tipik olarak, birkaç yüz nükleotid uzunluğundadır ve kıvrımlı hairpin bir yapıya sahiptir (Winter ve ark., 2009). miRNA precursör kompleksi (miRNA processing complex) Drosha olarak adlandırılan bir nükleaz ve kofaktörü DGCR8 (DiGeorge kritik sendrom bölgesi 8) proteinini içerir. Bu kompleks, pri-miRNA molekülünün kıvrımlı yapısını tanır ve bu yapıyı tanıdıktan sonra, pri-miRNA'yı yaklaşık 70 nükleotid uzunluğunda keserek pre-miRNA'nın oluşmasına sebep olur (Denli ve ark., 2004). Pri-miRNA ve pre-miRNA oluşumu çekirdekte, sonraki aşama ise sitoplazmada gerçekleşmektedir.



Şekil 2.8. Genel mikroRNA yolu (Yang ve Lai., 2011). miRNA: mikroRNA, DGCR8: DiGeorge kritik sendrom bölgesi 8, Drosha: RNAaz III enzimi, GTP: guanozin trifosfat, RAN: RAS-ilişkili Nükleer protein, RISC: RNA indüklenmiş susturma kompleksi, pri-mikroRNA: primer mikroRNA, TRBP: HIV-1 TAR RNA-bağlanma proteini.

Pre-miRNA'nın çekirdekte sitoplazmaya taşınması Exportin-5 (XPO5) ve RanGTP proteini ile yapılır. Sitoplazmada DICER (RNAaz III) aracılığıyla sap-ilmik yapısı kesilerek, 21-24 nükleotit uzunluğunda dubleks miRNA'ya dönüştürülür (Hitit ve ark., 2015). DICER, aynı anda miRNA ifadesi ve RNA kaynaklı gen susturmasından sorumlu olan RNA indüklenmiş susturma kompleksi (RISC) oluşumunun başlanmasına sebep olur. Sap-ilmik yapıdaki 5' ve 3' uçlarda tek iplikli RNA çıkıntılarının varlığı pre-miRNA'nın işlenmesi için şarttır (Zeng ve Cullen., 2005). Daha sonra, dubleks miRNA'daki tamamlayıcı ipliklerden yalnız biri, diğer proteinlerden oluşan başka bir kompleks olan RISC ile birleşir. RISC kompleksinde bulunan argonaute proteinleri 5' ucu daha kararlı olan ipliği kompleks ile birleştirir. Bu ipliğe kılavuz iplik denir (Preall ve ark., 2006). Geride kalan iplik ise yolcu iplik adlanır ve işlem sonrası sindirilir (Gregory ve ark., 2005). RISC kompleksi, miRNA'nın hedef mRNA'ya bağlanmasını kolaylaştırır. Olgun miRNA'lar, hedef mRNA'larla özellikle 3'-untranslated bölgesine (UTR) bağlanarak translasyonel olarak susturmasına veya yıkımına neden olur (Şekil 2.8).

miRNA biyogenezi, hücre farklılaşması, proliferasyon, gelişme, apoptoz, stres yanıtı, kanser ve diğer hastalıkların patogeneziinde önemli bir rol oynamaktadır. Bu nedenle, miRNA biyogenezi mekanizmalarının daha iyi anlaşılması, miRNA tabanlı terapötik stratejilerin geliştirilmesine yönelik çalışmalarda büyük bir öneme sahiptir.

Bu tez çalışmasının amacı; kısa süreli opioit uygulamasının miRNA biyogenez yolu ve metilasyon profili üzerine etkili DNMT (DNA metil transferaz) genlerinin ifadeleri üzerine etkisinin *in vitro* ve *in vivo* bağımlılık modeli kullanılarak araştırılmasıdır.

3.GEREÇ VE YÖNTEMLER

3.1. Hipotalamus Dokularının ve Nöroblastoma Hücrelerinin Elde Edilmesi

Kısa süreli opioit uygulamasının epigenetik mekanizmalar üzerine etkilerinin araştırması amacıyla *in vivo* ve *in vitro* model kullanılmıştır.

3.1.1. *İn vivo* model

İn vivo morfin bağımlılığı ve çekilmesi sıçan modelinin geliştirilmesi KONÜDAM Deneysel Tıp Uygulama ve Araştırma Merkezi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulunun 2020/05 nolu onayı ile KONÜDAM ve Necmettin Erbakan Üniversitesi Sinir Bilim Uygulama ve Araştırma Merkezi (NESAM) laboratuvarlarında gerçekleştirilmiştir. Kısaca; her 7 gün deri altı %0,9'luk NaCl uygulanan kontrol grubu (K; n=12), 7 gün deri altı 10 mg/kg morfin uygulanan morfin bağımlılık grubu (M; n=12) ile 7 gün deri altı 10 mg/kg morfin uygulaması sonrası yedinci gün 1 mg/kg intraperitoneal nalokson uygulanan morfin bağımlılığı+nalokson grubu (M+N; n=12) oluşturulmuştur. Kontrol ve morfin gruplarına ayrıca 7. gün tek doz intraperitoneal %0,9'luk serum fizyolojik uygulanmıştır. Sıçanlar gözleme kafesine alınarak 30 dakika gözlemlenmiş, morfin çekilme bulguları ve morfin çekilme skorları tespit edilmiştir. Tüm sıçanların beyin dokuları çıkarılarak, snap frozen örnekler -80 °C derin dondurucuda kullanılmak üzere saklanmıştır (Çimen, 2020).

3.1.2. *İn vitro* model

İn vitro sinir bilim çalışmalarında nöroblastom hücre hatları yaygın ve altın standart olarak kullanılmaktadır. Bu tez çalışmasında kısa süreli *in vitro* opioit bağımlılık modelinin geliştirilmesinde SH-SY5Y insan nöroblastom hücre hattı kullanılmıştır. Hücre hattı uygun besi yeri şartları (DMEM, %10 FBS ve %1 antibiyotik) ve 37 °C sıcaklık, %95 nem ve %5 CO₂'li etüvde çoğaltılmıştır. Çalışmada kullanılması planlanan morfin ve mü opioit antagonisti Nalokson N.E.Ü. Tıp Fakültesi Hastanesi Başhekimliğinden temin edilmiştir. *İn vitro* model kapsamında, kontrol (K), 1, 10 ve 100 µM en yüksek toksik olmayan dozun belirleneceği morfin grubu (M), 10 µM nalokson (N) ve 10 µM nalokson uygulanan morfin+nalokson (M+N) grubu oluşturulmuştur. Her bir deneme grubuna ait SH-SY5Y hücreleri 37 °C'de %5 CO₂'li etüvde 72 saat inkübe edilmiş ve ilgili gruplarda besi yeri yenilenmiştir. Hücre canlılık testleri XTT yöntemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. XTT solüsyonu ilavesi sonrası 450 ve 630 nm UV'de belirlen OD değerleri kullanılarak hücre canlılığı tespit edilmiştir. N ve M+N gruplarında 5. gün 1 saat 10 µM nalokson uygulaması sonrası 6 kuyucuklu plakalarda her bir deneme grubuna ait hücreler toplanıp total RNA izolasyonunda kullanılmıştır.

3.2. Total RNA İzolasyonu

In vivo modelde hipotalamus dokuları ile *in vitro* model uygulamalarında her bir gruptan elde edilen nöroblastom hücrelerinden total RNA izolasyonu TRIzol yöntemi kullanılarak yapılmıştır. İlk önce 500 µl TRIzol ile örneklere homojenize işlemi uygulanmıştır. Oda sıcaklığında 5 dakika bekledikten sonra her örneğe 100 µl soğuk kloroform ilave edilmiştir. Kısa vorteks işleminden sonra tekrar 15 dakika oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Ardından 12000 g'de +4 °C'de 15 dakika santrifüj yapılmış, üst RNA fazı yeni ependorfa aktarılmıştır. Sonra tüplere 500 µl izoproponal ilave edilmiştir. Alt üst yapılar karıştırılmış ve 10 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir. Ardından 12000 g'de +4 °C'de 15 dakika santrifüj yapılmıştır. Santrifüj sonrası oluşan supernatant fazı uzaklaştırılmıştır. RNA pelletine 500 µl %70'lik soğuk etanol eklenmiş ve alt üst yapılmıştır. Yıkama işlemi bittikten sonra, 12000 g'de +4 °C'de 15 dakika santrifüj sonrası RNA pelleti kurutulmuş ve 50 µl nükleaz ari ddH₂O ile çözdürülmüştür.

3.2.1. Total RNA örneklerinin kalitesinin belirlenmesi

Total RNA örneklerinin kalitesi jel elektroforez ve spektrofotometrik analizler kullanılarak kontrolü sağlanmıştır. Nanodrop spektrofotometre cihazı kullanılarak potansiyel gDNA, fenol, protein kontaminasyonlarını tayin etmek için A260/280 ve A260/230 oranları değerlendirilmiştir. Total RNA örneklerinin kalitesini değerlendirmek için %1'lik agoroz jel elektroforez gerçekleştirilmiştir.

3.2.2. DNase-I uygulamasıyla total RNA'dan gDNA'nın giderilmesi

Potansiyel gDNA kontaminasyonunun temizlenmesi için DNase-I protokolü kullanılmıştır. Total RNA'ların üzerine 2 µl DNase-I reaksiyon tamponu ve 2 µl DNase-I enzimi eklenerek toplam 20 µl tamamlanmıştır. Reaksiyonun tamamlanması için 30 dakika 37 °C'de inkübe edilmiştir. İnkubasyon sonrası 1 µl 50 mM EDTA eklenerek, 65 °C'de 10 dakikada DNase-I aktivitesi durdurulmuştur.

3.3. Total RNA'lardan cDNA Sentezi

Total RNA örnekleri reverz transkriptaz (RT) reaksiyonu ile cDNA'ya çevrilmiştir. Bu aşamada Bio-Rad iScript™ cDNA Sentez Kiti (#170-8891, A.B.D.) kullanılmıştır. Bu protokole göre izole edilmiş 1 µg RNA üzerine 4 µl 5X iScript reaksiyon miksi, 1 µl Reverz Transkriptaz enzimi ve ddH₂O eklenerek, 20 µl'ye tamamlanmıştır. 25 °C'de 5 dakika, 42 °C'de 30 dakika ve 85 °C'de 5 dakika uygulanan örneklerden tek zincirli cDNA üretimi gerçekleştirilmiştir.

3.4. qPZR Primer Dizaynı

Kantitatif gerçek zamanlı PZR analizleri (qPZR) için DNMT (DNA metil transferaz) genlerine ait özgün oligoların hazırlanması online tabanlı IDT PrimerQuest (<http://eu.idtdna.com/site>) programı ile gerçekleştirilmiştir. miRNA biyogenez yolağı (Koçaker, 2021) ile PGK1 (Seol ve ark., 2011), GAPDH (Lallemant ve ark., 2009) ve RPL13A (Langnaese ve ark., 2008) referans genlerine ait primerler literatürden alınmıştır (Tablo 3.1).

Tablo 3.1. Çalışmada kullanılan genlere ait primer bilgileri

Gen	Oligonükleotid Dizisi	PZR ürünü (bç)
DNMT1	5'- AAGTGGTGAGGATTGCAGAG -3' 5'- TTCTCCATCAGACTTGCTTCTC -3'	100
DNMT2	5'- CTCCATGTCAGCCATTCAACA -3' 5'- ACTTCTGTAACCTTGGGAGAATAT -3'	105
DNMT3a	5'- AGAAGGAGACCAACATCGAATC -3' 5'-TGCGCTTGCTGATGTAGTAG -3'	147
DNMT3b	5'- GGAAAGATCAAGGGTTTCTCCT -3 5'-GAGAACTTGCCATCACCAAAC -3'	119
AGO1	5'- CCGCCTGAGGGCTACTA -3' 5'-CATCAATGTTGAGCATCATCTTCC-3'	106
AGO2	5'- GCGTTACACGATGCACTTTC -3' 5'- TGTACCTCATGGATGGCAAG-3'	100
AGO3	5'-GCAGATTGGTAAGAAGTGCAAAT-3' 5'-CATACTGGAGCATAGGTGCTG-3'	123
AGO4	5'- AACAGTAGCCACACCCAAC -3' 5'- GCAAATCTTCCCTACATTGTTTCT-3'	125
XPO5	5'- AACACAAATTGCCATCGTCAG-3' 5'- CTTCAGGTAGACCTTCTCCAATC-3'	103
DROSHA	5'- AGATTTCAATTCATGCCACGTT-3' 5'- TCCGCATATTTCTGCCACTC-3'	173
TRBP2	5'- CCGTGTACGACCTTCTCAAA-3' 5'- TGCTTGGCTGCCTTCTT-3'	118
DICER	5'- AACAAGTGTGACGCTGTCAGAA-3' 5'- ACATTCAAGGCGACATAGCA-3'	151
DGCR8	5'- GTAATGGACGTTGGCTCTGG-3' 5'- GCTGTGGCCACTACAGTTC-3'	144
Ran-GTP	5'- CAGTACTATGACATTTCTGCCAAA-3' 5'- CTCCAAGTTAGGATCTCCAATGA-3'	93
PGK1	5'-ATGCAAAGACTGGCCAAGCTAC-3' 5'- AGCCACAGCCTCAGCATATTTTC-3'	104
GAPDH	5'- TGAACGGGAAGCTCACTGG-3' 5'- TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3'	307
RPL13A	5'-GGATCCCTCCACCCTATGACA-3' 5'-CTGGTACTTCCACCCGACCTC-3'	132

3.5. Kantitatif PZR Analizleri

Tez çalışmasında konu olan genlerin ifadelerinin belirlenmesinde qPZR analizi yapılmıştır. Her bir reaksiyonda; 10 µl A.B.T. 2x qSYBR Green Master Mix ROX Dye, 5 pMol forward ve reverse primer, 2 µl cDNA ve toplam hacim 20 µl olacak şekilde qPZR miks hazırlanmıştır. Reaksiyonun ısı profili olarak +95 °C 5 dakika denatürasyon sonrası 40 siklus (95 °C 40 saniye, 60 °C 30 saniye, 72 °C 10 saniye) kullanılmıştır. Daha sonra 65 °C'den 95 °C'ya 0,5 °C artışla kademeli olarak ısıtma işlemi gerçekleştirilerek melting curve analizi yapılmış, Ct değerleri kayıt altına alınmıştır.

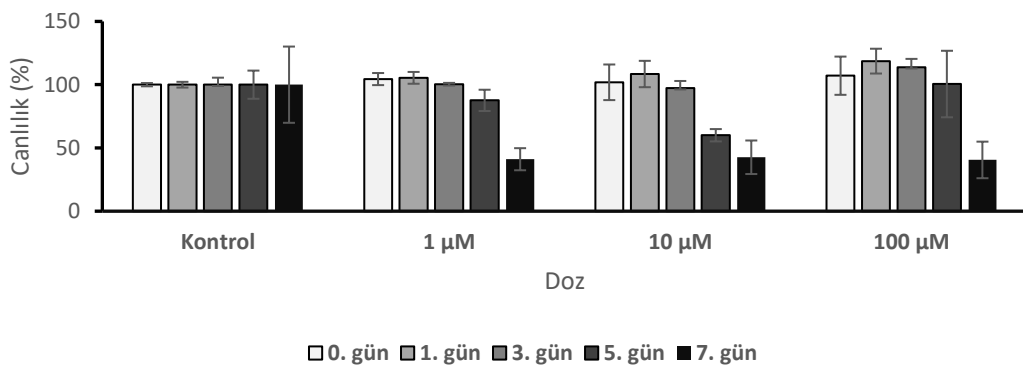
3.6. İstatiksel Analiz

Hedef genlere ait Ct değerleri, housekeeping genlere (PGK1, GAPDH ve RPL13A) ait Ct değerleri kullanılarak normalize edilmiş $2^{-\Delta Ct}$ değerleri hesaplanmıştır. Gruplar arası farklılıklar tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve Asgari Önemli Fark (LSD) testi kullanılarak karşılaştırılmıştır. $p \leq 0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. *İn vitro* Model

İn vitro bağımlılık modelinin geliştirilmesinde sinir bilim çalışmalarında altın standart olarak tercih edilen SH-SY5Y insan nöroblastom hücre hattı kullanılmıştır. XTT analizi sonucunda SH-SY5Y insan nöroblastom hücrelerinde en yüksek toksik olmayan morfin dozu 5. gün için 10 µM olarak tespit edilmiş ve *in vitro* bağımlılık modelinde kullanılmıştır (Şekil 4.1). Kontrol (K), 10 µM en yüksek toksik olmayan morfin (M), 10 µM nalokson (N) ve 10 µM morfin +10 µM nalokson (M+N) grupları oluşturulmuştur.



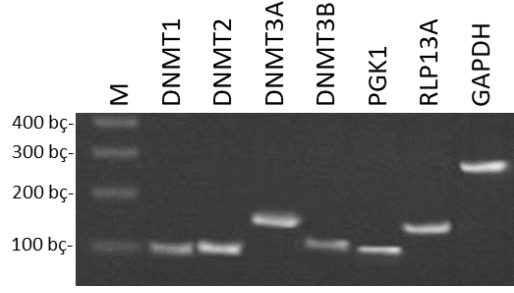
Şekil 4.1. Morfinin SH-SY5Y hücrelerinde canlılık üzerine etkisi

4.2. *İn vivo* Model

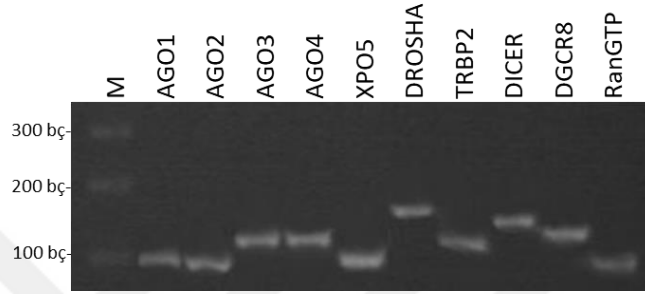
İn vivo morfin bağımlılığı ve çekilmesi sıçan modeli oluşturulması amacıyla kontrol (K) ile 7 gün 10 mg/kg morfin (M) ve 10 mg/kg morfin bağımlılığı+1 mg/kg nalokson (M+N) grubu sıçanların hipotalamus dokuları kullanılmıştır.

4.3. Total RNA İzolasyonu ve cDNA Sentezi

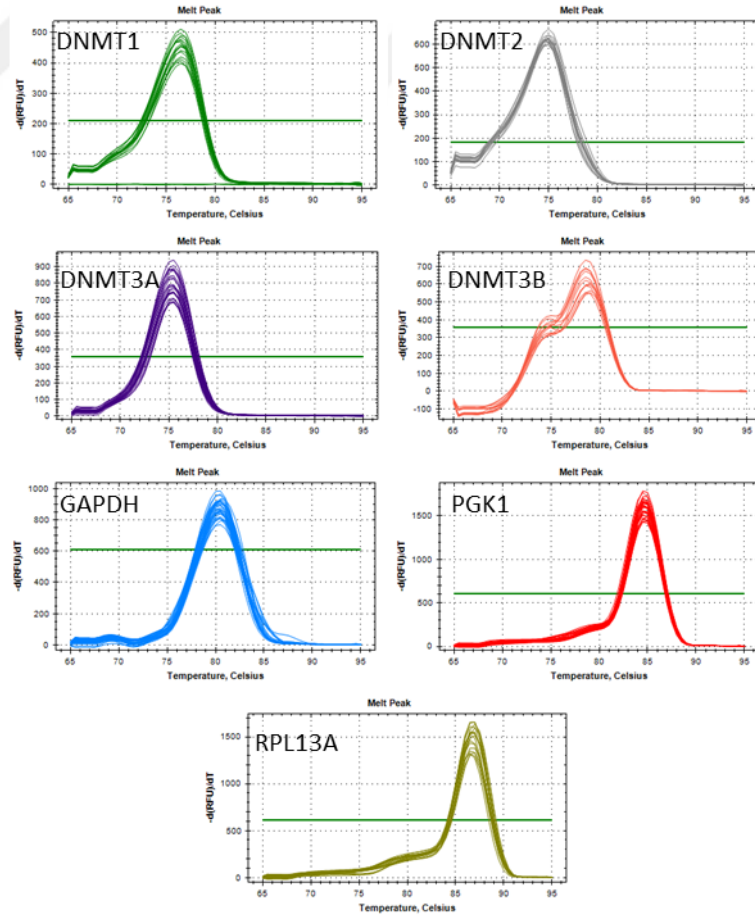
İn vivo ve *in vitro* model kapsamında alınmış olan doku ve hücre örneklerinden total RNA izolasyonu ve cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir. Bulgular, örneklerin qPCR analizlerde kullanılabilir kalite olduğunu göstermiştir. Çalışma konusu olan miRNA biyogenez yolağı, DNMT (DNA metil transferaz) ve referans (PGK1, GAPDH, RPL13A) genlerine ait PCR ürünlerinin agaroz jel (Şekil 4.2, ve 4.3.) ve melting curve (MC) analiz görüntüleri (Şekil 4.4 ve 4.5) verilmiştir. Çalışmaya konu alan primerlerin hedef gen bölgelerini spesifik olarak yükselttiği tespit edilmiştir.



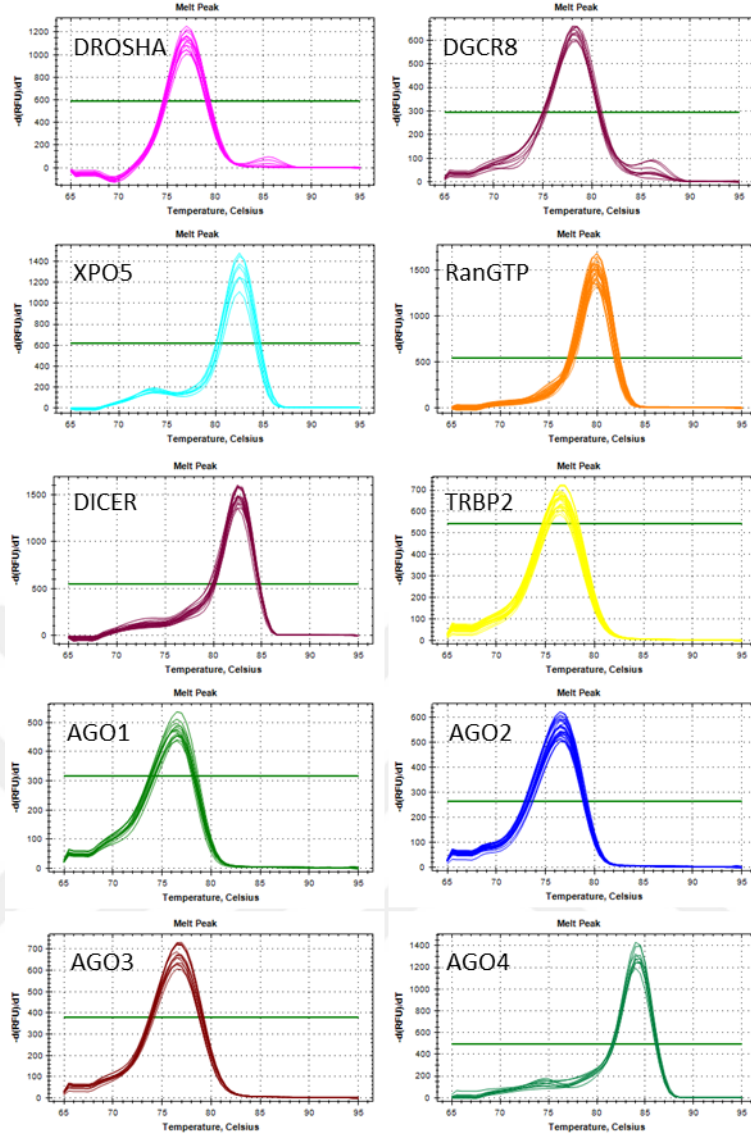
Şekil 4.2. DNA metil transferaz (DNMT) ve referans genlerine ait agaroz jel elektroforez görüntüsü. M: 100 bç standart.



Şekil 4.3. miRNA biyogenez yolu genlerine ait agaroz jel elektroforez görüntüsü. M: 100 bç standart.



Şekil 4.4. DNA metil transferaz (DNMT) ve referans genlerine melting curve analizi

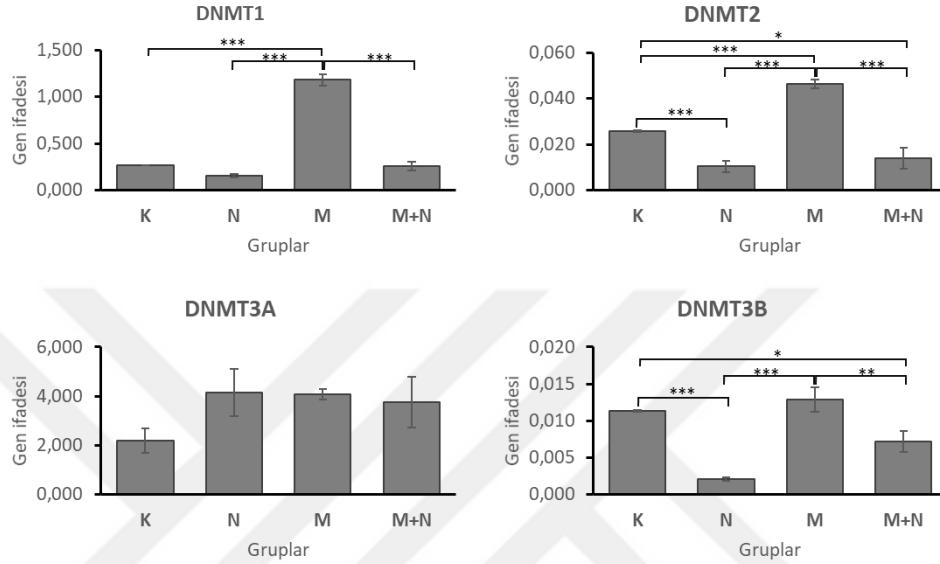


Şekil 4.5. miRNA biyogenez yolağı genlerine ait melting curve analizi

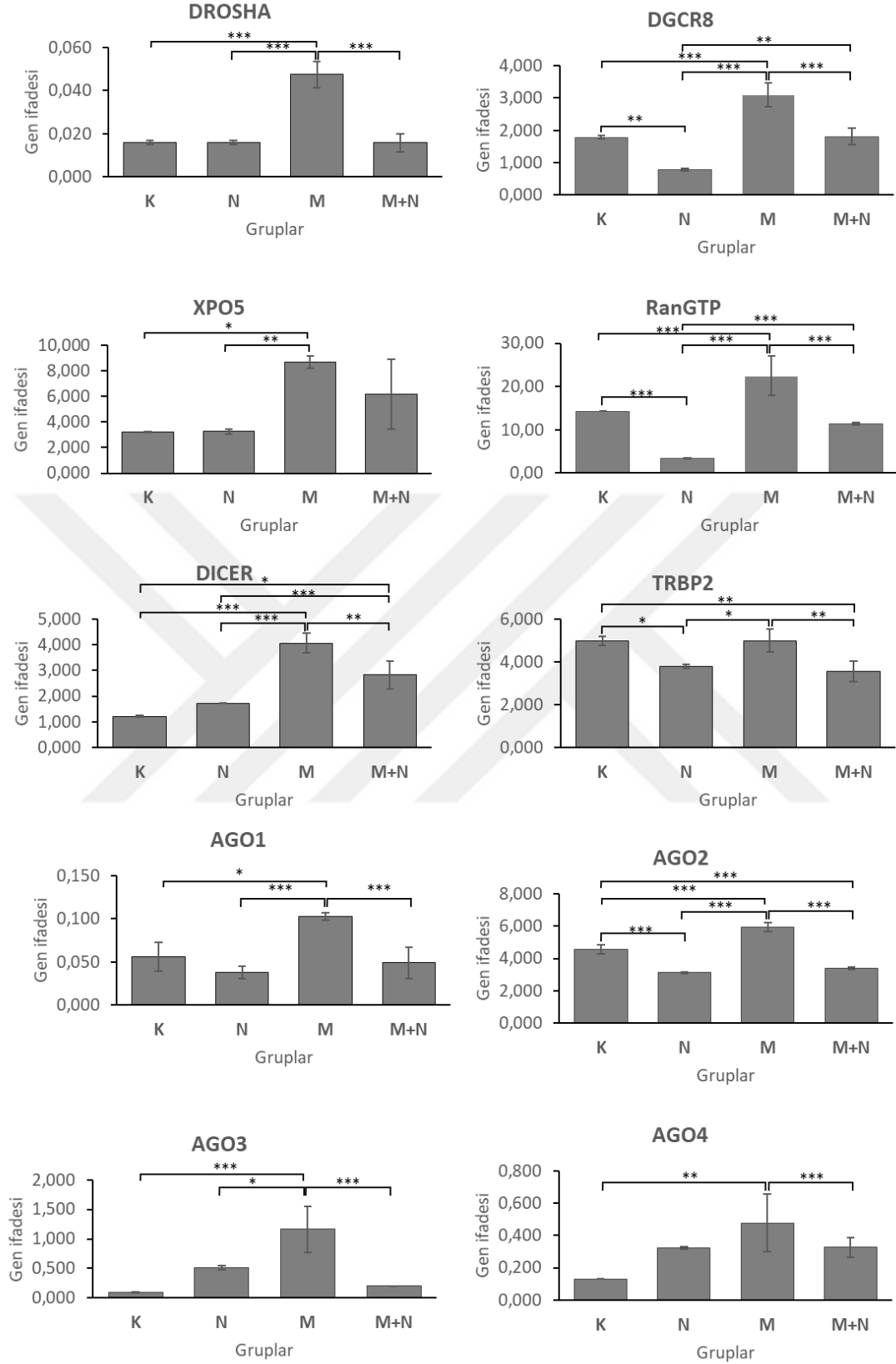
4.4. qPZR Analizleri

Hedef genlere ait Ct değerleri, referans genlere ait Ct değerleri kullanılarak normalize edilmiştir. Δ Ct değerleri ve varyans analizi kullanılarak gruplar arası farklılıklar istatistiksel olarak karşılaştırılmıştır. SH-SY5Y nöroblastom hücre hattında DNMT (Şekil 4.6.) ve miRNA biyogenezi yolağı genlerinin (Şekil 4.7.) mRNA düzeyinde ekspresyon seviyeleri gösterilmiştir. *In vitro* bağımlılık modelinde; morfin uygulaması ile DNMT1, DNMT2 ve DNMT3B gen ifadesi artmış olup nalokson uygulamasının baskıladığı gözlenmiştir. Nalokson grubunda kontrol grubuna göre DNMT2 ve DNMT3B genlerinde baskılanmıştır ($p \leq 0,001$). Nalokson ve morfin uygulamasının DNMT3A gen ifadesi üzerine etkisi gözlenmemiştir (Şekil 4.6). Kontrol grubu ile kıyaslandığı zaman morfin grubunda TRBP2 hariç miRNA biyogenez yolağında bulunan bütün genlerin ifadesi istatistiksel olarak artmıştır ($p \leq 0,05$). Morfin grubunda

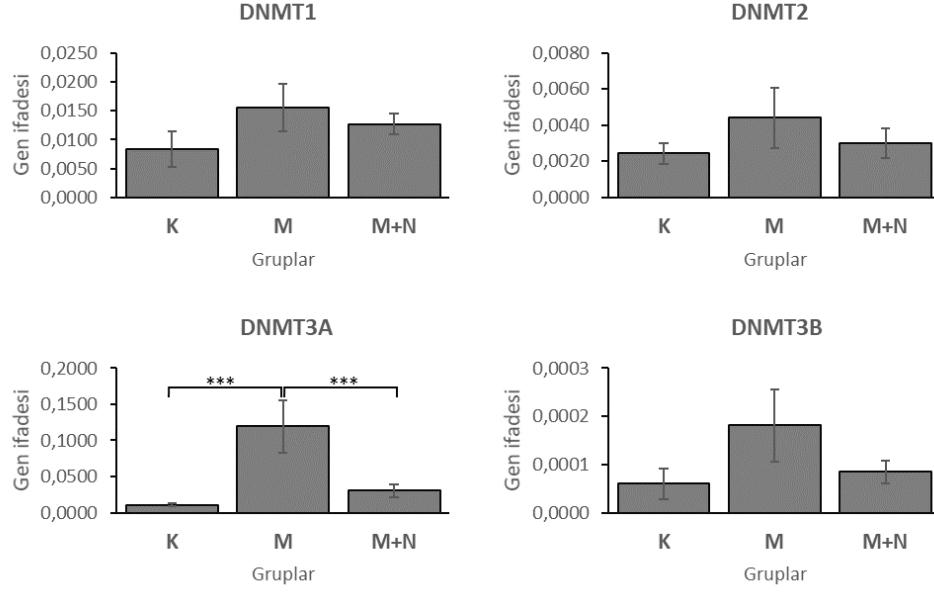
nalokson uygulaması (M+N) sonrası tüm genlerde artmış ifade düzeylerinin baskılandığı gözlenmiştir ($p \leq 0,01$). XPO5 geninde de benzer bir aşağı yönde regülasyon gözlenmiştir, ancak istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p=0,232$). Kontrole göre nalokson uygulaması sonrası RanGTP, TRBP2 ve AGO2 genlerinde baskılanma tespit edilmiştir (Şekil 4.7).



Şekil 4.6. *In vitro* bağımlılık modelinde DNMT genlerinin ifade düzeyleri. Kontrol (K), nalokson (N), morfin (M) ve morfin+nalokson (M+N) gruplarına ait SH-SY5Y nöroblastom hücre hattında ekspresyon düzeyleri $2^{-\Delta Ct}$ olarak gösterilmiştir. * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$.



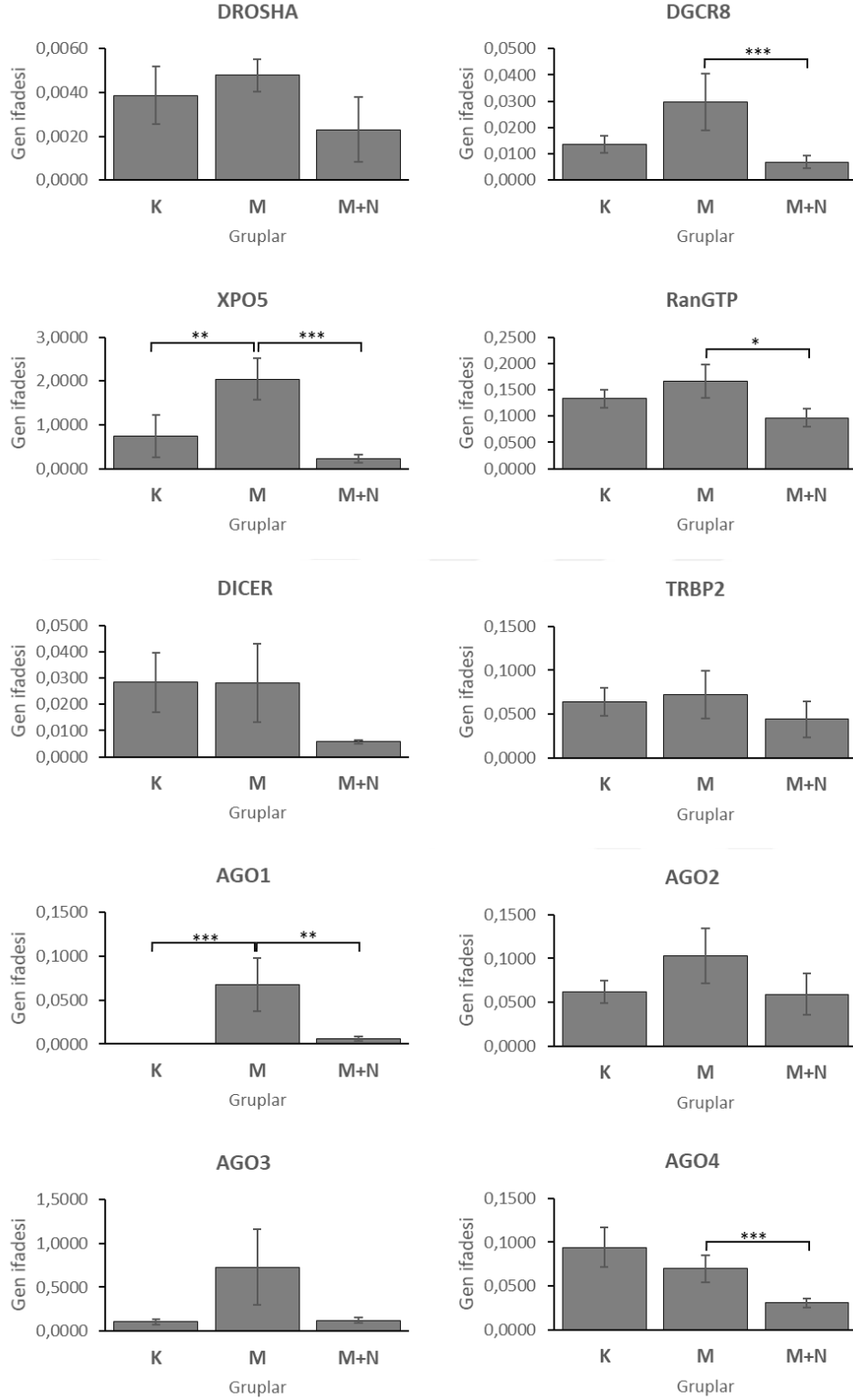
Şekil 4.7. *In vitro* bağımlılık modelinde miRNA biyogenez yolu genlerinin ifade düzeyleri. Kontrol (K), nalokson (N), morfin (M) ve morfin+nalokson (M+N) gruplarına ait SH-SY5Y nöroblastom hücre hattında ekspresyon düzeyleri $2^{-\Delta Ct}$ olarak gösterilmiştir. * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$.



Şekil 4.8. *In vivo* bağımlılık modelinde DNMT genlerinin ifade düzeyleri. Kontrol (K), morfin (M) ve morfin+nalokson (M+N) gruplarına ait hipotalamus dokularında ekspresyon düzeyleri $2^{-\Delta Ct}$ olarak gösterilmiştir. * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$.

In vivo bağımlılık modelinde DNMT ve miRNA biyogenez yolağı genlerinin ifade düzeyleri Şekil 4.8 ve Şekil 4.9’da gösterilmiştir. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığı zaman morfin grubunda DNMT genlerinin ifadesinin arttığı ve morfin+nalokson grubunda baskılandığı gözlenmiştir. Ancak bu tablo yalnızca DNMT3A geninde istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p \leq 0,001$). Benzer bir tablo DICER ve AGO4 hariç çalışmaya konu olan diğer miRNA biyogenez yolağında bulunan genler içinde gözlenmiştir. Morfin uygulamasının yalnızca XPO5 ve AGO1 genlerinde anlamlı artışa neden olduğu tespit edilmiştir. DGCR8, XPO5, RanGTP, AGO1 ve AGO4 genlerinde morfin grubuna göre M+N grubunda istatistiksel olarak anlamlı bir baskılanma gözlenmiştir.

In vitro ve *in vivo* bağımlılık modellerinde gen ifadesi düzeyleri genel olarak benzer bulunmuştur. Morfin ve nalokson uygulamasının epigenetik düzeyde çalışmaya konu olan genlerin ifadesini etkilediği tespit edilmiştir.



Şekil 4.9. *In vivo* bağımlılık modelinde miRNA biyogenez yolağı genlerinin ifade düzeyleri. Kontrol (K), morfin (M) ve morfin+nalokson (M+N) gruplarına ait hipotalamus dokularında ekspresyon düzeyleri $2^{-\Delta Ct}$ olarak gösterilmiştir. * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$.



5. TARTIŞMA

Madde bağımlılığı, yaşamı olumsuz yönde etkileyen ciddi bir hastalıktır. Bu hastalık, beyinin belirli bölgelerindeki kimyasal değişkenliklerle ilişkilidir ve tekrarlayan madde kullanımına neden olur. Madde bağımlılığı, kişinin madde kullanımının kontrol edilemez hale gelmesi ve olumsuz sonuçlara sebep olmasıdır. Bu durum hem fiziksel hem de psikolojik olarak bağımlılık oluşturabilecek her türlü madde için geçerlidir (Center for Substance Abuse Treatment, 2005).

Madde bağımlılığı, özellikle dopamin salınımını etkileyen nörotransmitterlerle ilgilidir. Dopamin, ödül ve ceza ile ilişkili duyguları düzenleyen bir nörotransmitterdir ve ödüllendirici uyarılara maruz kalındığında salınır. Madde kullanımı beyinde dopamin salınımını artırır ve tekrarlanan kullanıma neden olabilir (Koob ve Volkow, 2010). Madde bağımlılığı, genetik ve çevresel faktörlerin birleşimi sonucu ortaya çıkmaktadır. Bazı genetik varyasyonlar bireylerin madde bağımlılığına yatkınlığını artırabilir. Bağımlılık yapıcı maddeler, hedef nöron reseptörlerinde, bu reseptörlere bağlı efektör membran proteinlerinde ve postreseptör fonksiyonlarında değişkenlikler yaparak nöroadaptasyonlara sebep olmaktadır.

Opioit ailesinin bir üyesi olan morfin en güçlü analjeziklerden biridir. Merkezi sinir sistemini etkileyerek ağrı hissini azaltır, uykuya neden olur ve zihinsel durumu değiştirir. Ancak, kötüye kullanıma açık olması madde bağımlılığına yol açmaktadır. Morfinin kötüye kullanımı; beyin nöronlarında meydana gelen adaptasyon ile nöron fonksiyonlarını değiştirmektedir. Morfin, μ -reseptörü üzerinden etki ederek etkisini gösterir. Morfinin bağımlılık yapıcı etkilerinin nedeni, beyinin ödüllendirici mekanizmalarının aktive edilmesidir. Beyindeki ödüllendirici mekanizmalar, dopamin sistemi tarafından kontrol edilir. Morfin, dopamin salınımını artırarak ödüllendirici etkilerini artırır. Bu nedenle, morfinin kronik kullanımı dopamin sistemini değiştirerek bağımlılığa neden olabilir (Thompson ve ark., 2012).

Epigenetik mekanizmalar gen ifadesini etkileyen mekanizmalardır. DNA metilasyonu epigenetik mekanizmalar arasında yer almaktadır. İnsanlarda DNA metilasyonu DNA metiltransferaz (DNMT1, DNMT2, DNMT3a, DNMT3b) enzimleri kataliz eder (Goll ve ark., 2006). Tüm DNA metiltransferazlar, enzim ve substrat bazı arasında bir kovalent reaksiyon ara ürününün geliştirilmesi ile karakterize edilen katalitik mekanizmayı kullanır. Sitozin-5 DNMT katalitik motifleri yüksek oranda korunur ve bu enzimleri DNA dizilerinde tespit etmek için kullanılabilir. Klasik sitozin-5 DNMT'ler (DNMT1, DNMT3A ve DNMT3B) genomik DNA

metilasyonunu katalize eder. DNMT2 ve DNMT3L ise katalitik DNMT aktivitesinden yoksun oldukları için kanonik olmayan aile üyeleridir (Lyko, 2018). Bununla birlikte, sitozin metilasyonu hem sitozin-guanin (CG) dinükleotitlerinde hem de CG olmayan bölgelerde (mCH) meydana gelir. mCH özellikle nöronlarda bol miktarda bulunur (Kaplan ve ark., 2022).

DNMT1, her DNA eşleşme döngüsünden sonra DNA'nın metilasyon durumunu koruyarak, oluşan yavru ipliklere kopyalanmasını sürdürür. Fareler üzerine yürütülen çalışmalarda DNMT1 geninin her 2 kopyasının silinmesi durumunda gelişimlerinin 9. gününde embriyonun öldüğü gözlenmiştir (Goll ve ark., 2006). DNMT3A ve DNMT3B embriyonik gelişim ve hücre farklılaşması sırasında değişkenliklerin oluşturulmasında *de nova* metilasyonu düzenler (Takahashi, 2014). Madde bağımlılığı üzerine yapılan çalışmalarda da maddeye maruz kalma durumunda DNMT genlerinin ekspresyonunda değişkenlikler olduğu saptanmıştır.

Nalokson, 1960'ların başlarında bir opioit antagonist olarak geliştirilmiştir. Nalokson, opioit reseptörlerine bağlanarak opioit etkilerini engeller ve etkili bir şekilde tersine çevirir (Rzasa ve ark., 2018). Morfin tedavisinin DNA metiltransferaz genlerinin (DNMT1, DNMT2, DNMT3A, DNMT3B) gen ifadesini değiştirdiği bulunmuştur (Muñoa-Hoyos ve ark., 2021; Yu ve ark., 2003). DNMT enzimleri, S-adenozil-L-metiyonin (SAM) adlı evrensel metil vericisinden metil grubunun DNA'daki sitozin kalıntılarının 5 pozisyonuna aktarılmasından sorumludur. Bu, gen ifadesinde önemli bir rol oynar (Gujar ve ark., 2019). Morfin, DNA metiltransferaz genlerinde değişikliklere neden olan opioitlerden biridir. Cadet ve ark. (2021), kokainin DNA metiltransferaz genleri üzerine etkilerini araştırmıştır. Çekirdek kabukta, akut kokain enjeksiyonu sonrasında DNMT3A ve DNMT3B mRNA düzeyleri artmıştır. DNMT3A mRNA, tek bir kokain enjeksiyonundan 4 saat sonra yükselmiş, ancak 24 saat sonra düşmüştür. Ayrıca, tekrarlayan kokain enjeksiyonları nükleus akkumbens'de DNMT1, DNMT3A ve DNMT3B mRNA düzeylerinde artışa neden olmuştur. İlginç bir şekilde, kokaini kendileri uygulayan fareler, son seanstan 24 saat sonra DNMT1 ve DNMT3A mRNA düzeylerinde önemli düşüşler göstermiştir. Ek olarak, tekrarlanan kokain enjeksiyonları, NAc'de DNMT1, DNMT3A ve DNMT3B mRNA seviyelerinin artmasına neden olmuştur. (Zhang ve ark., 2020). Bu tez çalışmasında; DNMT1, DNMT2 ve DNMT3B ifadesi *in vitro* modelde artmıştır. Ancak, nalokson ve morfin uygulamasının DNMT3A gen ifadesi üzerine etkisi gözlenmemiştir. Benzer bir artış *in vivo* modelde de gözlenmiş olmasına rağmen, yalnızca DNMT3A geninde istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. DNMT3A geninin morfin alımında önemli bir rol oynadığı ve bu genin baskılanmasının morfin bağımlılığını önlemede yardımcı olacağı ileri

sürülmektedir (Zhang ve ark., 2020). Bu çalışmada, DNMT3A ifadesi hipotalamus dokusunda artmış olup nalokson uygulaması ile baskılanmıştır. Ancak, *in vitro* modelde anlamlı bir fark gözlenmemiştir. Aynı şekilde, kokain uygulamasından sonra önemli bir beyin ödül bölgesi olan fare NAc'de DNMT3A ifadesindeki dinamik değişiklikler gözlenmiştir (Anier ve ark 2010). Ayrıca afyon bağımlılığı, DNMT3A'nın Ube2b'ye bağlı bozulmasını etkileyerek aktin polimerizasyonunu ve davranış plastisitesini indüklemeye yol açmaktadır (Chen, 2021). Uyuşturucu maddelere maruz kalmanın beyindeki DNA metilasyonunda global değişikliğe neden olduğunu ve bir metil donörü olan metiyoninin sistemik olarak verilmesinin kokaine verilen davranışsal yanıtı değiştirdiğini göstermiştir. Moleküler profillemenin ortaya çıkmasıyla birlikte, sinaptik plastisite genlerinde, ekspresyonlarını etkileyebilen ve ilacın kesilmesinden sonra da kalabilen, ilaca bağlı çeşitli DNA modifikasyon değişiklikleri keşfedilmiştir (Nestler ve ark, 2019).

Literatür bilgi miRNA'ların madde bağımlılığı ve opioitle ilişkili biyolojik süreçlerin önemli düzenleyicileri olduğunu göstermektedir (Hwang ve ark., 2012). Argonaute (AGO) enzimleri, RNA interferansı (RNAi) yolunda kritik bir rol oynayan bir protein sınıfıdır. Bu enzimler, gen ifadesini düzenlemek ve belirli genlerin aktivitesini kontrol etmekten sorumlu olan RNA tarafından indüklenen susturma kompleksinin (RISC) önemli bileşenleridir (Wu ve ark., 2020). AGO genleri (özellikle AGO2) tüm canlılarda katalitik aktivitesini koruduğu varsayım olarak ileri sürülmüştür. Bu sonuçlar, AGO2 katalitik aktivitesine ve klavuz ipliğin yüklenme için AGO2'ye gereksinim duyulduğunu ileri sürmektedir (Koçaker, 2021). Bu tez çalışmasında, *in vitro* modelde morfin uygulamasının AGO gen ifadelerini genel olarak artırdığı gözlenmiştir. Bununla birlikte nalokson uygulaması, morfinin AGO'lar üzerindeki etkisini tersine çevirmiştir. Benzer bir artış *in vivo* modelde de tespit edilmiştir. Yalnız AGO1 ve AGO4 genlerinde morfin grubuna göre M+N grubunda istatistiksel olarak anlamlı bir baskılanma gözlenmiştir. García-Pérez ve ark. (2015) çalışmasında morfinin AGO2'yi düzenlediğini bulmuşlardır. AGO2 protein seviyesinin morfin bağımlı sıçanlarda arttığını, morfin çekilmesinden sonra azaldığını tespit etmişlerdir. Ayrıca, Schaefer ve ark. (2010) çalışmasında farelerde AGO2 eksikliğinin kokaini uygulama motivasyonunu azalttığını belirtmiştir. Bu sonuç AGO'ların opioit bağımlılığındaki rolünü göstermektedir.

miRNA'ların biyogenezinde yer alan düzenleyici RNA'ların oluşumuyla ilgili genler arasında DICER (Dicer1), DROSHA ve DGCR8 (Pasha) bulunur. Klasik yolun bir parçası olarak, DROSHA ve DGCR8 pri-miRNA'yı pre-miRNA'ya işler, bu da ardından Exportin-5

(XPO5) aracılığıyla sitoplazmaya taşınır (Mulligan ve ark., 2013). DGCR8, çoğu miRNA'nın olgunlaşmasını yöneten mikroprosesör kompleksinin önemli bir bileşenidir (Chen ve ark., 2020). Young ve ark. (2016) yaptıkları bir çalışmada, DROSHA, DICER ve XPO5 genlerinin miRNA biyogenezinde önemini anlayabilmek için insan hücre hattında bu genlerin ifadesini susturmuştur. DROSHA geninin susturulması miRNA biyogenezini tam olarak durdurmuştur. DROSHA geninin miRNA biyogenezi için kritik olduğu sonucuna varılmıştır. DICER geninin silinmesi ise beyin dokusunda miRNA'ların seviyelerinde azalmaya sebep olmuştur. Aynı zamanda DICER'in yokluğunda pre-miRNA'ların argonatlara direkt yüklendikleri gözlenmiştir. XPO5 geninin silinmesi de DICER geniyle aynı sonuçlar oluşturmuştur. Diğer taraftan XPO5 gen fonksiyonunun alternatif yollar ile gerçekleştirilebilmektedir (Koçaker, 2021). DROSHA'nın kofaktörü olan DGCR8, çoğu miRNA'nın olgunlaşmasını yöneten mikroprosesör kompleksinin önemli bir bileşenidir. Bu çalışmada, *in vitro* ve *in vivo* modelde DGCR8'in M, N ve M+N gruplarında etkisi gözlenmiştir. Nalokson uygulaması sonrası M+N gruplarında DGCR8 ifadesi baskılanmıştır. Shi ve ark., (2022) DGCR8'in ağrıya yol açan ERK yolunu düzenlediğini bulmuşlardır. Bu durum, morfinin ağrıyı hafifletici etkisine sahip olması nedeniyle DGCR8'in morfin bağımlılığındaki önemli rolünü göstermektedir (Andersen ve ark., 2003).

DROSHA, ribonükleaz III ailesinden bir enzimdir. RNaz III ve çift sarmal RNA bağlayıcı alanların varlığı bu endonükleaz ailesini ayırt eder. DGCR8'in DROSHA'nın pri-miRNA işleme için zorunlu bir RNA bağlayıcı ortağı olarak keşfedilmiştir (Guo, 2012). Bu tez çalışmasında, *in vivo* modelde DROSHA gen ifadesinde gözlenen değişikliğin istatistiksel olarak anlamlı olmadığı tespit edilmiştir. Xu ve ark. (2015) bir çalışmasında, 1 µM morfinin DROSHA ekspresyon düzeyi üzerinde anlamlı bir etkisi olmadığı bulunmuştur. Ancak, bu çalışmada morfin uygulaması, hücre kültürlerinde (*in vitro*) istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde DROSHA ifadesini artırmıştır.

XPO5, miRNA hairpin öncülerinin (pre-miRNA'lar) nükleustan çıkarılmasına yardımcı olan bir karyoforin proteindir. RanGTP bağımlı bir şekilde, XPO5, pre-miRNA ve miniheliks viral RNA dahil olmak üzere, 2-8 nt 3' uzantılı hairpin RNA'larına bağlanır ve bunları nükleustan sitoplazmaya taşır. Ran, Ras süper ailesine ait olan Ras benzeri nükleer protein olarak da bilinir. Ailesindeki diğer küçük GTPazların aksine, Ran, hedeflerini plazma membranına yönlendiren CAAX motifini C-ucuna sahip değildir. Sonuç olarak, Ran, plazma membranına yerleşmek yerine çekirdek ve sitoplazma arasında taşınır. Ran, moleküllerin

nükleer por kompleksi üzerinden taşınmasını düzenlemede önemli bir rol oynar ve nükleo-sitoplazmik taşımayı kolaylaştırır. Ayrıca, Ran, hücre bölünmesi sırasında mikrotübül polimerizasyonu ve mitotik iğ oluşumu gibi süreçleri düzenleyerek hücre döngüsü sürecinin kontrolünde yer alır. Bu hücrel süreçlerdeki faaliyetleri, hücre işlevi ve organizasyonunun genel düzenlemesine katkıda bulunur (Boudhraa ve ark., 2020). Bu tez çalışmasında, XPO5 ve RanGTP gen ifadelerinin morfin, nalokson veya morfin+nalokson gruplarında değiştiği bulunmuştur. *İn vitro* modelde XPO5 ifadesi M+N grubunda aşağı regülasyon gözlenmesine rağmen istatistiksel anlam bulunmamıştır. *İn vivo* modelde ise morfin grubuna göre M+N grubunda XPO5 ifadesinde istatistiksel olarak anlamlı bir baskılanma gözlenmiştir. Öte yandan, *in vitro* modelde kontrole göre nalokson uygulaması sonrası RanGTP düzeyi baskılanmıştır. Aynı bulgular *in vivo* modelde de gözlenmiştir. Morfin grubuna göre M+N grubunda istatistiksel baskılanma tespit edilmiştir. En iyi literatür taramalarımıza göre morfin uygulamasının bu genlerin ifadesi üzerine etkisinin tanımlandığı daha önce yapılmış bir çalışma bulunmamaktadır.

DICER, miRNA öncülerini işlevsel 21-23 nt RNA'ya dönüştüren bir RNaz III endonükleazdır ve bunları RNA tarafından indüklenen susturma kompleksi (RISC) içine dahil etmek için kullanılır. DICER'in devre dışı bırakılması, olgun miRNA'ların kaybına ve miRNA öncülerinin artmasına neden olur ve bu da miRNA'ların genel işlevlerini araştırmak için etkili bir yöntemdir. Morfin veya nalokson uygulamasının hücre kültüründe DICER ifadesini kontrol grubuna göre arttığı, ancak M+N grubunda baskılandığı tespit edilmiştir. Ayrıca, hipotalamus dokusunda nalokson uygulaması ile DICER ifadesinde anlamlı olmayan bir baskılanma bulunmuştur. Aslında, Tapocik ve ark. (2016) çalışmasına göre DICER1 analjezik toleransın gelişimiyle pozitif korelasyon göstermiştir. DICER1'in baskılanması, farelerde tolerans gelişimini ortadan kaldırmaktadır. Aynı çalışmada, DICER1'in miRNA27'i etkileyerek farelerde morfine karşı toleransın azaltılmasında rol oynadığına dair bilgiler sunulmuştur. Xu ve ark. (2015) çalışmasında, 1 µM morfin uygulamasının DICER gen ifadesini artırdığı bulunmuştur.

TRBP1 ve TRBP2, başlangıçta insan bağışıklık yetmezliği virüsü (HIV-1) TAR RNA'ya bağlanma yeteneği nedeniyle keşfedilen hücrel protein TRBP'nin izoformlarıdır. TRBP'nin hem insan hem de fare hücrelerinde HIV uzun terminal tekrarının ifadesini artırdığı bulunmuştur. TRBPler, iki çift sarmal RNA bağlama alanı (dsRBD) içerir ve dsRBD2, KR-helix motifini içeren ve diğer proteinlerle etkileşimleri kolaylaştıran bir Medipal alana sahiptir.

TRBPlerin dsRBD'leri aracılığıyla PKR ve PACT'e bağlanabilirken, Medipal alanı Merlin, DICER ve PACT'e bağlanmalarını sağlar. TRBPlerin RNA ve protein bağlama yetenekleri, spermatogenez, hücre büyümesi, onkogenез ve viral replikasyon gibi fonksiyonel rollerine katkıda bulunur. Özellikle, TRBP ve DICER arasındaki etkileşim ve RNA interferansı (RNAi) yolunun bir parçası olarak, özellikle RNA tarafından indüklenen susturma kompleksi (RISC) içindeki rolü önemli olarak tanınmıştır (Daniels ve ark., 2009). DICER'in katalitik aktivitesinin artmasında TRBP'nin etkili olduğu, ancak TRBP'nin yokluğunda da DICER'in işleme aktivitesinde değişikliğin olmadığı tespit edilmiştir (Hitit ve ark., 2015). Bu tez çalışmasının *in vitro* modelinde kontrol grubu ile kıyaslandığında morfin grubunda TRBP2 düzeyinde anlamlı bir artış olmadığı, ancak kontrole göre nalokson uygulaması sonrası baskılanma tespit edilmiştir. *In vivo* modelde ise mRNA düzeyinde TRBP2 ifadesi anlamlı bulunmamıştır. Nalokson uygulaması ile *in vitro* modelde baskılanma gözlenmiştir. Zhang ve ark. (2016) tarafından yapılan çalışmada, morfin uygulamasının hipokampal nörogenез üzerinde etkisinin olduğu ve hücre soy hattını etkileyerek opioit reseptörünü (MOR) ve ERK aktivasyonunu da içeren aşağı akış sinyal yollarını aktive ettiği bulunmuştur. Sitoplazmadaki fosforile ERK, DICER'in bir yardımcısı olan TRBP'yi fosforile edebilmektedir. TRBP fosforilasyonu ise DICER aktivitesini arttırmaktadır. Bu değişiklik, yetişkin hipokampal granüler hücrelerin kaderini düzenleyebilir ve TRBP'nin morfin yanıtındaki rolünü ortaya koymaktadır.

Epigenetik değişikliklerinin bağımlılıktaki rolü giderek artan bir şekilde doğrulanmaktadır. Literatürde uyuşturucu tedavisi gruplarının, uyuşturucu içermeyen kontrollerle karşılaştırmak için iki yönlü tasarımlar kullanılmaktadır ve kötüye kullanılan ilaçlara karşı davranışsal tepkilerdeki bireysel çeşitlilik araştırılmaktadır. Bu çalışmaların bulguları; yaşam tarzı/deneyim, hücre tipi, gelişim/yaşlanma ve cinsiyet gibi çeşitli değişkenlerin yalnızca bağımlılığa yatkınlığa katkıda bulunmadığını, aynı zamanda DNA modifikasyonlarındaki değişikliklerle de güçlü bir şekilde bağlantılı olduğunu göstermektedir. Sonuç olarak, bağımlılık yatkınlığında bireyler arası değişkenlikle ilişkili nörolojik ve davranışsal adaptasyonlardan epigenetik değişiklikler sorumludur (Kaplan ve ark., 2022).

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu tez projesi; *in vivo* ve *in vitro* subkronik opioit bağımlılık modellerinin etkinliğinin karşılaştırılmasına olanak sağlamıştır. Morfin ve nalokson uygulamasının direkt (DNMT genleri) ve dolaylı (miRNA biyogenez yolağı) epigenetik mekanizmaları kontrol eden yollar üzerine etkisi tespit edilmiştir.

Morfin bağımlılığının epigenetik etkilerinin tespit edilmesi ve bu etkilerin bir sonraki nesillere aktarılabilmesinin önemini ve bu konuda yeni tedavi yöntemlerinin geliştirilmesine olan ihtiyacı desteklemektedir.

In vivo bağımlılık modelinde nalokson grubunun bulunmaması önemli bir eksiklik olarak değerlendirilmiştir. Ancak, *in vitro* ve *in vivo* bağımlılık modelinde çalışmaya konu olan genlerin ifadesini genel olarak benzer şekilde etkilediği gözlenmiştir.

Morfin bağımlılığı ve tedavisinin diğer epigenetik modifikasyonlar üzerine etkisinin araştırılmasına ihtiyaç bulunmaktadır.

In vitro modelin etkin bulunması; farklı farmokojik uygulamalar ve opioit bağımlılığın fizyopatolojisinin daha iyi anlaşılmasına katkı sağlaması beklenmektedir. Deney hayvan modellerine olan gereksinime alternatif olarak, sağlayacağı etik ve teknik kolaylıklar nedeniyle translasyonel düzeyde benzer çalışmaların gerçekleştirilmesine olumlu yönde etkisi beklenmektedir.



7. KAYNAKLAR

- Allahverdiyev, O. (2014). *Sıçanlarda morfin ile oluşturulmuş koşullandırılmış yer tercihi testinde vareniklin ve bupropion'un etkilerinin karşılaştırılması*. [Doktora tezi, İstanbul Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı]
- Al-Hasani, R. & Bruchas, M.R. (2011). Molecular mechanisms of opioid receptor-dependent signaling and behavior. *Anesthesiology*, 115(6),1363-81. <https://doi.org/10.1097/ALN.0b013e318238bba6>
- Allouche, S., Noble, F., & Marie, N. (2014). Opioid receptor desensitization: mechanisms and its link to tolerance. *Frontiers in Pharmacology*, 5, 280-300. <https://doi.org/10.3389/fphar.2014.00280>
- Andersen, G., Christrup, L., & Sjøgren, P. (2003). Relationships among morphine metabolism, pain and side effects during long-term treatment: an update. *Journal of Pain and Symptom Management*, 25(1), 74-91. [https://doi.org/10.1016/S0885-3924\(02\)00531-6](https://doi.org/10.1016/S0885-3924(02)00531-6)
- Anier, K., Malinovskaja, K., Aonurm-Helm, A., Zharkovsky, A., & Kalda, A. (2010). DNA methylation regulates cocaine-induced behavioral sensitization in mice. *Neuropsychopharmacology*, 35, 2450–2461. doi:10.1038/npp.2010.128
- Balster, R. L. (1991). Drug abuse potential evaluation in animals. *British Journal of Addiction*, 86(12), 1549-1558. <https://doi.org/10.1111/j.1360-0443.1991.tb01747.x>
- Banerjee, S., Sindberg, G., Wang, F., Meng, J., Sharma, U., et al. (2016). Opioid-induced gut microbial disruption and bile dysregulation leads to gut barrier compromise and sustained systemic inflammation. *Mucosal Immunology*, 9(6), 1418-1428
- Bardo, M. T. (1998). Neuropharmacological mechanisms of drug reward: beyond dopamine in the nucleus accumbens. *Critical Review in Neurobiology*, 12(1-2), 37-67. <https://doi.org/10.1615/critrevneurobiol.v12.i1-2.30>
- Bartel, D. P. (2004). MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*, 116(2), 281-297. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(04\)00045-5](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(04)00045-5)
- Bender, A. M., Clark, M. J., Agius, M. P., Traynor, J. R., & Mosberg, H. I. (2014). Synthesis and evaluation of 4-substituted piperidines and piperazines as balanced affinity μ opioid receptor (MOR) agonist/ δ opioid receptor (DOR) antagonist ligands. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 24(2), 548-551
- Bird, A. (2007). Perceptions of epigenetics. *Nature*, 447(7143), 396-398
- Bodnar, R.J., & Klein, G.E. (2005). Endogenous opiates and behavior: 2004. *Peptides*, 26(12), 2629-711. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2006.07.011>
- Bodnar, R.J. (2016). Endogenous opiates and behavior: 2014. *Peptides*, 75,18-70. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2015.10.009>
- Boeree, C.G. (2009). The Emotional Nervous System. *General Psychology*. <http://webspace.ship.edu/cgboer/limbicsystem.html>
- Boudhraa, Z., Carmona, E., Provencher, D., & Mes-Masson, A. M. (2020). Ran GTPase: a key player in tumor progression and metastasis. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 8, 345. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.00345>
- British Psychological Society (UK). (2008). Drug Misuse: Opioid Detoxification. NICE Clinical Guidelines. 52
- Bruchas, M. R., & Chavkin, C. (2010). Kinase cascades and ligand-directed signaling at the kappa opioid receptor. *Psychopharmacology*, 210(2), 137-147. <https://doi.org/10.1007/s00213-010-1844-2>
- Brunton, L.L., & Parker, K.L. (2011). *Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics* (12th ed.,). China: The McGraw-Hill Companies.
- Bernstein, E., Caudy, A.A., Hammond, S.M., & Hannon, G.J. (2001). Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature*, 409(6818):363-6. <https://doi.org/10.1038/35053110>
- Cadet, J. L., & Jayanthi, S. (2021). Epigenetics of addiction. *Neurochemistry International*, 147, 105069. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2021.105069>

- Caputi, F. F., Carboni, L., Rullo, L., Alessandrini, I., Balzani, E., et al. (2021). An exploratory pilot study of changes in global DNA methylation in patients undergoing major breast surgery under opioid-based general anesthesia. *Frontiers in Pharmacology*, 12, 733577. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.733577>
- Centers for Disease Control and Prevention. (2021). Opioid Overdose. Retrieved from <https://www.cdc.gov/drugoverdose/index.html>
- Chakrabarti, S., Chang, A., Liu, N.J. & Gintzler, A.R. (2016). Chronic opioid treatment augments caveolin-1 scaffolding: relevance to stimulatory μ -opioid receptor adenylyl cyclase signaling. *Journal of Neurochemistry*, 139(5),737-747. <https://doi.org/10.1111/jnc.13852>
- Chen, T., & Li, E. (2006). Establishment and maintenance of DNA methylation patterns in mammals. *Current Topics in Developmental Biology*, 73, 255-285
- Chen, Y. M., He, X. Z., Wang, S. M., & Xia, Y. (2020). δ -Opioid receptors, microRNAs, and neuroinflammation in cerebral ischemia/hypoxia. *Frontiers in Immunology*, 11, 421. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00421>
- Chen, Z. G., Wang, Y. J., Chen, R. S., Geng, F., Gan, C. L., et al. (2021). Ube2b-dependent degradation of DNMT3a relieves a transcriptional brake on opiate-induced synaptic and behavioral plasticity. *Molecular Psychiatry*, 26(4), 1162-1177
- 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>
- Christrup, L.L. (1997). Morphine metabolites. *Acta Anaesthesiologica Scandinavica*, 41(1-2),116-122. <https://doi.org/10.1111/j.1399-6576.1997.tb04625.x>
- Clarke, S.F.J., Dargon, P.I., & Jones, A.L. (2005). Naloxone in opioid poisoning: Walking the tightrope. *Emergency Medicine Journal*. 22(9), 612-616. <https://doi.org/10.1136/emj.2003.009613>
- Çakmak, D., & Evren, C. (2006). Alkol ve madde kullanım bozuklukları. *Anadolu Psikiyatri Dergisi*, 7, 65-70
- Çimen, Y.A. (2020). *Deneysel morfin bağımlılığı modeli oluşturulmuş siçanlarda hipokampus ve hipotalamustaki melatonin reseptörleri gen ifade düzeylerinin araştırılması*. [Yüksek lisans tezi, Necmettin Erbakan Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Fizyoloji Anabilim Dalı]
- Daniels, S. M., Melendez-Peña, C. E., Scarborough, R. J., Daher, A., Christensen, H. S., et al. (2009). Characterization of the TRBP domain required for dicer interaction and function in RNA interference. *BMC Molecular Biology*, 10(1), 1-13.
- De Cesare, D., & Sassone-Corsi, P. (2000). Transcriptional regulation by cyclic AMP-responsive factors. *Progress Nucleic Acid Research and Molecular Biology*, 64, 343-369. [https://doi.org/10.1016/s0079-6603\(00\)64009-6](https://doi.org/10.1016/s0079-6603(00)64009-6)
- Denli, A.M., Tops, B.B., Plasterk, R.H., Ketting, R.F., & Hannon, G.J. (2004). *Nature*, 432(7014), 231-235. <https://doi.org/10.1038/nature03049>
- Demirkapu, M.J. (2014). *Adenozin reseptörlerinin morfin bağımlılığı ve yoksunluğunda nucleus acumbens'teki rolü*. [Tıpta Uzmanlık tezi, Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Dahili Tıp Bilimleri Bölümü, Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı].
- De Vries, T.J. & Shippenberg, T.S. (2002). Neural systems underlying opiate addiction. *Journal of Neuroscience*, 22(9), 3321-3325.
- 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)
- Di Ciano, P., Cardinal, R.N., Cowell, R.A., Little, S.J., & Everitt, B.J. (2001). Differential involvement of NMDA, AMPA/kainate and dopamine receptors in the nucleus accumbens core in the acquisition and performance of pavlovian approach behavior. *Journal of Neuroscience*, 21(23), 9471- 9477. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.21-23-09471.2001>
- Dodge, J. E., Ramsahoye, B. H., Wo, Z. G., Okano, M., & Li, E. (2002). De novo methylation of MMLV provirus in embryonic stem cells: CpG versus non-CpG methylation. *Gene*, 289(1-2), 41-48. [https://doi.org/10.1016/S0378-1119\(02\)00469-9](https://doi.org/10.1016/S0378-1119(02)00469-9)
- Feinberg, A. P. (2018). The key role of epigenetics in human disease prevention and mitigation. *The New England Journal of Medicine*, 378(14), 1323-1334. <https://doi.org/10.1056/nejmra1402513>

- Franken, I.H.A., Booij, J., & van den Brink W. (2005). The role of dopamine in human addiction: from reward to motivated attention. *European Journal of Pharmacology*, 526(1-3),199-206. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2005.09.025>
- Friedman, A., & Nabong, L. (2020). Opioids: pharmacology, physiology, and clinical implications in pain medicine. *Physical Medicine and Rehabilitation Clinics*, 31(2), 289-303. <https://doi.org/10.1016/j.pmr.2020.01.007>
- Furnham, A. (2014). *Gerçekten Bilmeniz Gereken 50 Psikoloji Fikri*. (Çev. S. Ağırürüyen). İstanbul: Domingo Yayınevi.
- García-Pérez, D., López-Bellido, R., Hidalgo, J. M., Rodríguez, R. E., Laorden, M. L., et al. (2015). Morphine regulates Argonaute 2 and TH expression and activity but not miR-133b in midbrain dopaminergic neurons. *Addiction Biology*, 20(1), 104–119. <https://doi.org/10.1111/adb.12083>
- 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>
- Goll, M. G., Kirpekar, F., Maggert, K. A., Yoder, J. A., Hsieh, C. L., et al. (2006). Methylation of tRNA^{Asp} by the DNA methyltransferase homolog Dnmt2. *Science*, 311(5759), 395-398. <https://doi.org/10.1126/science.1120976>
- Gregory, R.I., Chendrimada, T.P., Cooch, N., & Shiekhattar, R. (2005). Human RISC couples microRNA biogenesis and posttranscriptional gene silencing. *Cell*, 123(4), 631-40. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.10.022>
- Gujar, H., Weisenberger, D. J., & Liang, G. (2019). The roles of human DNA methyltransferases and their isoforms in shaping the epigenome. *Genes*, 10(2), 172. <https://doi.org/10.3390/genes10020172>
- Guo, T., Han, Y., Zhang, J., Liu, X., Zhang, X., et al. (2021). Morphine accelerates acute ischemic stroke via GSK3 β /p53-dependent neuronal apoptosis pathway in mice. *Journal of Cellular Physiology*, 236(3),1833-1845. doi: 10.1002/jcp.29948. Epub 2020 Aug 24. PMID: 32839913
- Ha, M., & Kim, V. N. (2014). Regulation of microRNA biogenesis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 15(8), 509-524
- Haines, T. R., Rodenhiser, D. I., & Ainsworth, P. J. (2001). Allele-specific non-CpG methylation of the Nf1 gene during early mouse development. *Developmental Biology*, 240(2), 585-598. <https://doi.org/10.1006/dbio.2001.0504>
- Harris, J. D. (2008). Management of expected and unexpected opioid-related side effects. *The Clinical Journal of Pain*, 24(10), 8-13. <https://doi.org/10.1097/ajp.0b013e31816b58eb>
- Hardman, J.G., Limbird, L.E., & Gilman, A.G. (2001). *Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*, (10. ed). New York: McGraw-Hill. <https://doi.org/10.1036/0071422803>
- Harsing, L.G. (2008). Dopamine and the dopaminergic systems of the brain. In Lajtha A, Vizi ES (eds.). *Handbook of Neurochemistry and Molecular Neurobiology*. Boston, US: Springer. 7(8):165-166.
- Hitit, M., Kurar, M., & Güzeloğlu, A. (2015). MikroRNA biyogenezi. *Atatürk Üniversitesi Veteriner Bilimleri Dergisi*. 10(3), 211-218. <https://doi.org/10.17094/avbd.35776>
- Holden, J. E., Jeong, Y., & Forrest, J. M. (2005). The endogenous opioid system and clinical pain management. *AACN Advanced Critical Care*, 16(3), 291-301. <https://doi.org/10.1097/00044067-200507000-00003>
- Hope, B.T., Nye H.E., Kelz, M.B., Self, D.W., Iadarola, M.J., Nakabeppu, Y., et.al. (1994). Induction of a long-lasting AP-1 complex composed of altered Fos-like proteins in brain by chronic cocaine and other chronic treatments. *Neuron*, 13(5),1235-1244. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(94\)90061-2](https://doi.org/10.1016/0896-6273(94)90061-2)
- Howland, R.D., & Mycek, M.J. (2006). *Lipincott Farmakoloji*. (Çev. F. Onat, 3.bs.). İstanbul: Nobel Tıp Kitapevi.
- Hwang, C. K., Wagley, Y., Law, P. Y., Wei, L. N., & Loh, H. H. (2012). MicroRNAs in opioid pharmacology. *Journal of Neuroimmune Pharmacology*, 7, 808-819.
- Jaenisch, R., & Bird, A. (2003). Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nature Genetics*, 33, 245-254
- James, M. K., Feldman, P. L., Schuster, S. V., Bilotta, J. M., Brackeen, M. F., & Leighton, H. J. (1991). Opioid receptor activity of GI 87084B, a novel ultra-short acting analgesic, in isolated tissues. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 259(2), 712-718

- Jirtle, R. L., & Skinner, M. K. (2007). Environmental epigenomics and disease susceptibility. *Nature Reviews Genetics*, 8(4), 253-262
- Johnson, S.W., & North, R.A. (1992). Opioids excite dopamine neurons by hyperpolarization of local interneurons. *Journal of Neuroscience*, 12(2), 483-488. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.12-02-00483.1992>
- Jones, P. A. (2012). Functions of DNA methylation: islands, start sites, gene bodies and beyond. *Nature Reviews Genetics*, 13(7), 484-492
- Jordan, B., & Devi, L. A. (1998). Molecular mechanisms of opioid receptor signal transduction. *British Journal of Anaesthesia*, 81(1), 12-19
- Kaplan, G., Xu, H., Abreu, K., & Feng, J. (2022). DNA epigenetics in addiction susceptibility. *Frontiers in Genetics*, 13, 806685. <https://doi.org/10.3389/fgene.2022.806685>
- Kaya, E., Akpınar, D. ve Akpınar, H. (2019). Bağımlılığın patofizyolojisi. *Muğla Sıtkı Kocaman Üniversitesi Tıp Dergisi*. 6(3),166-170
- Kayaalp, S.O. (2005). *İlaç kötüye kullanımı ve ilaç bağımlılığı. Tıbbi Farmakoloji*. (11.bs., s. 846-868). Ankara: HacıTepe-Tas Kitapçılık Ltd şti.
- Kayaalp, S.O. ve Uzbay, İ.T. (2009). İlaç kötüye kullanımı ve ilaç bağımlılığı. In: Kayaalp, S.O. (Ed.), KAYAALP Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji. (11. bs., s. 816-836). Ankara: Pelikan Yayıncılık, Feryal Matbaacılık San. ve Tic. Ltd. Şti.
- Kelz, M. B., & Nestler, E. J. (2000). ΔFosB: a molecular switch underlying long-term neural plasticity. *Current Opinion in Neurology*, 13(6), 715-720. <https://doi.org/10.1097/00019052-200012000-00017>
- Kieffer, B. L., & Evans, C. J. (2009). Opioid receptors: from binding sites to visible molecules in vivo. *Neuropsychopharmacology*, 56(1), 205-212. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2008.07.033>
- Kieffer, B. L., & Gaveriaux-Ruff, C. (2002). Exploring the opioid system by gene knockout. *Progress in Neurobiology*, 66(5), 285-306. doi: 10.1016/S0301-0082(02)00003-6
- Koç, H., Camcı, H., Kadiroğlu, A. ve Gür, K. (2006). Seçilmiş bazı haşhaş hatlarının morfin oranları yönünden değerlendirilmesi üzerine bir araştırma. *Bitkisel Araştırma Dergisi*. 1, 31-35
- Koçaker, Z. N. (2021). *Maternal depresyonun mikroRNA biyogenez yolağı üzerine etkisi: sıçan modeli*. [Yüksek lisans tezi, Necmettin Erbakan Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı]
- Koob, G. F. (1996). Hedonic valence, dopamine and motivation. *Molecular Psychiatry*, 1(3), 186-189.
- Koob, G. F., & Le Moal, M. (2008). Addiction and the brain antireward system. *Annual Review of Psychology*, 59, 29-53. doi: 10.1146/annurev.psych.59.103006.093548
- Koob, G. F., & Volkow, N. D. (2010). Neurocircuitry of addiction. *Neuropsychopharmacology*, 35(1), 217-238. doi: 10.1038/npp.2009.110
- Kosten, T. R., & George, T. P. (2002). The neurobiology of opioid dependence: implications for treatment. *Science & Practice Perspectives*, 1(1), 13-20. doi: 10.1151/spp020113
- Lallemant, B., Evrard, A., Combescure, C., Chapuis, H., Chambon, G., et al. (2009). Reference gene selection for head and neck squamous cell carcinoma gene expression studies. *BMC Molecular Biology*, 210, 78. <https://doi.org/10.1186/1471-2199-10-78>
- Lammel, S., Hetzel, A., Häckel, O., Jones, I., Liss, B., & Roeper, J. (2011). Unique properties of mesoprefrontal neurons within a dual mesocorticolimbic dopamine system. *Neuron*, 57(5), 760-773. doi: 10.1016/j.neuron.2007.01.013
- Lande-Diner, L., & Zhang, G. (2019). The role of epigenetics in gene expression and cell development. *Annual Review of Genetics*, 53, 477-498
- Lane-Ladd, S.B., Pineda, J., Boundy, V.A., Pfeuffer, T., Krupinski, J., et al. (1997). CREB (cAMP response element binding protein) in the locus coeruleus: biochemical, physiological and behavioral evidence for a role in opiate dependence. *Journal of Neuroscience*, 17(20), 7890-7901. <https://doi.org/10.1523/jneurosci>
- Langnaese, K., John, R., Schweizer, H., Ebmeyer, U., & Keilhoff, G. (2008). Selection of reference genes for quantitative real-time PCR in a rat asphyxial cardiac arrest model. *BMC Molecular Biology*, 9(53),1-15.
- Lee, Y., Kim, M., Han, J., Yeom, K. H., Lee, S., et al. (2004). MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *The EMBO Journal*, 23(20), 4051-4060

- Lee, R. C., Feinbaum, R. L., & Ambros, V. (1993). The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*, 75(5), 843-854
- Lewis, B. P., Burge, C. B., & Bartel, D. P. (2005). Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell*, 120(1), 15-20
- Li, B., & Reinberg, D. (2011). Chromatin higher-order structures and gene regulation. *Current Opinion in Genetics & Development*, 21(2), 175-186. doi: 10.1016/j.gde.2011.01.021
- Lingford-Hughes, A., Watson, B., Kalk, N., & Reid, A. (2010). Neuropharmacology of addiction and how it informs treatment. *British Medical Bulletin*, 96(1), 93-110. <https://doi.org/10.1093/bmb/ldq032>
- Listos, J., Lupina, M., Tarlarek, S., Mazur, A., Orzelsska-Gorka, J., & Kotlinska, J. (2019). The mechanisms involved in morphine addiction: an overview. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(17), 4302. <https://doi.org/10.3390/ijms20174302>
- Lutz, P. E., Kieffer, B. L., & Oliére, S. (2019). Développement de nouvelles stratégies thérapeutiques ciblant les récepteurs opioïdes [Development of new therapeutic strategies targeting opioid receptors]. *Medicine Sciences*, 35(12), 1016-1022
- Lyko, F. (2018). The DNA methyltransferase family: a versatile toolkit for epigenetic regulation. *Nature Reviews Genetics*, 19(2), 81-92
- Mao, J., & Huang, Y. (2013). Epigenetic basis of opioid analgesia tolerance. *Current Opinion in Anaesthesiology*, 26(5), 540-545
- McBride, W. J., Murphy, J. M., & Ikemoto, S. (1999). Localization of brain reinforcement mechanisms: intracranial self-administration and intracranial place-conditioning studies. *Behavioural Brain Research*, 101(2), 129-152. [https://doi.org/10.1016/S0166-4328\(99\)00022-4](https://doi.org/10.1016/S0166-4328(99)00022-4)
- McPherson, J., Rivero, G., Baptist, M., Llorente, J., & Krasel, C. (2010). Quantitative analysis of G-protein-coupled receptor internalization using β -arrestin coupled to β -lactamase. *Methods in Molecular Biology* (Clifton, NJ), 611, 113-126
- Merikangas, K.R. & McClair, V.L. (2012). Epidemiology of substance use disorders. *Human Genetics*, 131(6), 779-89
- Mochida, S. (2018). Presynaptic calcium channels. *Journal of Neuroscience Research*, 127, 33-44. <https://doi.org/10.1016/j.neures.2017.09.012>
- Mulligan, M. K., DuBose, C., Yue, J., Miles, M. F., Lu, L., et al. (2013). Expression, covariation, and genetic regulation of miRNA Biogenesis genes in brain supports their role in addiction, psychiatric disorders, and disease. *Frontiers in Genetics*, 4, 126. <https://doi.org/10.3389/fgene.2013.0012>
- Muñoa-Hoyos, I., Araolaza, M., Urizar-Arenaza, I., Gianzo, M., Irazusta, J., & Subiran, N. (2021). Sex dependent alteration of epigenetic marks after chronic morphine treatment in mice organs. *Food and Chemical Toxicology*, 152, 112200. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2021.112200>
- National Institute on Drug Abuse. (2021). Drug Addiction Treatment in the United States. Retrieved March 31, 2023, from <https://www.drugabuse.gov/publications/drugfacts/drug-addiction-treatment-united-states>.
- National Institute on Drug Abuse. (2021). Opioid Overdose Crisis. Retrieved from <https://www.drugabuse.gov/drug-topics/opioids/opioid-overdose-crisis>.
- Nestler, E.J. (2001). Molecular basis of long-term plasticity underlying addiction. *Nature Reviews Neuroscience*, 2(2), 119-28.
- Nestler, E.J. (2005). Is there is a common molecular pathway for addiction. *Nature Neuroscience*, 8(11), 1445-1449. <https://doi.org/10.1038/nn1578>
- Nestler, E.J. (2016). Reflections on: a general role for adaptations in G-Proteins and the cyclic AMP system in mediating the chronic actions of morphine and cocaine on neuronal function. *Brain Research*, 1645, 71-74. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2015.12.039>
- Nestler, E.J. & Aghajanian, G.K. (1997). Molecular and cellular basis of addiction. *Science*, 278, 58-63. <https://doi.org/10.1126/science.278.5335.58>
- Nestler, E. J., & Lüscher, C. (2019). The molecular basis of drug addiction: linking epigenetic to synaptic and circuit mechanisms. *Neuron*, 102(1), 48-59. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2019.01.016>

- O'Brien, C.P. (1996). Drug addiction and abuse. In: Hardman, J.G., Limbird, L.E., Molinoff, P.B., Ruddon, R.W., Gilman, A.G (Eds.), *Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics* (pp.557-517). New York: McGraw-Hill.
- Ögel, K. (2010). *Sigara, Alkol ve Madde Kullanım bozuklukları: Tanı, Tedavi ve Önleme* (s. 33-48). İstanbul: Yeniden Yayınları.
- Özmen, O. (2009). *Uyuşturucu ve uyarıcı madde suçları*. [Yüksek lisans tezi, Bahçeşehir Üniversitesi, Sosyal Bilimler Enstitüsü, Kamu Hukuku Anabilim Dalı]
- Pasternak, G. W. & Pan, Y.X. (2013). Mu opioids and their receptors: evolution of a concept. *Pharmacological Reviews*, 27;65(4), 1257-317. <https://doi.org/10.1124%2Fpr.112.007138>
- Penson, R.T., Joel, S.P., Bakhshi, K., Clark, S.J., Langford, R.M. & Slevin, M.L. (2000). Randomized placebo-controlled trial of the activity of the morphine glucuronides. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 68(6), 667-76. <https://doi.org/10.1067/mcp.2000.111934>
- Pradhan, A.A., Befort, K., Nozaki, C., Gavériaux-Ruff, C. & Kieffer, B.L. (2011). The delta opioid receptor: an evolving target for the treatment of brain disorders. *Trends in Pharmacological Science*, 32(10), 581-590. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2011.06.008>
- Preall, J. B., He, Z., Gorra, J. M., & Sontheimer, E. J. (2006). Short interfering RNA strand selection is independent of dsRNA processing polarity during RNAi in Drosophila. *Current Biology*, 16(5), 530-535. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2006.01.061>
- Pryce, K. D., Serafini, R. A., Ramakrishnan, A., Nicolais, A., Giosan, I. M., et al. (2023). Oxycodone withdrawal induces HDAC1/HDAC2-dependent transcriptional maladaptations in the reward pathway in a mouse model of peripheral nerve injury. *Nature Neuroscience*, 26, 1229-1244
- Roberts, R.J. (1984). Fetal and infant intoxication. In: *Drug therapy in infants; pharmacologic principles and clinical experiences* (pp. 332-383). Philadelphia: Saunders.
- Robinson, T. E., & Berridge, K. C. (1993). The neural basis of drug craving: an incentive-sensitization theory of addiction. *Brain Research Reviews*, 18(3), 247-291. [https://doi.org/10.1016/0165-0173\(93\)90013-p](https://doi.org/10.1016/0165-0173(93)90013-p)
- Rosenbaum, D.M., Rasmussen, S.G.F., & Kobilka, B.K. (2009). The structure and function of G-protein-coupled receptors. *Nature*, 459(7245), 356-63
- Rzasa Lynn, R., & Galinkin, J. L. (2018). Naloxone dosage for opioid reversal: current evidence and clinical implications. *Therapeutic Advances in Drug Safety*, 9(1), 63–88. <https://doi.org/10.1177/2042098617744161>
- Salozhin, S. V., Prokhorchuk, E. B., & Georgiev, G. P. (2005). Methylation of DNA-one of the major epigenetic markers. *Biochemistry (Moscow)*, 70, 525-532
- Sargis, R.M. (2021, July 2). *An Overview of the Hypothalamus. Learn about the endocrine system's link to the nervous system*. Endocrine. <https://www.endocrineweb.com/endocrinology/overview-hypothalamus>
- Schaefer, A., Im, H. I., Venø, M. T., Fowler, C. D., Min, A., et al. (2010). Argonaute 2 in dopamine 2 receptor-expressing neurons regulates cocaine addiction. *The Journal of Experimental Medicine*, 207(9), 1843–1851. <https://doi.org/10.1084/jem.20100451>
- Seol, D., Choe, H., Zheng, H., Jang, K., Ramakrishnan, P. S., Lim, T. H., & Martin, J. A. (2011). Selection of reference genes for normalization of quantitative real-time PCR in organ culture of the rat and rabbit intervertebral disc. *BMC Research Notes*, 4(162), 1-8. <https://doi.org/10.1186/1756-0500-4-162>
- Shaham, Y., Rajabi, H., & Stewart, J. (1996). Relapse to heroin seeking in rats under opioid maintenance: the effects of stress, heroin priming, and withdrawal. *Journal of Neuroscience*, 16(5), 1957-63
- Shaywitz, A. J., & Greenberg, M. E. (1999). CREB: a stimulus-induced transcription factor activated by a diverse array of extracellular signals. *Annual Review of Biochemistry*, 68(1), 821-861
- Shi, C., Jin, J., Xu, H., Ma, J., Li, T., et al. (2022). CCR1 enhances SUMOylation of DGCR8 by up-regulating ERK phosphorylation to promote spinal nerve ligation-induced neuropathic pain. *Gene Therapy*, 29(6), 379-389
- Shultz, W. (1997). Dopamine neurons and their role in reward mechanism. *Current Opinion in Neurobiology*, 7(2), 191-197. [https://doi.org/10.1016/s0959-4388\(97\)80007-4](https://doi.org/10.1016/s0959-4388(97)80007-4)
- Spanagel, R., & Weiss, F. (1999). The dopamine hypothesis of reward: past and current status. *Trends in Neurosciences*, 22(11), 521-527. [https://doi.org/10.1016/s0166-2236\(99\)01447-2](https://doi.org/10.1016/s0166-2236(99)01447-2)

- Suetake, I., Shinozaki, F., Miyagawa, J., Takeshima, H., & Tajima, S. (2004). DNMT3L stimulates the DNA methylation activity of Dnmt3a and Dnmt3b through a direct interaction. *Journal of Biological Chemistry*, 279(26), 27816-27823. <https://doi.org/10.1074/jbc.M400181200>
- Szyf, M. (2013). DNA methylation, behavior and early life adversity. *Journal of Genetics and Genomics*, 40(6), 331-338. <https://doi.org/10.1016/j.jgg.2013.06.004>
- The United Nations Office on Drugs and Crime. (2021). World Drug Report Booklet 1: Executive Summary Policy Implications. [Link: unodc.org/res/wdr2021/field/WDR21_Booklet_1.pdf.]
- Takahashi, K. (2014). Influence of bacteria on epigenetic gene control. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 71(6), 1045-1054
- Tapocik, J. D., Ceniccola, K., Mayo, C. L., Schwandt, M. L., Solomon, M., et al. (2016). MicroRNAs are involved in the development of morphine-induced analgesic tolerance and regulate functionally relevant changes in Serpini1. *Frontiers in molecular neuroscience*, 9, 20. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2016.00020>
- Tost, J. (2010). DNA methylation: an introduction to the biology and the disease-associated changes of a promising biomarker. *Molecular Biotechnology*, 44(1), 71-81. <http://doi.org/10.1007/s12033-009-9216-2>
- Townsend, M.C. (2011). *Substance-Related Disorders. Essentials of Psychiatric Mental Health Nursing. Concepts of Care in Evidence-Based Practice*. (5th ed., pp. 267-271). F. A. Devis Company.
- Trigo, J. M., Martín-García, E., Berrendero, F., Robledo, P., & Maldonado, R. (2010). The endogenous opioid system: a common substrate in drug addiction. *Drug and Alcohol Dependence*, 108(3), 183-194. <https://doi.org/10.1016/j.drugalcdep.2009.10.011>
- Thompson, A.A., Liu, W., Chun, E., Katritch, V., Wu, H., et al. (2012). Structure of the nociceptin/orphanin FQ receptor in complex with a peptide mimetic. *Nature*, 485(7398), 395-399. doi: 10.1038/nature11085
- Turner, B. M. (2009). Epigenetic responses to environmental change and their evolutionary implications. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 364(1534), 3403-3418
- Yang, J. S., & Lai, E.C. (2011). Alternative miRNA biogenesis pathways and the interpretation of core miRNA pathway mutants. *Molecular Cell*, 43, 892-903. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2011.07.024>
- Yu, X., Mao, X., Blake, A. D., Li, W. X., & Chang, S. L. (2003). Morphine and endomorphins differentially regulate μ -opioid receptor mRNA in SHSY-5Y human neuroblastoma cells. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 306(2), 447-454. <https://doi.org/10.1124/jpet.103.048694>
- Uzbay, İ.T. (2009). Madde bağımlılığının tarihçesi, tanımı, genel bilgiler ve bağımlılık yapan maddeler. *Türk EczacılarYayını/Meslek İçi Sürekli Eğitim Dergisi*, 21-22, 5-15
- Volkow, N. D., & McLellan, A. T. (2016). Opioid abuse in chronic pain-misconceptions and mitigation strategies. *New England Journal of Medicine*, 374(13), 1253-1263. doi: 10.1056/nejmra1507771
- Volkow, N. D., & Morales, M. (2015). The brain on drugs: from reward to addiction. *Cell*, 162(4), 712-725. doi: 10.1016/j.cell.2015.07.046
- Waldhoer, M., Bartlett, S.E., & Whistler, J.L. (2004). Opioid receptors. *Annual Review of Biochemistry*, 73, 953-90. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.73.011303.073940>
- Weber, J. A., Baxter, D. H., Zhang, S., Huang, D. Y., How Huang, K., et al. (2010). The microRNA spectrum in 12 body fluids. *Clinical Chemistry*, 56(11), 1733-1741. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2010.147405>
- Winter, J., Jung, S., Keller, S., Gregory, R.I., & Diederichs, S. (2009). Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation. *Nature Cell Biology*, 11(3), 228-234. <https://doi.org/10.1038/ncb0309-228>
- Winter, J., Diederichs, S., & Argonaute, P. (2011). The biochemical basis of microRNA targeting efficacy. *Trends in Biochemical Sciences*, 36(2), 79-88
- Wise, R.A., & Rompre, P.P. (1989). Brain dopamine and reward. *Annual Review of Psychology*, 40, 191-225. <https://doi.org/10.1146/annurev.ps.40.020189.001203>
- Wolf, A.R., Valley, R.D., & Fear, D.W. (1988). Bupivacaine for caudal analgesia in infants and children: optimal effective concentration. *Anesthesiology*, 69(1), 102-106. <https://doi.org/10.1097/0000542-198807000-00017>
- Wong, C. C. Y., Caspi, A., Williams, B., Craig, I. W., Houts, R., et al. (2010). A longitudinal study of epigenetic variation in twins. *Epigenetics*, 5(6), 516-526. <https://doi.org/10.4161/epi.5.6.12226>

- World Health Organization. (2006). Community management of opioid overdose. <https://www.who.int/publications/i/item/9789241548816>
- Wu, J., Yang, J., Cho, W. C., & Zheng, Y. (2020). Argonaute proteins: Structural features, functions and emerging roles. *Journal of Advanced Research*, 24, 317–324. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2020.04.017>
- Xu, C., Zheng, H., Loh, H. H., & Law, P. Y. (2015). Morphine promotes astrocyte-preferential differentiation of mouse hippocampal progenitor cells via PKC ϵ -dependent ERK activation and TRBP phosphorylation. *Stem Cells*, 33(9), 2762-2772. <https://doi.org/10.1002/stem.2055>
- Zeng, Y., & Cullen, B. R. (2005). Efficient processing of primary microRNA hairpins by Drosha requires flanking nonstructured RNA sequences. *Journal of Biological Chemistry*, 280(30), 27595-27603. <https://doi.org/10.1074/jbc.m504714200>
- Zhang, Y., Loh, H. H., & Law, P. Y. (2016). Effect of opioid on adult hippocampal neurogenesis. *The Scientific World Journal*, 2016, 2601264. <https://doi.org/10.1155/2016/2601264>
- Zhang, J. J., Jiang, F. Z., Zheng, W., Duan, Y., Jin, S. B., et al. (2020). DNMT3a in the hippocampal CA1 is crucial in the acquisition of morphine self-administration in rats. *Addiction Biology*, 25(2), e12730. <https://doi.org/10.1111/adb.12730>



8. EKLER

EK 1. ETİK KURUL ONAYI



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



Karar Sayısı: 2022 – 045

Karar Tarihi: 25.08.2022

Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Kararı

Necmettin Erbakan Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ABD' den Prof. Dr. Ercan KURAR ve Khadija KHALILOVA' nın sunduğu "**Kısa Süreli Opioid Uygulamasının Epigenetik Mekanizmalar Üzerine Etkisi**" başlıklı tez projesi 8 üyenin katılımı ile değerlendirildi.

Proje için kullanılacak deney hayvanları 2020 – 005 sayılı "Sıçanlardaki Morfin Bağımlılığının Hipokampal Apelin ve Apelin Reseptörü Gen Ekspresyon Düzeylerine Etkisi" başlıklı tez projesinden karşılanacaktır.

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. Mehmet Tuğrul YILMAZ
Başkan

