T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

Tez Yöneticisi
Prof. Dr. Ahmet ULUGÖL

FARELERDE MORFİNE TOLERANS VE BAĞIMLILIK GELİŞİMİNDE HİDROJEN SÜLFÜRÜN ROLÜ

(Yüksek Lisans Tezi)

Zeynep ÇETİN

Referans no: 10117706

EDİRNE-2019

T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

Tez Yöneticisi
Prof. Dr. Ahmet ULUGÖL

FARELERDE MORFİNE TOLERANS VE BAĞIMLILIK GELİŞİMİNDE HİDROJEN SÜLFÜRÜN ROLÜ

(Yüksek Lisans Tezi)

Zeynep ÇETİN

Destekleyen Kurum: TÜBAP- 2016/209

Tez No:

EDİRNE-2019

T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitü Müdürlüğü

ONAY

Trakya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı çerçevesinde ve Prof. Dr. Ahmet ULUGÖL'ün danışmanlığında Yüksek Lisans öğrencisi Zeynep ÇETİN'e ait tez başlığı "Farelerde Morfine Tolerans ve Bağımlılık Gelişiminde Hidrojen Sülfürün Rolü" olarak teslim edilen bu tezin tez savunma sınavı 18.04.2019 tarihinde yapılarak aşağıdaki jüri üyeleri tarafından **"Yüksek Lisans Tezi"** olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Ahmet ULUGÖL
JÜRİ BAŞKANI

Doç. Dr. Coşkun SILAN
ÜYE

Doç. Dr. Özgür GÜNDÜZ
ÜYE

Yukarıdaki imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.

Prof. Dr. Tammam SİPAHİ
Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimimde değerli katkılarından dolayı danışman hocam Prof. Dr. Ahmet ULUGÖL'e ve ayrıca Prof. Dr. Ç. Hakan KARADAĞ, Prof. Dr. Dikmen DÖKMECİ, Doç. Dr. Özgür GÜNDÜZ ve Dr. Öğr. Üyesi Ruhan D. TOPUZ'a, çalışmalarımda yardımlarından dolayı Öğr. Gör. Kübra DUVAN AYDEMİR, Arş. Gör. Pınar TAYFUR, Gökberk YILDIRIM ve Sinem YILMAZ'a, daima beni destekleyen aileme ve projeyi destekleyen TÜBAP'a teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

GİRİŞ VE AMAÇ 1
GENEL BİLGİLER 3
AĞRI 3
NOSİSEPSİYON 3
PRİMER AFERENT İLETİM 4
AĞRI SINIFLAMASI 5
DORSAL BOYNUZ NÖRONAL SİSTEMİ 6
AĞRI YOLAKLARI 7
MORFİN 8
HİDROJEN SÜLFÜR 12
GEREÇ VE YÖNTEMLER 19
BULGULAR 32
TARTIŞMA 44
SONUÇLAR 49
ÖZET 51
SUMMARY 53
KAYNAKLAR 55
ŞEKİLLER LİSTESİ 67
ÖZGEÇMİŞ 70
EKLER

SİMGE VE KISALTMALAR

CBS : Sistatyonin-*β*-sentaz

CSE : Sistatyonin-*γ*-liyaz

cAMP : Siklik adenozin monofosfat

HA : Hidroksilamin

H_2S : Hidrojen sülfür

İ.p. : İntraperitoneal

MOE : Maksimal olası etki

3-MST : 3-merkaptopirüvat sülfürtransferaz

NaHS : Sodyum hidrojen sülfür

NMDA : N-metil-D-aspartat

NO : Nitrik oksit

PAG : Propargilglisin

PKA : Protein kinaz A

S.k. : Subkutan

TRP : Transient receptor potential

TRPA1 : Transient receptor potential ankrin-1

TRPV1 : Transient receptor potential vanilloid-1

GİRİŞ VE AMAÇ

Ağrı, oluşmuş ya da devam etmekte olan doku hasarından korunmaya karşı vücudun gösterdiği fizyolojik bir savunma mekanizmasıdır. Bununla birlikte özellikle kronik ağrı; yaşam kalitesini, üretkenliği ve iyi olma halini olumsuz etkileyen ve altında yatan nedenler açısından karmaşık olan bir deneyimdir. Bu nedenlerle dünya genelinde önemli sağlık sorunlarından biri olan ağrı, klinik tıp çalışmaları içerisinde kontrolü ve tedavisi üzerine yoğun çalışılan bir olgudur. Önemli analjezik ilaç grupları içerisinde yer alan non-steroid antiinflamatuvar ilaçlar (NSAİİ), çoğunlukla inflamasyonun olduğu bölgenin akut tedavisinde ve yüzeysel yapıların orta ve hafif ağrılarında kullanılmaktadır. Ancak şiddetli veya kronik ağrının tedavisinde yetersiz kalmaktadırlar. Opioid ilaçlar, şiddetli ağrılarda daha etkindirler. Fakat güçlü analjezik etkinliklerine karşın, kronik kullanımları tolerans ve bağımlılığın gelişmesine yol açar (1-3). Opioidlere bağımlılık ve tolerans gelişiminin moleküler temelinin ve mekanizmalarının aydınlatılabilmesi, bu ilaçların ağrı tedavisinde çok daha etkin olarak kullanılmaları açısından büyük önem taşımaktadır. Ayrıca opioid benzeri yeni ilaçların geliştirilmesinin önünü açabilir.

Hidrojen sülfür (H_2S) ağrı oluşumu mekanizmalarında rol aldığı gösterilmiş olan endojen bir gaz mediyatördür (4-6). Vücutta başlıca sistatyonin-*β*-sentaz (cystathionine *beta* syntase, CBS) ve sistatyonin-*γ*-liyaz (cystathionine gamma lyas; CSE) enzimleri tarafından, *L*-sistein amino asidinden sentezi gerçekleşmektedir. CBS başlıca beyin dokusunda, CSE ise kalp, karaciğer, böbrek, ileum ve lenfositler gibi

pek çok hücre ve dokuda H_2S oluşumunu sağlayan enzimlerdir. Endojen H_2S'nin üretiminin azaltılmasının antinosiseptif etkinlik oluşturduğu çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir. Bu nedenle H_2S, nosiseptif ve nöropatik ağrı tedavisinde dikkati üzerine çeken bir mediyatördür (5-9). Nöropatik ağrı oluşum mekanizmaları ile morfine tolerans ve bağımlılık oluşması arasında benzerlik olduğu bilinmektedir. H_2S'nin TRP (transient receptor potential), $Ca_v3.2$ kanalları üzerinden nosiseptif etkiye katkısı olduğu ve morfin tolerans-bağımlılığında bu kanalların da rol oynadığı düşünülmektedir. Endojen H_2S'nin üretiminin azaltılmasının morfine tolerans ve bağımlılık oluşması üzerine etkisi olabilir (10-14).

Bu verilerden yola çıkarak çalışmamızda;

Deney hayvanlarında morfin tolerans ve bağımlılığı oluşturarak, tolerans ve bağımlılığın gelişiminin çeşitli zamanlarında beyin ve omurilik H_2S düzeylerindeki değişimi tespit etmeyi ve H_2S'nin endojen olarak üretiminin inhibe edilmesinin tolerans ve bağımlılık oluşumu üzerine etkisinin olup olmadığını belirlemeyi amaçladık.

Çalışmamız morfine tolerans ve bağımlılığının oluşum mekanizmasının açıklanmasına katkı sağlayabilir, eğer olumlu sonuç alınırsa tolerans ve bağımlılık gelişmeyen yeni ilaçların üretilmesine öncülük edebilir.

GENEL BİLGİLER

AĞRI

Ağrı, koruyucu bir mekanizma olmakla birlikte uzun süre devam ettiğinde yaşam kalitesini olumsuz olarak etkileyen bir duyudur.

Uluslararası Ağrı Araştırmaları Teşkilatı (International Association for the Study of Pain / IASP) tarafından yapılan en güncel tanıma göre ağrı; “var olan veya olası doku hasarına eşlik eden veya bu hasar ile tanımlanabilen, hoşa gitmeyen duysal ve emosyonel deneyimdir” şeklinde tanımlanmaktadır (15-17). Bu tanıma göre, ağrı özneldir ve kişiden kişiye değişebildiği gibi, aynı kişide değişik zamanlarda da değişkenlik gösterebilmektedir (15,18). Ağrı, duyusal bir uyarının doğrudan ifadesi değildir, beynin çeşitli nöral sinyalleri tarafından ayrıntılı işlemlerin bir ürünüdür.

NOSİSEPSİYON

Nosisepsiyon, "noci" (Latince zarar, zedelenme) sözcüğünden türetilen bir terimdir ve travmatik, zarar verici veya ağrılı uyaranlara nöral yanıtı belirler. Duyusal reseptörlerden belirli aferent sinyallerin zararlı olarak algılanmasını kapsayan bir olaydır (19).

Nosiseptörler, cilt, cilt altı, periost, eklemler, kaslar, viseral dokularda bulunan ve mekanik, kimyasal, termal uyarıları algılayan reseptörlerdir. Periferde bulunan bu özelleşmiş sinir uçları olarak tanımlanan nosiseptörler tarafından doku hasarının alınıp, santral sinir sistemine götürülmesi ve burada belirli nöral yapılarda

bütünleştirilerek zararlı durumun algılanması ve bu duruma uygun biyolojik, fizyolojik, ve psikolojik vb. önlemlerin harekete geçirilmesidir. Nosisepsiyon, genellikle ağrı ile birlikte aynı durumu anlatmada kullanılır fakat birbirinden farklıdırlar. Tüm nosisepsiyonlar ağrıyı oluşturur fakat tüm ağrılar nosisepsiyon sonucu oluşmaz.

PRİMER AFERENT İLETİM

Uyarıların algılanmasını sağlayan derideki duyusal sinir lifleri; iletim hızına ve miyelinli olup olmamalarına göre üç farklı şekilde kategorize edilirler Bunlar. büyük çapa sahip, hızlı iletim yapan (30-70 m/sn) miyelinli sinir lifleri (Aβ), yavaş iletim (5-30 m/sn) yapan miyelinli sinir lifleri (Aδ) ve küçük çaplı, iletim hızı oldukça düşük olan miyelinsiz sinir lifleridir (C) (19,20). Aβ sinir lifi, derideki zararsız uyaranlara yanıt verirken, dokuyu tehdit veya zarar veren termal, mekanik ve kimyasal uyarılara Aδ ve C lifleri seçici olarak yanıt verir (21).

Nosiseptif primer aferent sinir liflerinin terminalleri, zararlı çevresel uyaranları elektrik sinyallerine (reseptör potansiyeli) dönüştüren çeşitli tipte iyon kanalı reseptörleri bulundurur. Bu konuda en bilindik protein yapılar geçici reseptör potansiyeli sınıfı olan TRP reseptörleridir (22). TRP kanalları seçici olmayan katyon kanallarıdır ancak kalsiyum (Ca^{2+})'a karşı duyarlılığı oldukça yüksektir.

Geçici reseptör potansiyel vanilloid-1 (TRPV1) reseptörü temelde periferik primer aferent nöronlar ve dorsal kök ganglionlarda bulunsa da, antinosiseptif inici yolağa ait spinal ve supraspinal yapılarda da eksprese edilir (23-25). Acı biberde bulunan kapsaisin, zararlı ısı (>43°C), düşük pH, oksidatif stres ürünleri bu kanalı aktive eder (25,26). Periferik ve merkezi sinir uçlarından P maddesi ve kalsitonin gen ilişkili peptid (CGRP) gibi inflamatuar nöropeptidlerin salıverilmesi TRPV1'in aktive olmasına yol açarak nörojenik inflamasyon ve ağrı oluşumuna sebep olur (27,28). TRPV1'in ağrı duyusunun taşınması ve belirlenmesinde rol alan duyusal nöronları uyarmasındaki rolü çok sayıda çalışmada ele alınmış ve bu kanalların nosiseptif ve inflamatuvar ağrıda önemli düzenleyiciler olduğu gösterilmiştir. TRPV1 geni silinmiş (knockout) fareler üzerinde yapılan deneysel bir inflamasyon modelinde, termal hiperaljezinin gelişmediği gösterilmiştir (29,30). Ayrıca, birçok TRPV1 antagonistinin iltihaplanma ile bağlantılı termal hiperaljeziyi hafiflettiği rapor edilmiştir (28).

Geçici reseptör potansiyel ankrin-1 (TRPA1)'in, doku yaralanması ile ortaya çıkan tahriş edici kimyasallar (reaktif azot türleri, reaktif karbonil türleri), oksidatif

stres ürünleri ve soğuk tarafından aktive edildiğini gösteren çalışmalar bulunmaktadır (31,32). Bundan dolayı duyu nöronları üzerinde bulunan TRPA1 kanallarının, nosisepsiyonun kemosensörleri olarak önemli olduğu düşünülmektedir. Deneysel hayvan çalışmalarında, TRPA1'in bloke edilmesi, birçok patofizyolojik ağrı olayında etkili bir şekilde ağrı duyusunu azaltmıştır (22).

AĞRI SINIFLAMASI

Ağrı, başlama sürelerine, mekanizmalarına, etiyolojik faktörlere veya kaynaklandığı bölgeye göre dört şekilde sınıflandırılabilmektedir. (16).

1. Süreye Göre

a) Akut b) Kronik

2. Nörofizyolojik Mekanizmaya Göre

a) Nosiseptif b) Somatik c) Viseral d) Nöropatik e) Psikojenik

3. Etiyolojiye Göre

a) Kanser b) Postherpetik nevralji c) Artrit ağrısı vb.

4. Bölgeye Göre

a) Baş ağrısı b) Yüz ağrısı c) Bel ağrısı d) Pelvik ağrı vb.

Nosiseptif Ağrı

Nosiseptörler, mekanik, termal ve kimyasal olmak üzere üç zararlı uyaran tarafından uyarılan ve doku hasarını tespit etmek için periferde bulunan özelleşmiş yapılardır (20). Nosiseptif ağrı, nosiseptörler tarafından algılanan bu zararlı uyarıların üst merkezlere iletilerek uygun yanıtın verildiği ağrı türüdür. Nosiseptif ağrının iletiminde miyelinli Aδ ve miyelinsiz C sinir lifleri rol alır. Ağrının kısa süren kesici, batıcı komponenti miyelinli Aδ lifleri tarafından iletilirken, uzun süren zonklayıcı, yakıcı kısmı ise miyelinsiz C lifleri tarafından santral sinir sistemine iletilir (15).

Nöropatik Ağrı

Nöropatik ağrı, periferik lifler (Aβ, Aδ ve C lifleri) ve merkezi nöronlar dahil olmak üzere somatosensör sistemin bir lezyonu veya hastalığından kaynaklanır. Zararlı ve zararsız uyaranlara tepkiler patolojik olarak çoğalır ve buna eş zamanlı olarak ağrı kendiliğinden ortaya çıkar (33,34). Patofizyolojisi henüz tam olarak

aydınlatılamamış olmakla birlikte kaynaklandığı bölgeye göre periferik ve santral olarak ikiye ayrılır. Periferik nöropatik ağrıya, periferik sinirleri etkileyen hastalık veya inflamatuvar durumlar olan postherpetik nevralji, diyabetik nöropati, hayalet uzuv (fantom) ağrısı ve diğer sinir zedelenmeleri; santral nöropatik ağrıya ise multipl skleroz (MS), omurilik hasarı ve inme sonrası ağrılar örnek verilebilir (34-36).

Eksitatör ve inhibitör somatosensör sinyalleme arasındaki dengesizlik, iyon kanallarındaki değişiklikler ve merkezi sinir sistemindeki ağrı mesajlarının modüle edilmesindeki değişkenliklerin tümü nöropatik ağrıya neden olmaktadır (34).

Sinir hasarını takip eden süreçte bir takım moleküler olaylar kaskatı gerçekleşmektedir. Hasar sonucu ortaya çıkan kimyasal maddeler periferde nosisepsiyona karşı ağrı eşik değerini düşürmekte ve spontan deşarjların oluşmasına yol açmaktadır. Hasar görmüş sinir ile innerve olan vücut alanında çeşitli değişiklikler ortaya çıkabilir. Benzer değişiklikler aferent liflerde, arka kök gangliyonlarında da oluşup ektopik uyarı alanları meydana getirebilirler. Bu ektopik uyarı alanları komşu dokuları etkileyerek nöropatik hastalarla görülen belirgin klinik semptomlar olan allodini (normalde ağrılı olmayan bir uyarana verilen ağrı yanıtı) ve hiperaljezi (normal olarak ağrılı uyarana karşı verilen artırılmış ağrı yanıtı) oluşumuna yol açarlar (37-39).

DORSAL BOYNUZ NÖRONAL SİSTEMİ

Omurilik arka boynuzunda birinci duyusal ve ikinci duyusal nöron arasında sinaptik iletiyi modüle eden ara nöronlar bulunmaktadır. Bu nöronlar inhibitör ya da eksitatör özellikte olabilirler. Omurilik arka boynuzu, Rexed tarafından benzer hücreleri içeren 10 laminaya ayrılmıştır. Bu laminalardan özellikle lamina I, II ve V katmanları ağrı duyusunun iletilmesi ve modülasyonunun gerçekleştiği bölgelerdir. Ağrı iletiminde rol oynayan Aδ ve C primer sinir lifleri lamina I (marjinal tabaka) ve lamina II (substantia gelatinosa)'de sinaps yaparak sonlanırlar. Bazı Aδ liflerinin uzantıları ise daha derinlerde lamina V hücrelerine ulaşırlar (19,40). Lamina II'de bulunan esas olarak GABA (gama aminobütirik asit) salgılayan çok sayıda inhibitör ara nöronlar projeksiyon nöronlarını modüle etmede önemli rol oynarlar. Aynı zamanda bu tabaka, yüksek konsantrasyonlarda P maddesi ve opioid reseptörüne sahiptir (41). Lamina V, Aδ ve C lifleri ile ileti alan çok sayıda projeksiyon hücresi içerir. Hücrelerin önemli bir kısmını geniş dinamik alan (Wide dynamic range, WDR)

nöronları oluşturur. Bunlar, hem zararlı hem de zararsız uyaranlara karşı duyarlı olan nöronlardır. Bu alanı çevreleyen bölgenin uyarılması, WDR nöronunun inhibisyonuna neden olur (15,19).

Kolesistokinin, kalsitonin gen ilişkili peptid (CGRP), P maddesi ve nörokinin-A gibi nöropeptitler ve glutamat gibi nörotransmiterler ağrı uyarısının iletilmesinde görev alırlar. Glutamat, Aδ hızlı ağrı sinir liflerinin sonlanmalarından salıverilen eksitatör özellikte olan bir amino asittir. Glutamat iyonotropik reseptörleri yoluyla kısa süreli, metabotropik özellikteki reseptörleri olan NMDA (N-metil-D-aspartat) reseptörlerini uyararak uzun süreli depolarizasyon yapabilir. Nöropeptidler, C liflerinden salıverilmeleri ile omuriliğe ağrı duyusunun iletilmesini ve bu duyunun devamlılığını sağlamakta etkindirler (40,42).

AĞRI YOLAKLARI

Ağrı yolakları, çıkıcı ve inici yolaklar olmak üzere 2 başlık altında incelenebilir.

Çıkıcı Yolaklar

Projeksiyon nöronları olarak da adlandırılan omurilik arka boynuzdan başlayan ikinci duyusal nöronlar çeşitli yolaklar ile supraspinal bölgelere ulaşırlar. Bu yolaklar omurilik içerisinde lateral ve anterior kadranda yerleşen spinotalamik, spinoretiküler, spinomezensefalik yolaklardır.

Lamina I, IV-VI'da yerleşen projeksiyon nöronları ağrı, sıcaklık ve derin dokunma gibi sinyalleri birinci duyusal nörondan alarak spinotalamik yolak aracılığıyla talamusun ventral posterolateral bölgesine iletirler. Beyin sapından geçerken mezensefolan hizasında periakuaduktal gri maddeye yan dallar verebilirler. Talamusdan başlayan üçüncü duyusal nöron kortekse giderek postsentral gyrus'ta sonlanır. Ağrının yer, şiddet ve zaman gibi ayırt ettirici boyutlarının algılanmasını sağlar (20,43-45).

Spinoretiküler yolak, omurilikte ventrolateral kanal boyunca spinotalamik yolak ile birlikte ilerler. Esas olarak, beyin sapının alt kısmında yer alan retiküler oluşumlarda sonlanır. Bu sistem, hipotalamusu ve limbik sistemi de uyarır. Ağrının algılanmasından ziyade ağrıya verilen afektif (duygudurumla ilgili) ve otonomik reaksiyonları harekete geçirmede işlev görür (20).

Spinomezensefalik yolak, arka boynuz lamina I ve V'teki nosiseptif projeksiyon nöronlarını içerir. Mezensefalik periakuaduktal gri maddeye kadar yükselir. Burada enkefalinerjik nöronlar vardır ve burası antinosiseptif inici yolakların uyarıldığı en önemli bölgelerden biridir (40).

İnici Yolaklar

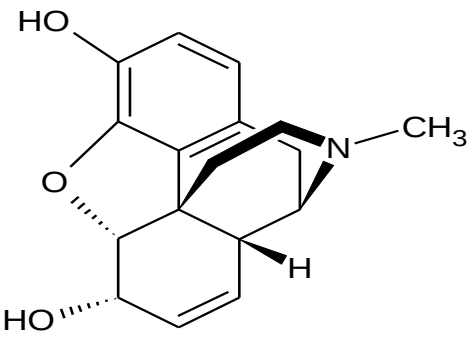
Ağrı duyusu, noradrenalin (NA), serotonin (5-HT), dinorfin ve β endorfin gibi endojen opioidler yoluyla modifiye edilmektedir. İnici yolaklar nosiseptif bilginin projeksiyon nöronlarından supraspinal ağrı merkezlerine iletimini önemli ölçüde değiştirirler (46,47).

İnici yolaklar beyin sapı ve orta beyin dahil korteks'ten medulla'ya kadar uzanan çok sayıda beyin alanında yerleşmişlerdir (48,49). Serebral korteks (anterior singulat, frontal ve pariyetal loblar), hipotalamus, periakuaduktal gri madde, parabrakiyal nükleus, rostral ventrolateral medulla (RVM) ve noradrenerjik hücre gruplarından A5, A6 (lokus seruleus), A7 (subseruleus) dahil çeşitli bölgeler ağrı modülasyonunda önemli rol oynayan inici sistemlerdir (46,49).

MORFİN

Opioid analjezikler grubunda yer alan başlıca ilaçtır. Morfinin kaynağı, haşhaş bitkisinin yaş meyve kapsülünün çizilmesiyle ortaya çıkan özüt olan (halk arasında afyon sakızı) opium'dur (afyon). Opium için de çok sayıda alkaloid bulunur. Bunlar için de en önemlisi %8-15 oranında bulunan ve fenantren türevi olan morfin'dir.

Morfin doğal bir opioid analjeziktir. Morfin teriminin kökeni "morpheus"dan (uyku tanrısı) gelmektedir. Morfin hidroklorür veya sülfat tuzu şeklinde kullanılır (45).



Şekil 1. Morfinin kimyasal yapısı (3,6-dihidroksi-4,5-epoksi-17-metilmorfinan-7-en, $C_{17}H_{19}NO_3$)

Farmakokinetiği

Morfin oral yoldan alındığında gastrointestinal kanaldan hızlı ve tam olarak emilmesine rağmen, ilk geçişte eliminasyona uğradığı için biyoyararlanımı oldukça düşüktür (%15-65). Bundan dolayı daha çok intravenöz (i.v.), intramüsküler (i.m.) ve subkutan (s.k.) olarak uygulanır. Bu yollardan alımı gerçekleştiğinde analjezik etkisi 20 dakikada başlar ve ortalama 90 dakikada maksimuma erişir. Düşük oranda plazma proteinlerine bağlanır. Morfin, karaciğerde glukuronik asitle konjuge edilir ve idrar yoluyla atılır (45).

Farmakolojik Etkileri

Morfinin en önemli terapötik etkisi analjezi sağlamasıdır. Ağrı algılama eşiğini yükseltir, ağrı duyusunu modüle eder (ağrıyı algılamalarına rağmen bundan rahatsızlık duymamaları), ağrıya karşı olan reaksiyonları azaltır. Künt ve kronik ağrılara daha etkili olmakla birlikte, yeterli dozda verilirse batıcı ve intermitan ağrılara da oldukça etkilidir. Morfin bulbustaki öksürük merkezini baskılayarak antitusif etki oluşturur. Gözde miyozis oluşumuna sebep olur, bu etkiye çok az tolerans gelişir. Medulla oblongata bölgesinde yer alan kusma merkezini ve kemoreseptör triger zon'u uyararak bulantı ve kusmaya yol açar.

Etki Mekanizmaları

Opioidler beyin ve omurilikte bulunan spesifik G proteinine bağlı reseptörlerine bağlanarak analjezi oluştururlar. Bununla birlikte bazı etkilerine periferik duyusal sinir uçları üzerindeki opioid reseptörleri aracılık edebilir. Opioid analjezinin periferik mekanizmaları, santral etkili opioidlerin ve steroid olmayan antiinflamatuvar ilaçların yan etkilerini önleyerek ağrı tedavisine cazip bir yaklaşım sunabilir (45,50).

Opioid resetörleri mü (μ), delta (δ), kappa (κ) ve yakın zamanda bulunan nosiseptin/orfanin FQ reseptörleri (NOP) olmak üzere dört sınıfa ayrılır (51,52). Opioid reseptörleri G proteiniyle kenetli reseptör ailesine dahildir. İkinci haberciler yoluyla iyon kapılı kanalları etkileyerek hücre içi Ca^{2+} düzeyini modüle eder ve protein fosforilasyonunu değiştirir.

Nalokson tüm opioid reseptörlerinin antagonisttir (45,53). μ opioid reseptörü (MOR), özellikle omurilik arka boynuz da eskprese edilir.

Morfin analjezik etkisini, ağrı yolaklarını hem spinal hem de supraspinal düzeyde etkileyerek oluşturur. Morfin nosiseptif primer aferent nöronların presinaptik uçlarında bulunan opioid reseptörlerine bağlanarak hücre içine Ca^{2+} girişini engeller. Böylece eksitatör bir amino asit olan glutamat'ın ve bununla birlikte noradrenalin, asetilkolin, serotonin ve P maddesi gibi nörotransmiterlerin salıverilmesini azaltır. Postsinaptik nöronlarda ise morfin K^+ kanallarını açarak inhibitör postsinaptik potansiyel oluşturur. Bu iki olayın ortak sonucu olarak morfin spinal ağrı iletimini engellemektedir (54).

Supraspinal düzeydeki analjezik etkisinde, beyin sapı düzeyindeki opioid reseptörleri aracılık eder. Ayrıca kısmen talamus'taki nöronların ve diğer subkortikal yapıların da supraspinal analjeziye katkısı bulunmaktadır (45).

Morfine Tolerans ve Bağımlılık

Tekrarlanan terapötik dozlar sonucunda opioidlerin analjezik etkisinde meydana gelen azalmaya opioid toleransı denilir. Aynı terapötik etkiyi oluşturmak için dozu arttırmak gerekir. Morfin ve diğer MOR agonistleri en güçlü analjeziklerdir. Fakat bu ilaçların uzun süreli kullanımı çeşitli yan etkilerinin yanı sıra fiziksel bağımlılık ve analjezik etkisine tolerans gelişimine sebep olmaktadır (13,55,56). Opioidlerin analjezik etkisine tolerans gelişmesi kronik ağrının tedavisinde büyük zorluklar yaratmaktadır (57,58). Morfin toleransı, metabolizmasının artmasına bağlı biyokimyasal bir tolerans değil, reseptör duyarlılığının ve sayısının azalmasına bağlı farmakodinamik bir toleranstır (45).

Morfin toleransı ile birlikte gelişen bir diğer etki de bağımlılıktır. Bağımlılık, ilacın kesilmesi durumunda veya antagonist uygulanması durumunda çekilme veya yoksunluk sendromu görülmesiyle karakterizedir. Bağımlılarda morfin'in aniden kesilmesi yaklaşık 12 saat sonra başlayan lakrimasyon, terleme ve esneme, diyare, irritabilite, tremor, midriyazis, taşikardi, kan basıncında artma, ciltte kaz derisi görünüşü, bulantı-kusma, erkekte ejakülasyon ve kadında orgazm benzeri belirtilerle seyreden yoksunluk (abstinens) sendromuna yol açar. Morfin bağımlılarına nalokson verilirse yoksunluk belirtileri çok daha hızlı (1-2 dk) ortaya çıkar, fakat oldukça kısa (ortalama 30 dk) sürer (45).

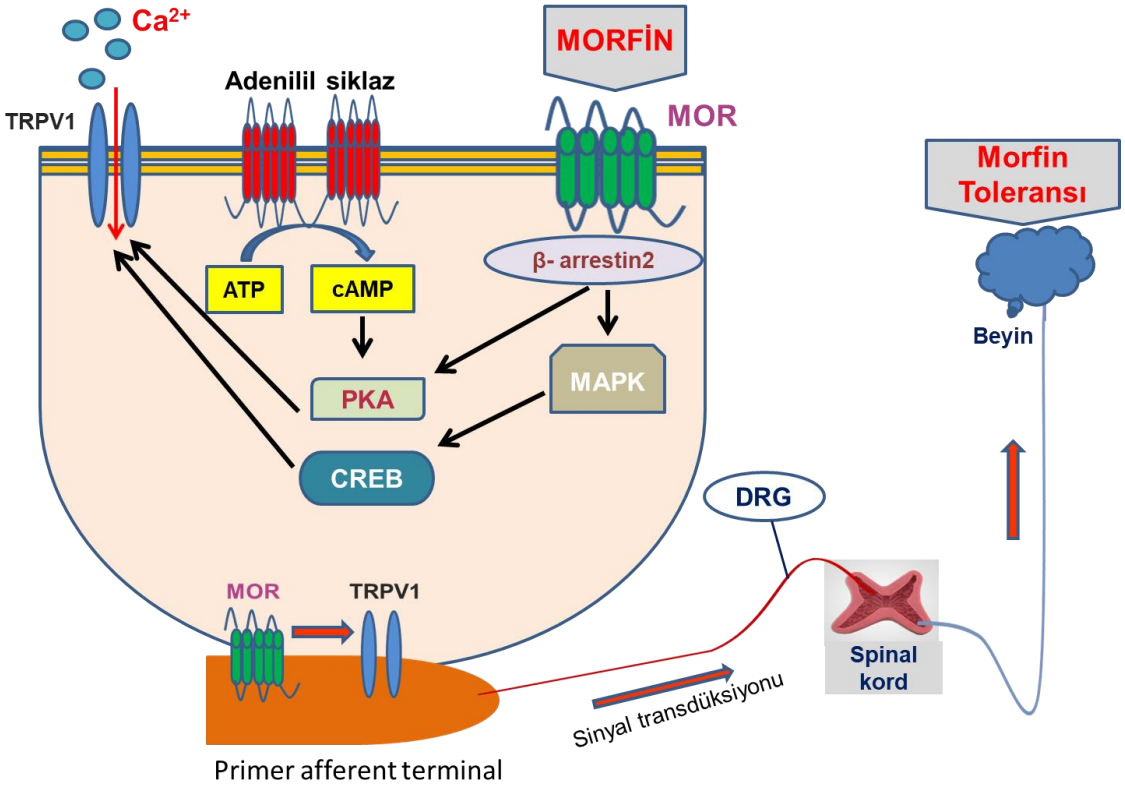
Opioidlere tolerans ve bağımlılık gelişiminde rol oynadığı düşünülen mekanizmalar; opioid reseptör desensitizasyonu, reseptör down-regülasyonu,

reseptör afinitesindeki değişiklikler, reseptörlerin internalizasyonu, cAMP transdüksiyon sisteminin up-regülasyonu ve sinyal iletim basamaklarındaki değişikliklerdir (56,59). Morfin tolerans ve bağımlılık gelişiminde, serotonin, noradrenalin, dopamin, GABA, benzodiazepin, adenozin, eksitatör amino asidler, nitrik oksit (NO), asetilkolin, oksitosin ve vazopressin gibi nörotransmiterler ve nöromodülatörler önemli bir rol oynarlar (60). Morfin'in kronik kullanımı beyinde ve omurilik'te aminoasit yapılı bir nörotransmiter olan glutamat seviyesini arttırmaktadır. Bu artış tolerans, bağımlılık ve yoksunluk sendromu ile ilişkilidir (61-63). Nöronal Ca^{2+} kanallarının opioid analjezik toleransının gelişiminde önemli bir rol oynadığı bildirilmiştir (64). Yapılan çalışmalarda Ca^{2+} kanal blokörlerinin morfin toleransını ve bağımlılığını azalttığı ve opioidlerin antinosiseptif etkilerini arttırdığı gösterilmiştir (65,66).

Opioidler tarafından μ-opioid reseptörlerinin aktivasyonu endositoz sonrası plazma membranına reseptör geri dönüşümü, toleransın gelişiminde etkili başka bir hipotezdir. Morfin'e opioid reseptörlerinin duyarsızlaşması ve morfin'in reseptör endositozunu indüklemede başarısız oluşundan kaynaklanan kompansatuvar değişikliklerin morfin tolerans ve bağımlılığının gelişmesine aracılık ettiği bildirilmiştir (67).

Uzun süreli morfin kullanımı, siyatik sinir, dorsal kök gangliyonu ve omurilikte TRPV1 kanallarının ekspresyonunu arttırmaktadır (13,68,69). Morfin'in MOR reseptörüne bağlanmasını takiben aktive edilen sinyal yolakları TRPV1 kanalının aktivasyonuna neden olmaktadır (Şekil 2).

Kronik morfin maruziyeti sonrası oluşan TRPV1 aktivasyonu kısmen de olsa morfin tolerans ve bağımlılığının gelişiminden sorumludur. cAMP/PKA ve MAPK gibi bir dizi birbiriyle ilişkili sinyal yolu bu sürece katılır ve bu yollar üzerinde yapılan araştırmalar analjezik toleransı ve opioid bağımlılığını yöneten mekanizmaları tanımlamaya yardımcı olmaktadır. Yapılan çalışmalar, morfin toleransı, bağımlılık ve morfin'e bağlı antinosisepsiyonda TRPV1'in önemini göstermiştir (68,70). Morfin tedavisi ile TRPV1 antagonistlerinin birlikte kullanılması, morfin toleransı ve bağımlılığının gelişimini azaltabilir (13).



Şekil 2. Morfin kaynaklı antinosisepsiyon, tolerans ve bağımlılıkta TRPV1 aktivasyonunun sinyal iletimi. (Yanju ve ark.'dan (13) uyarlanmıştır).

MOR; μ-opioid reseptör, TPRPV1: Geçici reseptör potansiyel vanilloid-1, ATP: Adenozin trifosfat, cAMP: Siklik adenozin monofosfat, PKA: Protein kinaz, MAPK: Mitogen aktive edici kinaz.

HİDROJEN SÜLFÜR

Hidrojen Sülfürün Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri

Hidrojen sülfür (H_2S), çürük yumurta kokusunda olan renksiz, yanıcı bir gazdır. Kaynama noktası -60,3 °C, erime noktası -82,3 °C'dir (71). Su ve alkolde çözünür. Hidrojen sülfür, suyun sülfür analoğu olup, moleküler ağırlığı 34,08'dir. Ancak suyun aksine moleküller arası güçler zayıf olduğu için, oda sıcaklığı ve basıncında gaz formunda bulunur (72).

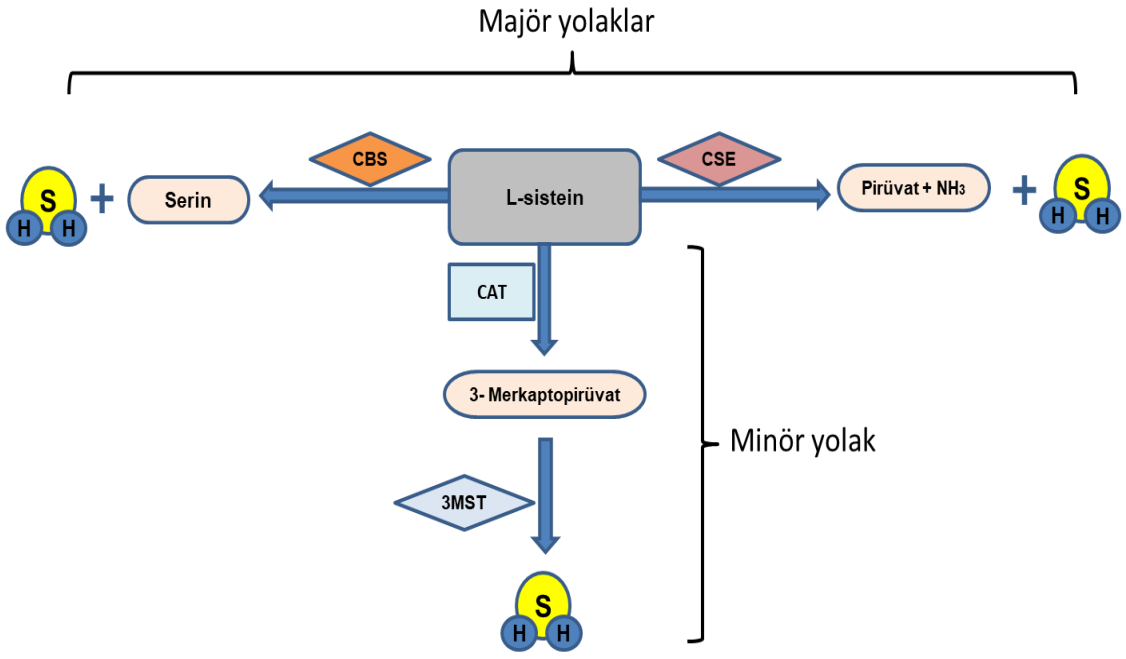
Memeli vücudunda, fizyolojik koşullar altında pH:7,4'de H_2S, in vivo olarak iki tür forma sahiptir. Üçte biri gaz formunda ayrışmamış olarak, üçte ikisi ise fizyolojik donörlerinden biri sodyum hidrosülfür (NaHS) olarak bulunur. NaHS, sodyum iyonu (Na^+) ve hidrosülfür iyonuna (HS^-) ayrışır, daha sonra hidrojen iyonu (H^+) ile bağ

yaparak H_2S bileşiğini oluşturur. Yağda çözünebilir olması nedeniyle hücre membranlarını kolaylıkla geçer (72-75).

Hidrojen Sülfürün Biyosentezi

H_2S, kalp, kan ve santral sinir sistemi gibi vücudun çeşitli bölgelerinde endojen olarak bulunmaktadır (76,77). Memeli dokularında bulunan başlıca iki pridoksal-5 fosfat (PLP) bağımlı enzimler olan sistatyonin-*β*-sentaz (CBS) ve sistatyonin-*γ*-liyaz (CSE) tarafından L-sistein aminoasidinden sentezlenmektedir (78-80). Bunlar dışında 3-merkaptopirüvat sülfürtransferaz (3-MST)/sistein aminotransferaz (CAT) enzim ikilisi olan minör bir yolak da tanımlanmıştır. Fakat 3-MST/CAT enzimatik yolağının H_2S sentezi üzerinde minör bir rolü vardır. (78,81-85).

Şekil 3'de görüldüğü gibi H_2S, L-sistein'in desülfürasyonu ile salıverilir. CBS, L-sistein'in H_2S salıverilmesi ile birlikte sistein'in serin'e dönüşümünü katalize ederken CSE ise amonyak ve H_2S salınımı ile pirüvat oluşturmak için sistein'in dönüşümünü katalize eder. Üçüncü yolak ile sistein'in ilk önce CAT'nin katalitik aktivasyonu ile 3-merkaptopirüvata dönüşmesi daha sonra 3-MST enzimi ile H_2S oluşmaktadır (72).



Şekil 3. Hidrojen sülfürün biyosentezi.

CBS: Sistatyonin-*β*-sentaz, CSE: Sistatyonin-*γ*-liyaz, CAT: Sistein aminotransferaz, 3-MST: 3-merkaptopirüvat sülfürtransferaz, H_2S: Hidrojen sülfür.

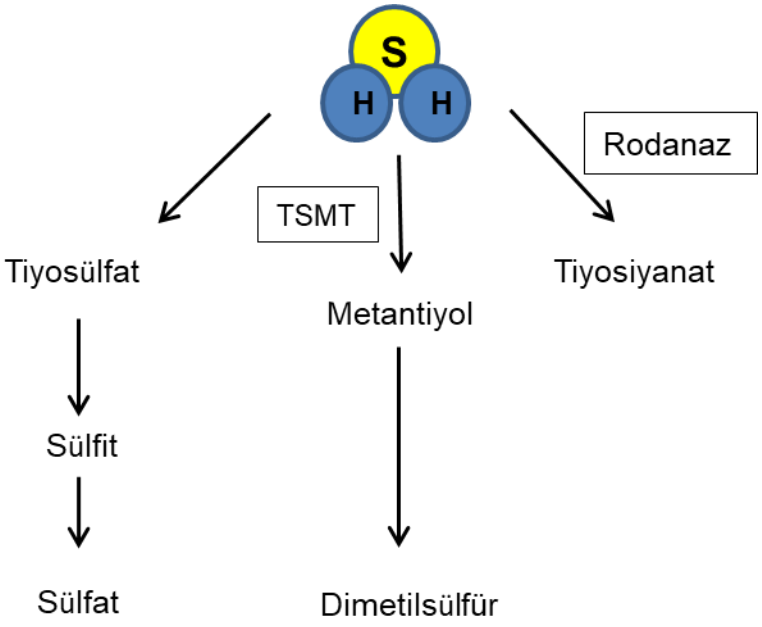
CSE ve CBS başlıca sitozolde bulunan demire bağlı protein iken, 3-MST ise mitokondri ve sitozolde bulunan çinkoya bağlı bir proteindir (86). CBS ve CSE'nin dokulardaki dağılımı değişkenlik göstermektedir. CBS, merkezi sinir sisteminde hipokampüs ve serebellum'da yüksek miktarda bulunur (81). H_2S sentezini sağlayan CBS aktivitesi değişkendir ve dokuya spesifiktir. Çoğunlukla astrositlerde ve mikroglia hücrelerinde bulunur (87-89). CSE'nin başlıca kardiyovasküler sistemde ekspresyonu fazlayken, aynı zamanda mikroglial hücrelerde omurilikte, dorsal kök gangliyonlarında ve serebellar granül nöronlarında da mevcuttur (90-92). Astrositlerde, H_2S üretimi mikrogliaya göre 7-9 kat daha fazladır (85,93).

H_2S genellikle nöron ve astrositlerde sülfan bağlı sülfür olarak depolanır. Nöron eksitasyonu ve diğer uyarımlarla birlikte sülfan bağlı sülfür serbest H_2S olarak salıverilir (94). Beyindeki endojen H_2S seviyesi periferik dokulardan önemli ölçüde daha yüksektir ve astrositlerde bulunan CBS enzimi tarafından sentezlenir ve nöronal eksitasyona yanıt olarak ortama salıverilir (95).

Hidroksilamin (HA) ve aminooksiasetat (AOAA) gibi CBS inhibitörleriyle beyin homojenatlarında sistein'ten H_2S üretimi, güçlü bir şekilde inhibe edilmektedir. Bu ajanlar selektif inhibitörler değildirler (72,81). Propargilglisin (PAG) ve *β*-siyano-*L*-alanin (CNA) gibi CSE inhibitörleri sıçan beyin homojenatlarında yüksek konsantrasyonlarda H_2S üretimini inhibe edebilmektedir (96).

Hidrojen Sülfürün Katabolizması

H_2S'nin yıkımı çeşitli yollarla gerçekleşmektedir. Ana metabolik yolakta mitokondride oksidasyona uğrayarak ilk önce tiyosülfat'a ($S_2O_3^{2-}$) daha sonra ise sülfit (SO_3^{2-}) ve sülfat'a (SO_4^{2-}) dönüşür. Sonuç olarak fizyolojik şartlarda H_2S metabolizmasının son ürününü sülfat meydana gelir. Sistein katabolizmasının son ürünleri sülfat (idrarla atılan sülfürün %77-92'si), ester sülfat (%7-9) ve taurin (%2-6)'dir (72,97). H_2S'in ikinci bir metabolik yolağı sitozolde gerçekleşen tiyol S-metiltransferaz (TSMT) enzimi tarafından metantiyol (CH_3SH) ve dimetilsülfür'e (CH_3SCH_3), metilasyonudur. Son olarak kolonda rodanaz enzimiyle tiyosiyanata (SCN^-) dönüşerek yıkımı gerçekleşir. (98,99).



Şekil 4. Hidrojen sülfürün katabolizması.

TSMT: Tiyol-*S*- metiltransferaz, H_2S: Hidrojen sülfür.

Hidrojen Sülfürün Santral Sinir Sisteminde Rolü

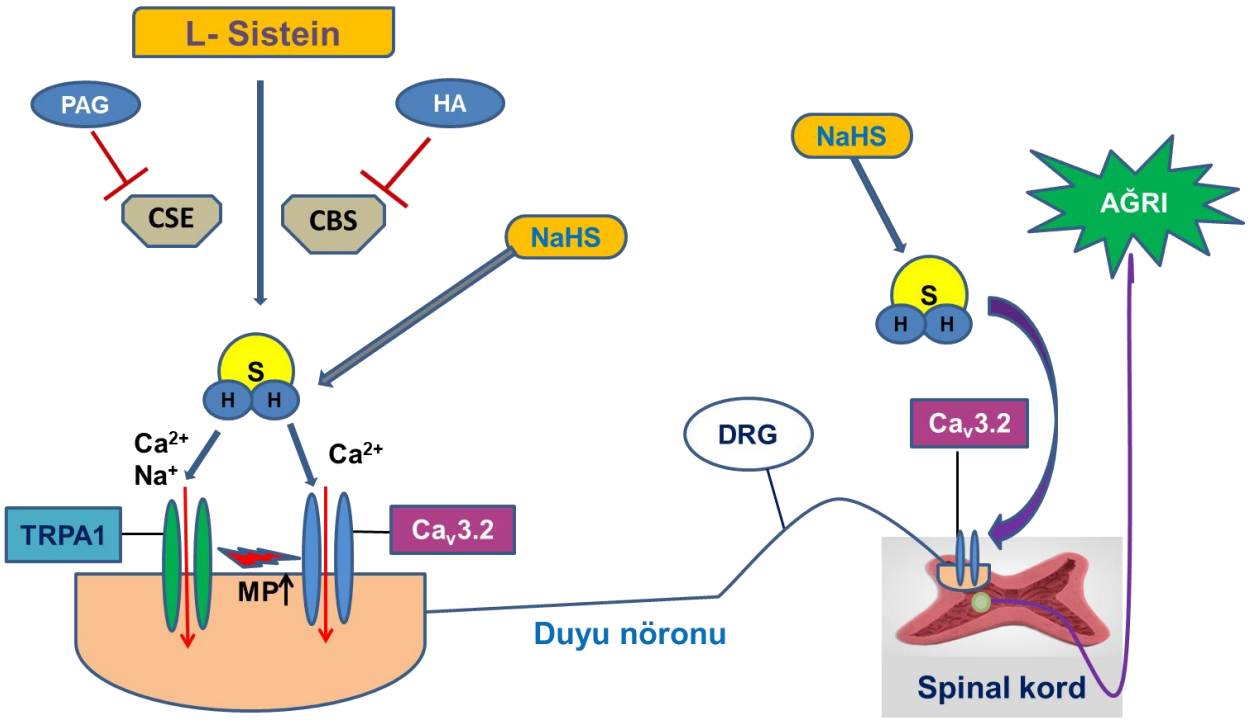
H_2S, NO ve karbon monoksit (CO)'den sonra son yıllarda etkileri bakımından dikkat çeken vücutta bulunan üçüncü bir gazotransmiterdir. İlk kez Abe ve Kimura (81) tarafından 1996 yılındaki yapmış oldukları bir çalışmalarında H_2S'nin endojen nörotransmiter olarak rol oynadığı bulunmuştur. Beyinde H_2S'nin üretiminin enzimatik mekanizmasını, fizyolojik konsantrasyonlarda biyolojik etkisini ve onun spesifik hücresel hedeflerini tanımlamışlardır (74). Endojen H_2S'nin kardiyovasküler, nöronal, gastrointestinal, üriner ve endokrin sistemlerde birçok fizyolojik ve patofizyolojik rolleri olduğu bildirilmiştir (86).

Periferik NMDA reseptörleri ağrı duyusunun iletilmesinde önemli bir rol oynamaktadır. NMDA reseptörlerinin blokajının hem opioidlerin antinosiseptif etkinliğini artırdığı hem de opioid hiperaljezinin ortaya çıkmasını engellediği gösterilmiştir (100,101). Yapılan çalışmalarda fizyolojik konsantrasyonlarda H_2S'nin öncelikle NMDA reseptörlerini seçici biçimde uyardığı gösterilmiştir. H_2S'nin NMDA reseptör fonksiyonunu güçlendirmesinin altında yatan mekanizma tam olarak bilinmemektedir ancak kendisinin indirgen özelliğinden kaynaklandığı düşünülmektedir (102). Hücre içinde H_2S, NMDA reseptör aracılı yanıtları cAMP

üretimi ile kolaylaştırır. Eksojen H_2S'nin, sıçan serebrum ve serebellum nöronlarında ve bazı nöronal ve glial hücre hatlarında cAMP'yi arttırdığı gösterilmiştir (103).

Santral sinir sisteminde birçok fizyolojik ve patolojik olayda özellikle çarpma, travmatik beyin hasarı ve omurilik hasarından sonra ortaya çıkan ikincil nöronal hasarların nöronlarda aşırı kalsiyum oluşumuna katkısı olabileceği belirtilmektedir (95). Hücre içi Ca^{2+} iyonu, fizyolojik ve patolojik olaylarda nöron içi ve nöronlar arası sinyalleşmede önemli bir rol oynar. Hücre içi Ca^{2+} dengesi, hücre içi Ca^{2+} depoları ve membrandaki Ca^{2+} kanalları tarafından kontrol edilir. H_2S'nin astrosit, mikroglia ve nöronlarda Ca^{2+} artışına yol açtığı bulunmuştur (93).

$Ca_v3.2$ T-tipi Ca^{2+} kanalları, istirahat membran potansiyeline yakın bir potansiyelde aktive olur, santral ve periferik nöronların uyarılabilirliğinde çok önemli bir rol oynar. $Ca_v3.2$ T-tipi Ca^{2+} kanalları birinci duyusal nöronun periferik ve santral aksonlarının sonlanmalarında eksprese edilir ve bu kanalların duyusal iletimde rolü vardır (104-106). TRPA1, duyusal nöronlarda ekprese edilen selektif olmayan katyon kanallarından biridir (107-109). TRPA1 kanalları doğal acı bileşikler, çevresel tahriş edici maddeler, soğuk ve sıcak uyarılara yanıt verirler (107,110,111). H_2S'nin TRPA1'in aktivasyonuna neden olması ile oluşan membran potansiyelindeki artış $Ca_v3.2$'yi aktive ederek nosiseptörün uyarılmasını kolaylaştırmakta ve hiperaljezi oluşumuna sebep olmaktadır (Şekil 5) (112). Endojen olarak üretilen ve/veya eksojen verilen H_2S, $Ca_v3.2$ T-tipi Ca^{2+} kanalları (T kanalları) ve TRPA1 kanallarını uyarır. H_2S donörlerinin intratekal, intraplantar ve intrakolonik uygulaması, sıçanlarda ve/veya farelerde $Ca_v3.2$ T-tipi kanallar ve TRPA1'in aktivasyonu yoluyla sırasıyla somatik ve viseral ağrı oluşumunda rol oynar (112-114). Bourinet ve ark. (115) sıçanlarda dorsal kök gangliyon nöronlarında $Ca_v3.2$ T-kanallarının silinmesiyle termal ve mekanik analjezinin oluştuğunu göstermişlerdir. Bu çalışma, duyusal nöronlarda $Ca_v3.2$ T-tipi kalsiyum kanallarının nosisepsiyonun mekanizmasında rol oynadığını göstermektedir. Sonuç itibari ile ağrı algılanmasında rolü olan $Ca_v3.2$ T-tipi kanalları ağrının tedavisi için belirli bir moleküler hedef olabilir.



Şekil 5. Birinci duyusal nöronun periferik ve santral terminallerinde H_2S'nin rolleri. (Terada ve Kawabata'dan (112) uyarlanmıştır).

H_2S: Hidrojen sülfür, CSE: Sistatyonin gama liyaz, CBS: Sistatyonin beta sentaz, HA: Hidroksilamin, PAG: Propargilglisin, MP: Membran potansiyeli, DRG: Dorsal kök gangliyonu, $Ca_V3.2$: T tipi voltaj kapılı kalsiyum kanalı, TRPA1: Geçici reseptör potansiyel ankirin-1 kanalı.

$Ca_V3.2$ T-tipi kanalları, çinko, bakır ve nikel gibi metaller tarafından inhibe edilmektedir (105). L-sistein ve H_2S'in Zn^{2+} ile kimyasal olarak etkileşime girerek $Ca_V3.2$'nin kanal fonksiyonlarını seçici olarak arttırdığı bildirilmiştir (112,116,117). H_2S donörü NaHS'nin sıçanlarda hem intratekal hem de intraplantar uygulanması nosisepsiyon eşiğini hızlı bir şekilde azaltarak hiperaljezinin oluşmasına sebep olmaktadır. Yapılan çalışmalarda H_2S'nin $Ca_V3.2$ izoformundaki T-tipi kanalları aktive ettiği, bu kanalları bloke eden mifebradil ve $ZnCl_2$ ile hiperaljezinin kaybolduğu gösterilmiştir (114). Terada ve ark. (118) da benzer şekilde H_2S/T-tipi Ca^{2+} kanal yolağının sıçanlarda pankreatit ilişkili nosiseptif ağrının sinyalizasyonunda önemli bir rol oynadığını bulmuşlardır.

Bununla birlikte, eksojen olarak uygulanan H_2S'nin, bazı deneysel şartlarda K_{ATP} kanallarının veya bilinmeyen mekanizmaların aktivasyonu yoluyla antinosiseptif aktivite gösterdiği dikkat çekicidir (6,7).

Endojen H_2S'nin, nöropatik ağrının gelişiminde $Ca_v3.2$ T-tipi kalsiyum kanallarını up-regüle ettiği ve TRPA1 iyon kanalını aktive ettiği bildirilmiştir (5,12,119-121). Nöropatik ağrı tedavisinde CBS-H_2S yolağının önemli olduğu yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. Gui ve ark. (5) kronik siyatik sinir konstrüksiyon hasarı modelinde endojen CBS-H_2S yolağının etkisini incelemişlerdir. Endojen H_2S oluşumunun CBS inhibitörü ile azaltılmasının, nöropatik ağrı oluşumunda rol oynayan ERK1/2, CREB ve NF-κB(p65)'nin aktivasyonunu inhibe ettiği ve kronik siyatik sinir hasarı modelinde mekanik ve termal hiperaljeziyi önlediğini göstermişlerdir. L5 spinal sinir kesilmesiyle oluşan hiperaljezi ve allodininin, $Ca_v3.2$ T-tipi kanalların bloke edilmesi veya genetik susturulması ile güçlü bir şekilde baskılandığı gösterilmiştir. Ayrıca CSE inhibitörlerinin uygulanması ile de benzer etkiler gözlenmiştir (12). Diyabetik nöropatili laboratuvar hayvanlarında T-kanallarından $Ca_v3.2$ izoformunun up-regüle olduğu ve hiperaljezi-allodini gelişiminde rol oynadığı gösterilmiştir (122). DRG'de $Ca_v3.2$ T-kanallarının susturulması ve CSE veya CBS inhibitörlerinin sistemik olarak uygulanması, streptozotosin (STZ) ile indüklenen diyabetik nörapatide mekanik allodini ve hiperaljeziyi önlemiştir. Bu bulgular H_2S'nin diyabetik nöropatik ağrıyla ilişkili olduğu düşünülmektedir (10).

GEREÇ VE YÖNTEMLER

Bu çalışma; Trakya Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından 29.06.2016 tarih ve 2016/07 sayılı oturumda 2016.07.02 karar numarası ile onaylandıktan sonra (EK-1), Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir. Çalışmamız Trakya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (TÜBAP-2016/209) Komisyonu tarafından desteklenmiştir.

DENEKLER

Çalışmamızda, yaklaşık 25-40 g ağırlığında, 2-3 aylık, 160 adet Balb-c erkek fare kullanıldı. Deneylerimizde kullanılan fareler, Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Birimi'nden temin edildiler ve daha sonra tüm deneyler boyunca Anabilim Dalı'mızda bulunan Deney Hayvanları Birimi Tıbbi Farmakoloji Ünitesi'nde standart koşullar altında barındırıldılar.

İLAÇLAR

Morfin HCl 0,01g/mL (Gallen İlaç San ve Tic. A.Ş., İstanbul, Türkiye)

Nalokson (USP, Maryland, USA)

D-L Propargilglisin (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)

Hidroksilamin (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)

ANTİNOSİSEPTİF YANITLARIN ÖLÇÜLMESİ

Tail Flick Testi

Termal uyaranla oluşturulan ağrının ölçüldüğü bir testtir. Antinosiseptif etkinin ölçümünde anabilim dalımızda bulunan tail flick cihazı (Commat, Ankara, Türkiye) (Şekil 9) kullanıldı. Cihaz yardımıyla farelerin kuyruğunun dorsal yüzeyine radyan ısı uygulandı ve kuyruklarını aniden çektikleri süre saptandı. Doku zedelenmesini önlemek için "cut-off" değeri 10 sn olarak belirlenmiş olup, bu süre içinde teste yanıt vermeyen hayvanlar cihazdan alındılar. İlaç uygulamalarından önce, farelerin bazal değerini saptamak için her farede 2-3 kez ölçüm yapıldı. Morfin analjezisi enjeksiyondan 30 dk sonra ölçüm yapılarak değerlendirildi.

Antinosiseptif etkinin göstergesi olarak değerlendirilecek olan maksimal olası etki (MOE) yüzdesi şu formüle göre hesaplandı:

%MOE = [(test süresi - kontrol değeri) / (cut-off süresi-kontrol değeri)] x 100

Hot Plate Testi

Antinosiseptif etkinin ölçümünde anabilim dalımızda bulunan hot plate cihazı (Ugo Basile, Comerio, Italy) (Şekil 10) kullanıldı. Bu testte, denekler sıcaklığı 55 °C olan metal bir yüzeye bırakıldıktan sonra arka pençelerini yaladıkları ya da sıçradıkları zamana kadar geçen sürenin ölçümü yapıldı. Doku zedelenmesini önlemek için "cut-off" değeri 25 sn olarak belirlenmiş olup, bu süre içinde teste yanıt vermeyen hayvanlar cihazdan alındılar. İlaç uygulamalarından önce, farelerin bazal değerini saptamak için her farede 2-3 kez ölçüm yapıldı. Morfin analjezisi, enjeksiyondan 30 dk sonra ölçüm yapılarak değerlendirildi.

Antinosiseptif etkinin göstergesi olarak değerlendirilecek olan MOE yüzdesi şu formüle göre hesaplandı:

%MOE= [(test süresi-kontrol değeri) / (cut-off süresi-kontrol değeri)] x 100

MOTOR KOORDİNASYON ÖLÇÜMLERİ

Deney süresince uygulanan ilaç enjeksiyonlarının deneklerde motor koordinasyon bozukluğu oluşturup oluşturmadığını anlamak için rota rod (Commat, Ankara, Türkiye) cihazında teste tabi tutulurlar (Şekil 11). Farelerin silindirden düşme

süresi cihaz tarafından otomatik olarak belirlemektedir. Çalışmamızda silindir hızı 16 rpm olarak ayarlandı ve cut-off değeri 180 sn olarak belirlendi.

TOLERANS VE BAĞIMLILIK OLUŞTURULMASI

Tolerans oluşturmak amacıyla, farelere s.k. yolla günde iki kez 08:00 ve 20:00 saatlerinde 10 mg/kg morfin 11 gün boyunca ve 12. gün sabah 08:00'de uygulandı. Tolerans gelişimini tespit etmek için deneye başlamadan önce farelerin "tail flick'', "hot plate", ve "rota rod" bazal ölçümleri alındı. İlk enjeksiyondan itibaren 1, 3, 6, 7, 8, 9, 10, 11 ve 12. günde tail flick ve hot plate testlerinde morfinin antinosiseptif etkisindeki azalma değerlendirildi. Kontrol grubu olarak kullanılacak farelere de benzer şekilde günde iki kez s.k. yolla 08:00 ve 20:00 saatlerinde serum fizyolojik (SF) verildi.

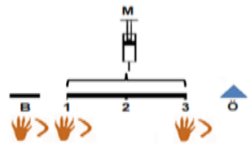
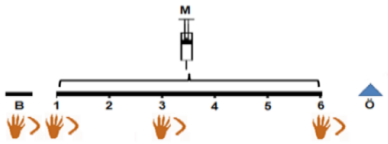
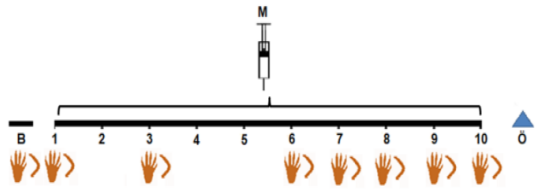
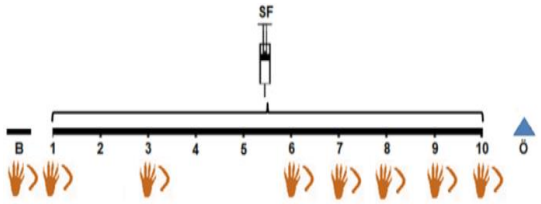
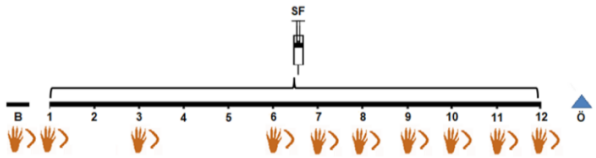
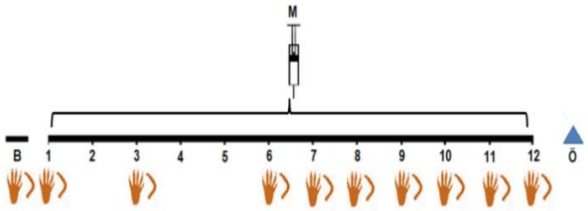
Bağımlılık oluşturmak amacıyla, farelere s.k. yolla günde iki kez 08:00 ve 20:00 saatlerinde 10 mg/kg morfin 11 gün boyunca ve 12. gün sabah 08:00'de uygulandı. 12. günde 5 mg/kg i.p. nalokson verilerek, fareler bağımlılığın göstergesi olan yoksunluk sendromuna sokuldular. Nalokson uygulanmasından hemen sonra fareler belirli bir platformun (30x30x30 cm) içine bırakıldı ve 20 dk süreyle yoksunluk sendromu belirtileri olarak sıçrama sayıları sayıldı.

Tolerans ve bağımlılık gelişimini gözlemleyebilmek için yapılan deneyler yaklaşık 2 hafta boyunca devam ettiğinden, bu süre içerisinde aşırı zayıflayan veya hastalanan fareler deneyden çıkartıldılar. Deney bitiminde tüm hayvanlara servikal dislokasyon ile ötenazi uygulandı.

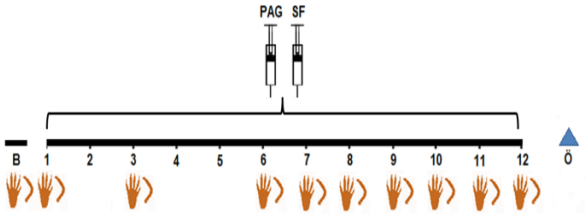
DENEY DÜZENİ

Deney grupları öncelikle morfin tolerans grubu ve bağımlılık grubu olmak üzere 2 ana başlık altında toplandı. Tolerans gelişim sürecinde doku H_2S düzeylerini değerlendirmek ve gelişen tolerans üzerine ilaçların etkisini belirlemek için toplamda 14 grup oluşturuldu (Tablo 1). Bağımlılık üzerine ilaçların etkisini belirlemek amacıyla 6 grup oluşturuldu (Tablo 2). Her grupta 8 hayvan olmak üzere toplamda 160 hayvan kullanıldı.

Tablo 1. Tolerans deney grupları

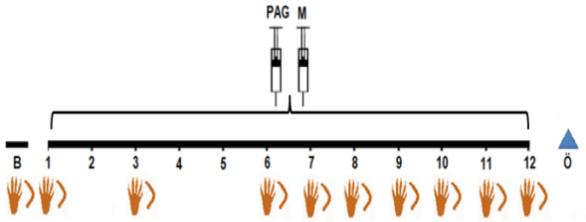
	**Grup 1 (3 günlük Morfin)** ▪ **0. gün:** Bazal ölçüm (B) ▪ **1-3 gün arası:** Morfin (M) (10 mg/kg/s.k. 2x1) ▪ **1 ve 3. gün:** Analjezi ölçümleri (tail flick, hot plate) ▪ **3. gün:** Ötenazi (Ö) **n: 7**
	**Grup 2 (6 günlük Morfin)** ▪ **0. gün:** Bazal ölçüm (B) ▪ **1-6 gün arası:** Morfin (M) (10 mg/kg/s.k. 2x1) ▪ **1, 3, 6. gün:** Analjezi ölçümleri (tail flick, hot plate) ▪ **6. gün:** Ötenazi (Ö) **n: 7**
	**Grup 3 (10 günlük Morfin)** ▪ **0. gün:** Bazal ölçüm (B) ▪ **1-10 gün arası:** Morfin (M) (10 mg/kg/s.k. 2x1) ▪ **1, 3, 6-10. gün:** Analjezi ölçümleri (tail flick, hot plate) ▪ **10. gün:** Ötenazi (Ö) **n: 7**
	**Grup 4 (10 günlük Kontrol)** ▪ **0. gün:** Bazal ölçüm (B) ▪ **1-10 gün arası:** Serum Fizyolojik (SF) (0,1 ml/10gr/s.k. 2x1) ▪ **1, 3, 6-10. gün:** Analjezi ölçümleri (tail flick, hot plate) ▪ **10. gün:** Ötenazi (Ö) **n: 8**
	**Grup 5 (12 günlük Kontrol)** ▪ **0. gün:** Bazal ölçüm (B) ▪ **1-12 gün arası:** Serum Fizyolojik (SF) (0,1 ml/10 gr/s.k. 2x1) ▪ **1, 3, 6-12. gün:** Analjezi ölçümleri (tail flick, hot plate) ▪ **12. gün:** Ötenazi (Ö) **n: 5**
	**Grup 6 (12 günlük Morfin)** ▪ **0. gün:** Bazal ölçüm (B) ▪ **1-12 gün arası:** Morfin (M) (10 mg/kg/s.k. 2x1) ▪ **1, 3, 6-12. gün:** Analjezi ölçümleri (tail flick, hot plate) ▪ **12. gün:** Ötenazi (Ö) **n: 7**

Tablo 1 (devamı). Tolerans deney grupları



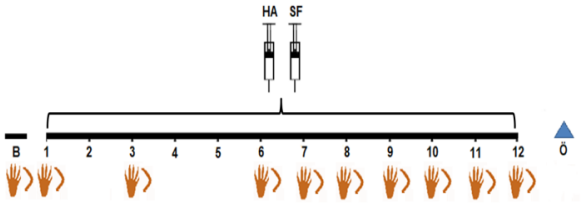
Grup 7 (Kronik PAG + SF grubu)

- **0. gün:** Bazal ölçüm (B)
- **1-12 gün arası:** Propargilglisin (PAG) (30 mg/kg/i.p. 1x1) ve Serum Fizyolojik (SF) (0,1 ml/10 gr/s.k. 2x1)
- **1, 3, 6-12. gün:** Analjezi ölçümleri (tail flick, hot plate)
- **12. gün:** Ötenazi (Ö) **n: 7**



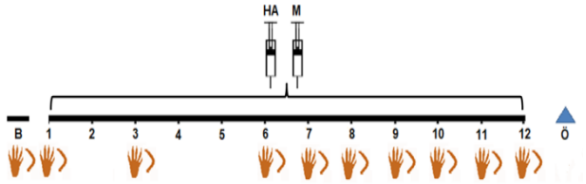
Grup 8 (Kronik PAG + Morfin)

- **0. gün:** Bazal ölçüm (B)
- **1-12 gün arası:** Propargilglisin (PAG) (30 mg/kg/i.p.1x1) ve Morfin (M) (10 mg/kg/s.k. 2x1.)
- **1, 3, 6-12. gün:** Analjezi ölçümleri (tail flick, hot plate)
- **12. gün:** Ötenazi (Ö) **n: 8**



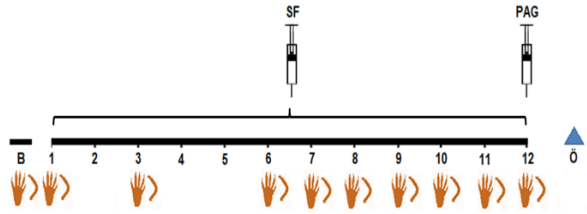
Grup 9 (Kronik HA + SF)

- **0. gün:** Bazal ölçüm (B)
- **1-12 gün arası:** Hidoksilamin (HA) (12,5 mg/kg/i.p. 1x1) ve Serum Fizyolojik (SF) (0,1 ml/10 gr/s.k. 2x1)
- **1, 3, 6-12. gün:** Analjezi ölçümleri (tail flick, hot plate)
- **12. gün:** Ötenazi (Ö) **n: 3**



Grup 10 (Kronik HA + Morfin)

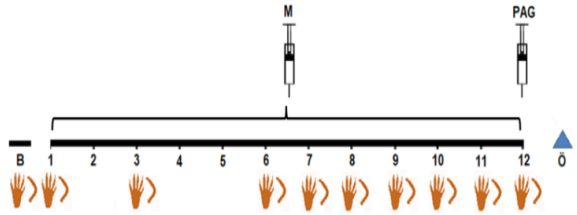
- **0. gün:** Bazal ölçüm (B)
- **1-12 gün arası:** Hidoksilamin (HA) (12,5 mg/kg/i.p. 1x1) ve Morfin (M) (10 mg/kg/s.k. 2x1)
- **1, 3, 6-12. gün:** Analjezi ölçümleri (tail flick, hot plate)
- **12. gün:** Ötenazi (Ö) **n: 3**



Grup 11 (Kronik SF + 12. gün akut PAG)

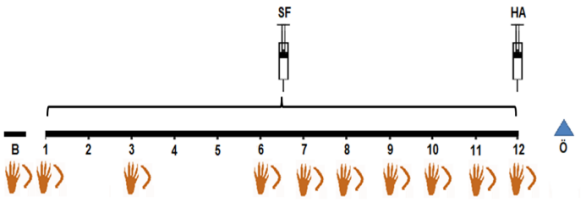
- **0. gün:** Bazal ölçüm (B)
- **1-12 gün arası:** Serum Fizyolojik (SF) (0,1 ml/10 gr/s.k. 2x1)
- **12. gün:** Propargilglisin (PAG) (30 mg/kg/i.p.1x1)
- **1, 3, 6-12. gün:** Analjezi ölçümleri (tail flick, hot plate)
- **12. gün:** Ötenazi (Ö) **n: 7**

Tablo 1 (devamı). Tolerans deney grupları



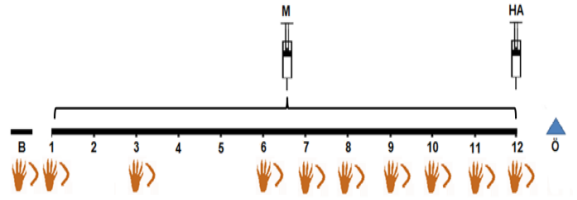
Grup 12 (Kronik Morfin + 12. gün akut PAG)

- **0. gün:** Bazal ölçüm (B)
- **1-12 gün arası:** Morfin (M) (10 mg/kg/s.k. 2x1)
- **12.gün:** Propargilglisin (PAG) (30 mg/kg/i.p.1x1)
- **1, 3, 6-12. gün:** Analjezi ölçümleri (tail flick, hot plate)
- **12. gün:** Ötenazi (Ö) **n: 7**



Grup 13 (Kronik SF + 12. gün akut HA)

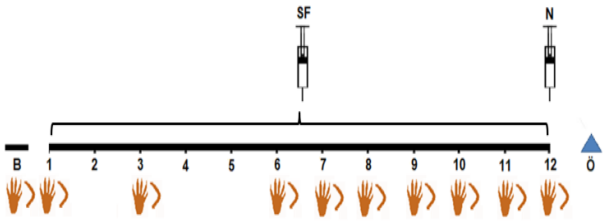
- **0. gün:** Bazal ölçüm (B)
- **1-12 gün arası:** Serum Fizyolojik (SF) (0,1 ml/10 gr/s.k. 2x1)
- **12. gün:** Hidroksilamin (HA) (12,5 mg/kg/i.p. 1x1)
- **1, 3, 6-12. gün:** Analjezi ölçümleri (tail flick, hot plate)
- **12. gün:** Ötenazi (Ö) **n: 7**



Grup 14 (Kronik Morfin + 12. gün akut HA)

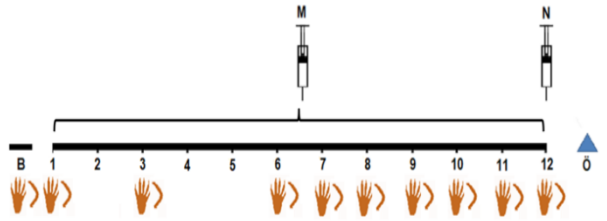
- **0. gün:** Bazal ölçüm (B)
- **1-12 gün arası:** Morfin (M) (10 mg/kg/s.k. 2x1)
- **12.gün:** Hidroksilamin (HA) (12,5 mg/kg/i.p. 1x1.)
- **1, 3, 6-12. gün:** Analjezi ölçümleri (tail flick, hot plate)
- **12. gün:** Ötenazi (Ö) **n: 7**

Tablo 2. Bağımlılık deney grupları



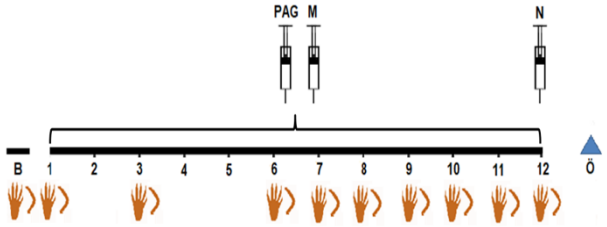
Grup 1 (Kontrol grubu)

- **0. gün:** Bazal ölçüm (B)
- **1-12 gün arası:** Serum Fizyolojik (SF) (0,1 ml/10 gr/s.k. 2x1)
- **12.gün:** Nalokson (N) (5 mg/kg/i.p.1x1)
- **1, 3, 6-12. gün:** Analjezi ölçümleri (tail flick, hot plate)
- **12.gün:** Yoksunluk ölçümü (Sıçrama sayısı)
- **12. gün:** Ötenazi (Ö) **n: 8**



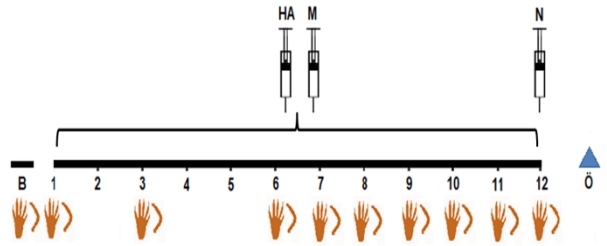
Grup 2 (Kronik Morfin)

- **0. gün:** Bazal ölçüm (B)
- **1-12 gün arası:** Morfin (M) (10 mg/kg/s.k. 2x1)
- **12. gün:** Nalokson (N) (5 mg/kg/i.p.1x1)
- **1, 3, 6-12. gün:** Analjezi ölçümleri (tail flick, hot plate)
- **12. gün:** Yoksunluk ölçümü (Sıçrama sayısı)
- **12. gün:** Ötenazi (Ö) **n: 7**



Grup 3 (Kronik PAG + Morfin)

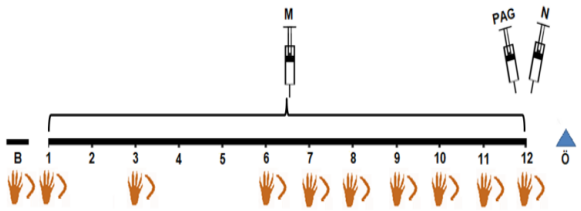
- **0. gün:** Bazal ölçüm (B)
- **1-12 gün arası:** Propargilglisin (PAG) (30 mg/kg/i.p.1x1) ve Morfin (M) (10 mg/kg/s.k. 2x1)
- **12. gün:** Nalokson (N) (5 mg/kg/i.p.1x1)
- **1, 3, 6-12. gün:** Analjezi ölçümleri (tail flick, hot plate)
- **12. gün:** Yoksunluk ölçümü (Sıçrama sayısı)
- **12. gün:** Ötenazi (Ö) **n: 6**



Grup 4 (Kronik HA + Morfin)

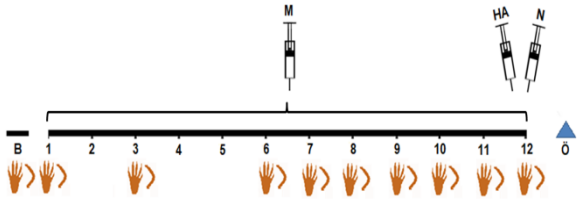
- **0. gün:** Bazal ölçüm (B)
- **1-12 gün arası:** Hidroksilamin (HA) (12,5 mg/kg/i.p. 1x1) ve Morfin (M) (10 mg/kg/s.k. 2x1)
- **12.gün:** Nalokson (N) (5 mg/kg/i.p.1x1)
- **1, 3, 6-12. gün:** Analjezi ölçümleri (tail flick, hot plate)
- **12.gün:** Yoksunluk ölçümü (Sıçrama sayısı)
- **12. gün:** Ötenazi (Ö) **n: 6**

Tablo 2 (devamı). Bağımlılık deney grupları



Grup 5 (Kronik Morfin + 12. gün akut PAG)

- **0. gün:** Bazal ölçüm (B)
- **1-13 gün arası:** Morfin (M) (10 mg/kg/s.k. 2x1)
- **12. gün:** Propargilglisin (PAG) (30 mg/kg/i.p.1x1) ve Nalokson (N) (5 mg/kg/i.p.1x1)
- **1, 3, 6-12. gün:** Analjezi ölçümleri (tail flick, hot plate)
- **12. gün:** Yoksunluk ölçümü (Sıçrama sayısı)
- **12. gün:** Ötenazi (Ö) **n: 8**



Grup 6 (Kronik Morfin + 12. gün akut HA)

- **0. gün:** Bazal ölçüm (B)
- **1-12 gün arası:** Morfin (M) (10 mg/kg/s.k. 2x1)
- **12. gün:** Hidroksilamin (HA) (12,5 mg/kg/i.p. 1x1) ve Nalokson (N) (5 mg/kg/i.p.1x1)
- **1, 3, 6-12. gün:** Analjezi ölçümleri (tail flick, hot plate)
- **12. gün:** Yoksunluk ölçümü (Sıçrama sayısı)
- **12. gün:** Ötenazi (Ö) **n: 7**

HİDROJEN SÜLFÜR DÜZEYİ ÖLÇÜMÜ

Omurilik lomber arka kök ve tüm beyin H_2S düzeyleri Qu ve ark. (96) tarafından sıçanlar için tanımlanan ve Gui ve ark. (5) tarafından farelere uyarlanan spektrofotometrik yöntemle ölçüldü.

Kimyasal Malzemeler

Dipotasyum hidrojen fosfat (K_2HPO_4, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)

Potasyum dihidrojen fosfat (KH_2PO_4, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)

Çinko asetat [$Zn(CH_3COO)_2$, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA]

Triklor asetik asit (Cl_3CCOOH, Merck, Darmstadt, Almanya)

N,N-dimetil-*p*-fenilendiamin sülfat [$(CH_3)_2NC_6H_4NH_2 \cdot H_2SO_4$, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)

Demir (III) klorür ($FeCl_3$, Merck, Darmstadt, Almanya)

Hidroklorik asit (HCl, Merck, Darmstadt, Almanya)

Sodyum hidrosülfür (NaHS, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)

Cihaz ve Malzemeler

Elektronik tartı (Precisa, Dietikon, Switzerland), distile su cihazı (Veolia, Glasgow, UK), vorteks (Nüve, Ankara, Türkiye), manyetik karıştırıcı (Heidolph Schwabach, Germany), pH metre (Inolab WTW, Weilheim, Germany), soğutmalı santrifüj (Hettich, Tuttlingen, Germany), Mikroplaka Spektrofotometresi (µQuant BioTek, Vermont, USA).

Kullanılan Solüsyonlar

Potasyum fosfat tampon (50mM): 0,8365 g K_2HPO_4 ve 0,0261g KH_2PO_4 1000 mL distile su içerisinde çözüldü ve 1M KOH ve 0,1 N HCl ile pH 8'e ayarlandı.

Çinko asetat solüsyonu (%1w/v): 1 g çinko asetat 50 mL distile su içerisinde çözüldü ve 100 mL'ye tamamlandı.

Triklor asetik asit (%10w/v): 10 g triklor asetik asit 50 mL distile su içerisinde çözüldü ve 100 mL'ye tamamlandı.

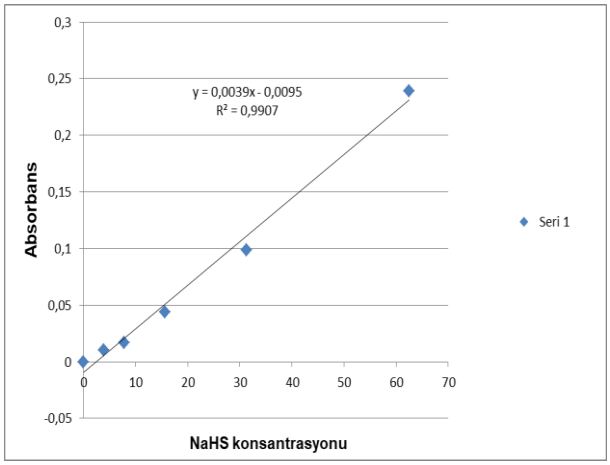
***N,N*-dimetil-*p*-fenilendiamin sülfat solüsyonu (1M):** 100 mmol *N,N*-dimetil-*p*-fenilendiamin 7,2 M 100 mL HCl içerisinde çözülerek hazırlandı.

Demir (III) klorür solüsyonu (1,5M): 150 mmol demir (III) klorür, 1,2 M 100 mL HCl içerisinde çözülerek hazırlandı.

Sodyum hidrosülfür solüsyonu (1000µM): 1000 µmol sodyum hidrosülfür stok solüsyonu 1000 mL distile su içerisinde hazırlandı.

Kalibrasyon

H_2S'nin kalibrasyon eğrisinin çizilebilmesi çeşitli konsantrasyonlarda (62,5-31,25-15,625-7,8125 ve 3,90625 µmol) sodyum hidrosülfür (NaHS) standart solüsyonları hazırlandı. NaHS, suda çözüldüğünde %30 oranında hidrojen sülfür iyonu (HS^-) verir ve HS^-, sudaki H^+ ile birleşerek H_2S'yi oluşturur. NaHS standart solüsyonlarının absorbanslarını belirlemek için 40 µmol *N,N*-dimetil-*p*-fenilendiamin sülfat solüsyonu ve 40 µmol demir (III) klorür solüsyonu ilave edildi. 20 dk sonra 670 nm dalga boyunda absorbans ölçümü yapıldı ve kalibrasyon eğrisi çizildi (Şekil 6).



Şekil 6. Sodyum hidrosülfür kalibrasyon eğrisi.

Beyin Dokusu Hidrojen Sülfür Düzeyi

Beyin dokusu ağırlığının 5 katı oranında potasyum fosfat tamponu (pH: 8) kullanılarak homojenize edildi. Homojenizasyon işleminin ardından doku numuneleri 10 dakika boyunca santrifüj (47.000g, 4 ^{0}C) edildi. Santrifüj işleminin ardından elde edilen süpernatanta 0,25 mL çinko asetat solüsyonu ve 0,45 mL disitile su ilave edildi ve karıştırıldı. Bu karışımın içerisine 0,25 mL triklor asetik asit ilave edildi ve ardından 10 dakika boyunca santrifüj (14.000g, 4 ^{0}C) edildi. Elde edilen süpernatanta 40 µmol *N,N*-dimetil-*p*-fenilendiamin sülfat solüsyonu ve 40 µmol demir (III) klorür solüsyonu ilave edildi. 20 dk sonra 670 nm dalga boyunda absorbans ölçümü yapıldı.

Omurilik Dokusu Hidrojen Sülfür Düzeyi

Omurilik dokusu ağırlığının 10 katı oranında potasyum fosfat tamponu (pH: 8) kullanılarak homojenize edildi. Homojenizasyon işleminin ardından doku numuneleri 10 dakika boyunca santrifüj (47.000g, 4^{0}C) edildi. Santrifüj işleminin ardından elde edilen süpernatanta 0,05 mL çinko asetat solüsyonu ve 0,09 mL disitile su ilave edildi ve karıştırıldı. Diğer tüm ölçüm adımları beyin dokusu için tarif edildiği şekilde uygulandı.

İSTATİSTİKSEL ANALİZLER

Grupların Oluşturulması

Tolerans grupları: Benzer tasarımda yapılmış çalışmalardan elde edilen veriler [ortalamalar arasında saptanması planlanan en düşük fark (0,25), standart sapma (0,10), grup sayısı (14), istenen güç (0,80) ve alfa (0,05)] ile SigmaStat for Windows Version 3.5 (kayıt no: 773060000) kullanılarak yapılan kestirim sonucunda örnek büyüklüğü grup başına 7 olarak hesaplanmıştır. Hayvan kayıpları göz önüne alınarak gruplar 8 (n=8) hayvan içerecek şekilde oluşturulmuştur.

Bağımlılık grupları: Benzer tasarımda yapılmış çalışmalardan elde edilen veriler [ortalamalar arasında saptanması planlanan en düşük fark (0,25), standart sapma (0,10), grup sayısı (6), istenen güç (0,80) ve alfa (0,05)] ile SigmaStat for Windows Version 3.5 (kayıt no: 773060000) kullanılarak yapılan kestirim sonucunda örnek büyüklüğü grup başına 6 olarak hesaplanmıştır. Hayvan kayıpları göz önüne alınarak gruplar 8 (n=8) hayvan içerecek şekilde oluşturulmuştur.

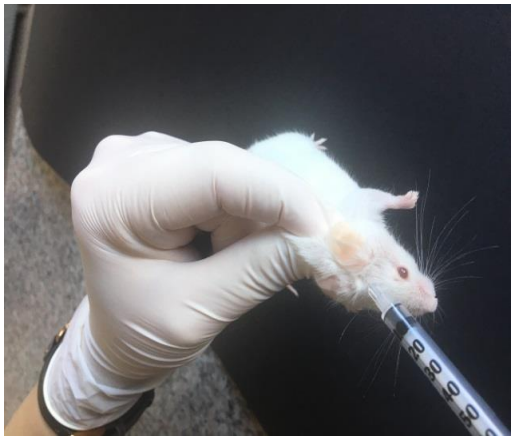
Bulguların Değerlendirilmesi

Tolerans grupları: Elde edilen veriler bilgisayara aktarılarak normal dağılıma uygunlukları Shapiro-Wilk testiyle değerlendirildi. Tolerans gelişimini ve ilaçların tolerans üzerine etkisini karşılaştırmak için iki yönlü varyans analizi, ardından *Post hoc* Bonferroni *t*-testi uygulandı.

Bağımlılık grupları: Elde edilen veriler bilgisayara aktarılarak normal dağılıma uygunlukları Shapiro-Wilk testiyle değerlendirildi. Verilerin normal dağılmaması üzerine bağımlılık gelişimi ve ilaçların bağımlılık üzerine etkisini karşılaştırmak için Kruskal Wallis, ardından *Post hoc* Dunn's testi uygulandı.

Beyin ve omurilik H_2S düzeyleri: Elde edilen veriler bilgisayara aktarılarak normal dağılıma uygunlukları Shapiro-Wilk testiyle değerlendirildi. Verilerin normal dağılmaması üzerine gruplar arası karşılaştırmada Kruskal Wallis, ardından *Post hoc* Dunn's testi uygulandı.

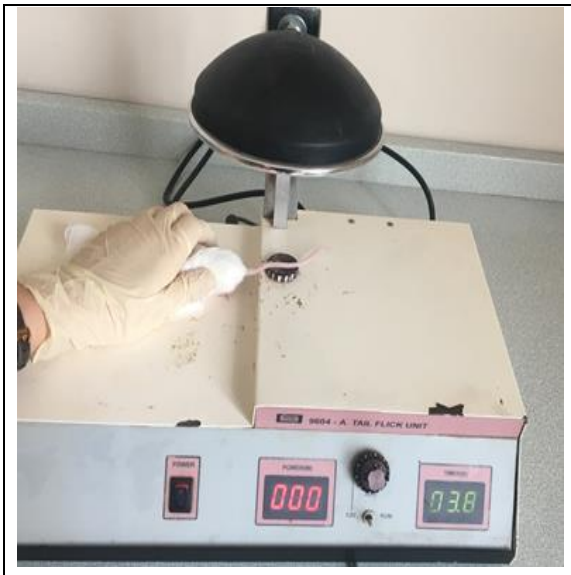
Tüm istatistiksel analizler ve grafikler GraphPad prism 6 for Windows version 6.05 (seri no: GPW6-156727-R) programı kullanılarak yapıldı. P<0,05 olan değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.



Şekil. 7. Subkutan enjeksiyon



Şekil 8. İntraperitoneal enjeksiyon



Şekil 9. “Tail flick” cihazı



Şekil 10. “Hot plate” cihazı



Şekil 11. “Rota rod” cihazı

BULGULAR

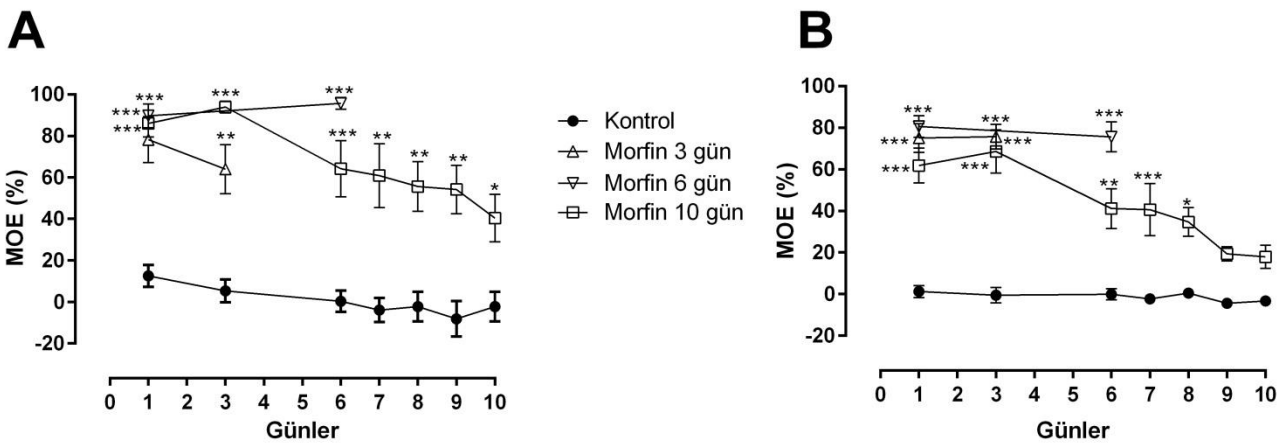
Morfinin analjezik etkisine karşı tolerans gelişimi tail flick ve hot plate testleriyle gösterilirken, morfin bağımlılığın oluştuğu hayvanlara nalokson enjeksiyonunu takiben ortaya çıkan kesilme sendromu bulgusu olan sıçramaların 20 dk boyunca sayılmasıyla gösterilmiştir. Morfin tolerans ve bağımlılığının gelişiminin değişik aşamalarında farelerin beyin ve omurilik dokusu alınarak H_2S düzeyi ölçülmüş ve tolerans ve bağımlılık gelişimiyle ilişkisi değerlendirilmiştir.

MORFİNİN ANALJEZİK ETKİSİNE TOLERANS GELİŞMESİ

Morfinin analjezik etkisinde ilk günden itibaren sürekli bir azalma saptadık (Şekil 12, 13, 14, 15, 16, 17). Günde iki kez s.k. 10 mg/kg morfin uygulanması sonucunda, tail flick ve hot plate testlerinde ortalama 11, 12. günlerde morfinin analjezik etkisine tam bir tolerans gelişti (Şekil 13, 14, 15, 16, 17).

Üç-Altı-On Günlük Morfin Kullanımına Tolerans Gelişimi

Morfinin 10 mg/kg, s.k. 2x1 uygulanmasıyla analjezik etkisinde günler ilerledikçe azalma görülmekle birlikte tam toleransın 3, 6 ve 10. günde tail flick testinde henüz oluşmadığı ancak hot plate testinde 9. günde oluştuğu belirlendi (Şekil 12).



Şekil 12. Morfinin analjezik etkisine tolerans gelişmesinin tail flick (A) ve hot plate (B) testlerinde gösterilmesi.

MOE: Maksimal olası etki.

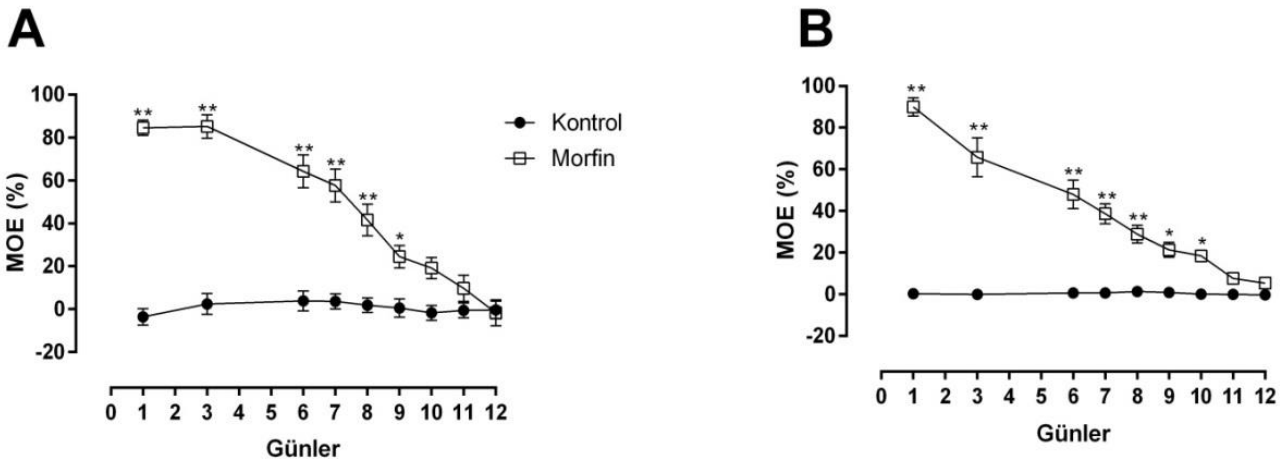
Morfin: 10 mg/kg/s.k. 2x1; **Kontrol (SF):** 0,1 ml/10 gr/s.k. 2x1.

Tail flick testi için: *p<0,05, **p<0,001, ***p<0,0001 aynı günkü kontrol grubuna göre, Two Way ANOVA, *post hoc* Bonferroni-t test.

Hot plate testi için: *p<0,01, **p<0,001, ***p<0,0001 aynı günkü kontrol grubuna göre, Two Way ANOVA, *post hoc* Bonferroni-t test.

On İki Günlük Morfin Kullanımına Tolerans Gelişimi

Morfinin 10 mg/kg, s.k. 2x1 uygulanmasıyla analjezik etkisine tail flick testinde 10. günde tolerans gelişirken, hot plate testinde 11. günde tolerans geliştiği belirlendi (Şekil 13).



Şekil 13. Morfinin analjezik etkisine tolerans gelişmesinin tail flick (A) ve hot plate (B) testlerinde gösterilmesi.

MOE: Maksimal olası etki.

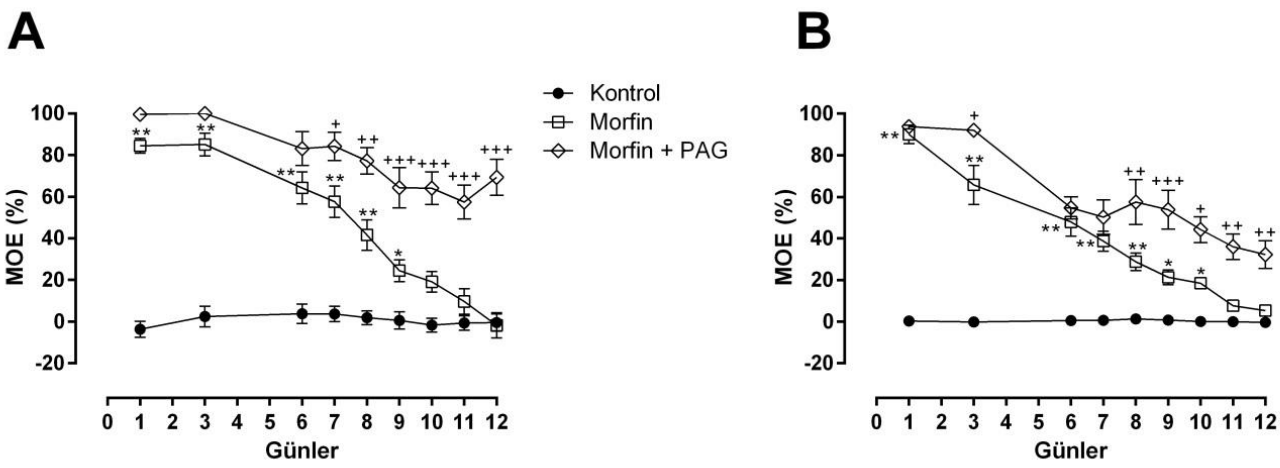
Morfin: 10 mg/kg/s.k. 2x1; **Kontrol (SF):** 0,1 ml/10 gr/s.k. 2x1.

**Tail flick testi için: ***p<0,05, **p<0,0001 aynı günkü kontrol grubuna göre, Two Way ANOVA, *post hoc* Bonferroni-t test.

**Hot plate testi için: ***p<0,01, **p<0,0001 aynı günkü kontrol grubuna göre, Two Way ANOVA, *post hoc* Bonferroni-t test.

Kronik Propargilglisin Kullanımının Tolerans Üzerine Etkisi

On iki gün boyunca 10 mg/kg, s.k. 2x1 morfine ek olarak 30 mg/kg, i.p. 1x1 PAG uygulanmasının morfine tolerans gelişimini önlediği gözlendi (Şekil 14).



Şekil 14. Kronik propargilglisin kullanımının tolerans üzerine etkisinin tail flick (A) ve hot plate (B) testlerinde gösterilmesi.

MOE: Maksimal olası etki.

PAG: Propargilglisin.

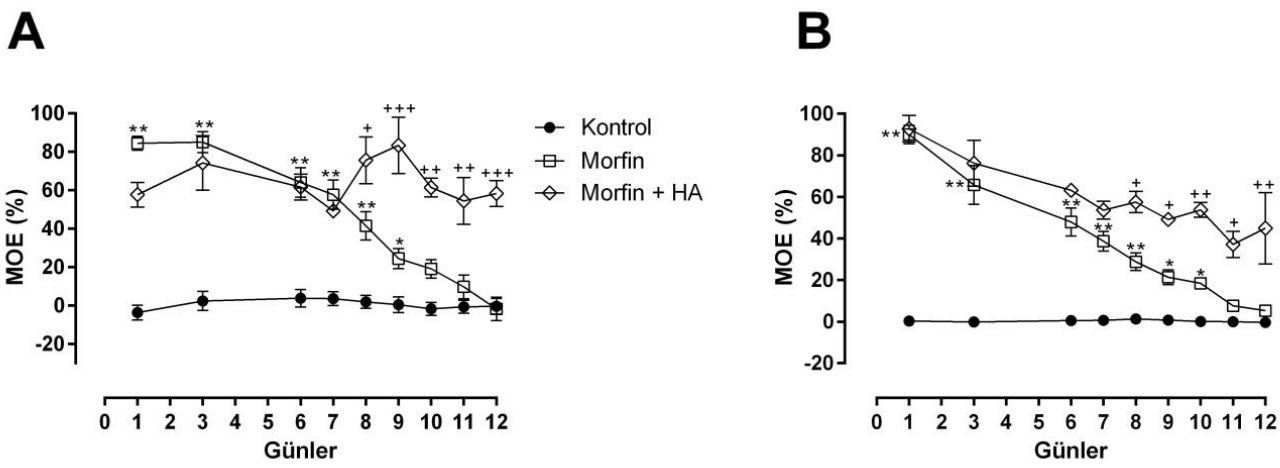
Morfin: 10 mg/kg/s.k. 2x1; **Kontrol (SF):** 0,1 ml/10 gr/s.k. 2x1; **PAG:** 30 mg/kg/i.p. 1x1.

**Tail flick testi için: ***p<0,05, **p<0,0001 aynı günkü kontrol grubuna göre, $^{+}$p<0,05, $^{++}$p<0,001, $^{+++}$p<0,0001 morfin grubuna göre, Two Way ANOVA, *post hoc* Bonferroni-t test.

**Hot plate testi için: ***p<0,01, **p<0,0001 aynı günkü kontrol grubuna göre, $^{+}$p<0,05, $^{++}$p<0,01, $^{+++}$p<0,001 morfin grubuna göre, Two Way ANOVA, *post hoc* Bonferroni-t test.

Kronik Hidroksilamin Kullanımının Tolerans Üzerine Etkisi

On iki gün boyunca 10 mg/kg, s.k. 2x1 morfine ek olarak 12,5 mg/kg, i.p.1x1 HA uygulanmasının morfine tolerans gelişimini önlediği gözlendi (Şekil 15).



Şekil 15. Kronik hidroksilamin kullanımının tolerans üzerine etkisinin tail flick testinde (A) ve hot plate testinde (B) gösterilmesi.

MOE: Maksimal olası etki.

HA: Hidroksilamin.

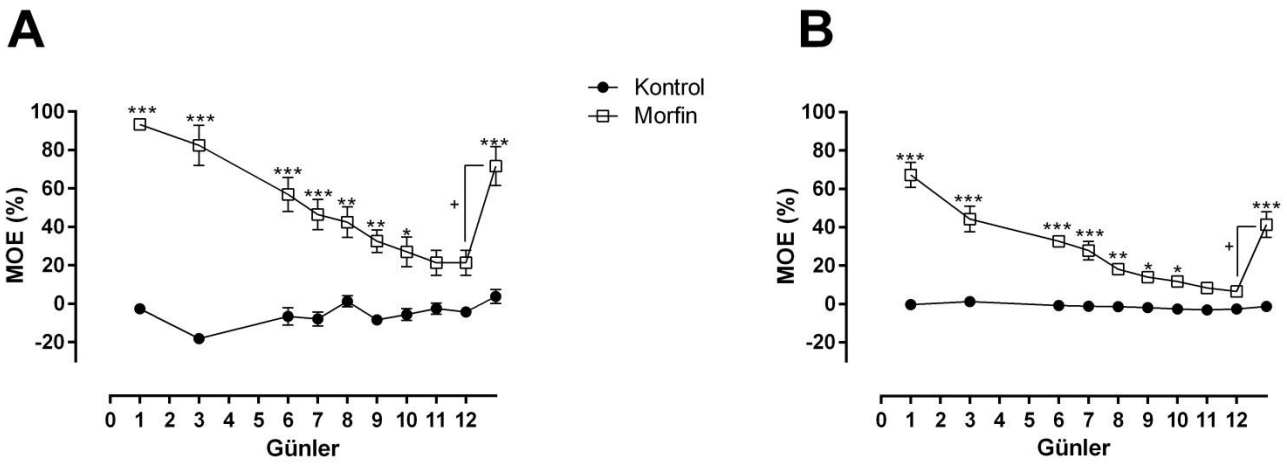
Morfin: 10 mg/kg/s.k. 2x1; **Kontrol (SF):** 0,1 ml/10 gr/s.k. 2x1; **HA:** 12,5 mg/kg/i.p. 1x1.

**Tail flick testi için: ***p<0,05, **p<0,0001 aynı günkü kontrol grubuna göre, $^{+}$p<0,05, $^{++}$p<0,001, $^{+++}$p<0,0001 morfin grubuna göre, Two Way ANOVA, *post hoc* Bonferroni-t test.

**Hot plate testi için: ***p<0,01, **p<0,0001 aynı günkü kontrol grubuna göre, $^{+}$p<0,01, $^{++}$p<0,0001 morfin grubuna göre, Two Way ANOVA, *post hoc* Bonferroni-t test.

Akut Propargilglisin Kullanımının Tolerans Üzerine Etkisi

On ikinci gün tek doz PAG (30 mg/kg, i.p.) uygulanmasının morfin toleransını önlediği ($^{+}$p<0,0001), kontrol grubunda ise istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık oluşturmadığı gözlendi (Şekil16).



Şekil 16. Akut propargilglisin kullanımının tolerans üzerine etkisinin tail flick (A) ve hot plate (B) testlerinde gösterilmesi.

MOE: Maksimal olası etki.

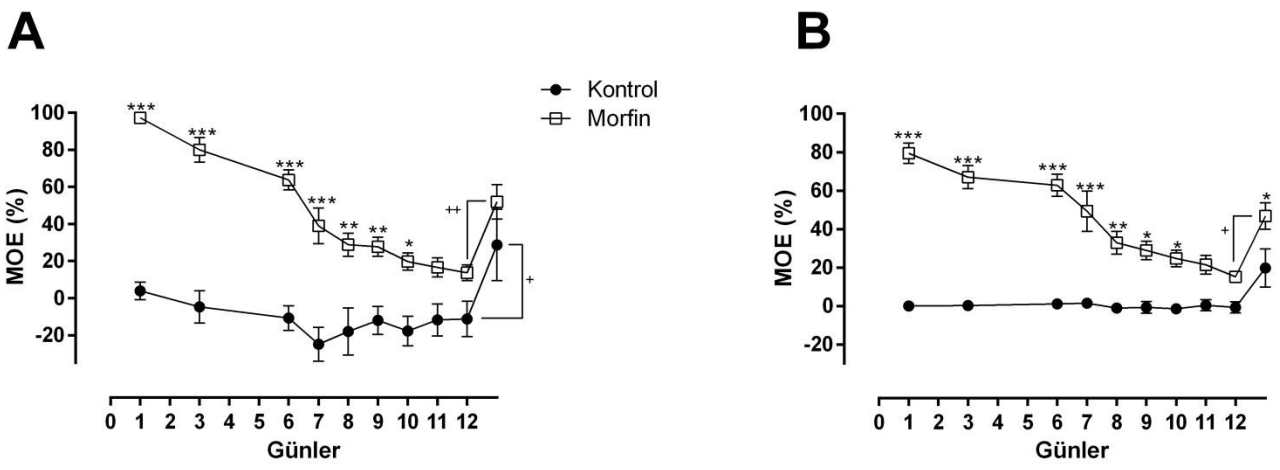
Morfin: 10 mg/kg/s.k. 2x1; **Kontrol (SF):** 0,1 ml/10 gr/s.k. 2x1; **PAG:** 30 mg/kg/i.p. 1x1.

Tail flick testi için: *p<0,01, **p<0,001, ***p<0,0001 aynı günkü kontrol grubuna göre, $^{+}$p<0,0001 grup içi karşılaştırma, Two Way ANOVA, *post hoc* Bonferroni-t test.

Hot plate testi için: p<0,01, **p<0,001, ***p<0,0001 aynı günkü kontrol grubuna göre, $^{+}$p<0,0001 grup içi karşılaştırma, Two Way ANOVA, *post hoc* Bonferroni-t test.

Akut Hidroksilamin Kullanımının Tolerans Üzerine Etkisi

On ikinci gün tek doz HA (12,5 mg/kg, i.p.) uygulanmasının tail flick testinde kontrol ve morfin grubunda istatistiksel olarak anlamlı düzeyde antinosiseptif etkinlik gösterdiği ($^{+}p<0,01$ kontrol; $^{++}p<0,001$ morfin); hot plate testinde ise sadece morfin grubunda istatistiksel anlamlı etki oluşturduğu gözlendi ($^{+}p<0,0001$), kontrol grubunda ise anlamlı olmasa da bir artış görüldü. HA'nın sadece morfin gruplarında değil, kontrol gruplarında da %MOE değerlerini yukarı çekmesi HA'nın akut etkisinin tolerans üzerine etkiden ziyade antinosiseptif etkiden kaynaklandığını düşündürmektedir (Şekil 17).



Şekil 17. Akut hidroksilamin kullanımının tolerans üzerine etkisinin tail flick (A) ve hot plate (B) testlerinde gösterilmesi.

MOE: Maksimal olası etki.

Morfin: 10 mg/kg/s.k. 2x1; **Kontrol (SF):** 0,1 ml/10 gr/s.k. 2x1; **HA:** 12,5 mg/kg/i.p. 1x1.

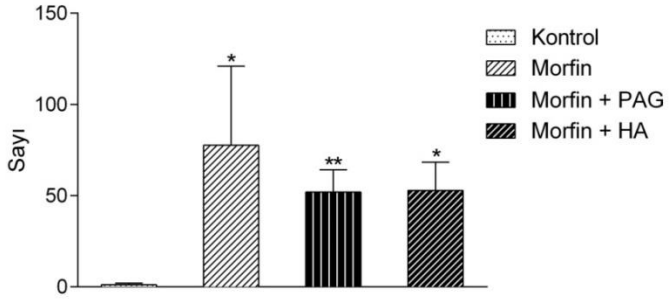
**Tail flick testi için: ***p<0,01, **p<0,001, ***p<0,0001 aynı günkü kontrol grubuna göre, $^{+}p<0,01$, $^{++}p<0.001$ grup içi karşılaştırma, Two Way ANOVA, *post hoc* Bonferroni-t test.

**Hot plate testi için: ***p<0,01, **p<0,001, ***p<0,0001 aynı günkü kontrol grubuna göre, $^{+}p<0,0001$, grup içi karşılaştırma, Two Way ANOVA, *post hoc* Bonferroni-t test.

MORFİN BAĞIMLILIĞININ GELİŞMESİ

Morfin Bağımlılığı Üzerine Kronik Propargilglisin ve Hidroksilamin Kullanımının Etkileri

Kronik PAG ve HA kullanımının morfin bağımlılığı üzerine istatistiksel olarak anlamlı bir etki göstermediği belirlendi (Şekil 18).



Şekil 18. Kronik propargilglisin ve hidroksilamin kullanımı sonrasında nalokson uygulamasıyla farelerin sıçrama sayıları.

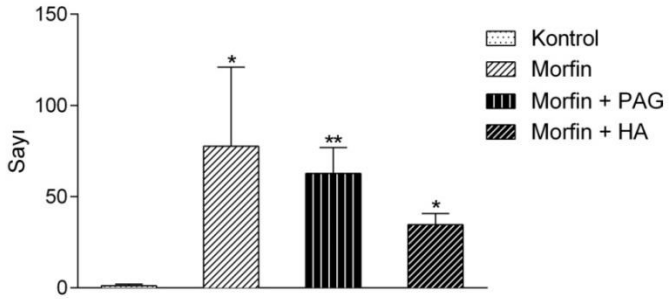
PAG: Propargilglisin; **HA:** Hidroksilamin.

Morfin: 10 mg/kg/s.k. 2x1; **Kontrol (SF):** 0,1 ml/10 gr/s.k. 2x1; **PAG:** 30 mg/kg/i.p 1x1; **HA:** 12,5 mg/kg/i.p. 1x1.

*****p<0,05, **p<0,01 kontrol grubuna göre, Kruskal-Wallis test *post hoc* Dunn's testi.

Morfin Bağımlılığı Üzerine Akut Propargilglisin ve Hidroksilamin Kullanımının Etkileri

Akut PAG ve HA kullanımının morfin bağımlılığı üzerine istatistiksel olarak anlamlı bir etki göstermediği belirlendi (Şekil 19).



Şekil 19. Akut propargilglisin ve hidroksilamin kullanımı sonrasında nalokson uygulamasıyla farelerin sıçrama sayıları.

PAG: Propargilglisin; **HA:** Hidroksilamin.

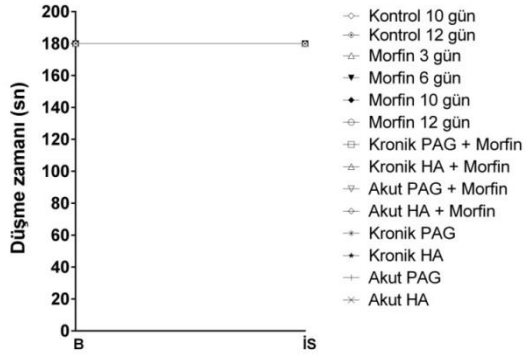
Morfin: 10 mg/kg/s.k. 2x1; **Kontrol (SF):** 0,1 ml/10 gr/s.k. 2x1; **PAG:** 30 mg/kg/i.p 1x1; **HA:** 12,5 mg/kg/i.p. 1x1.

*****p<0,05, **p<0,01 kontrol grubuna göre, Kruskal-Wallis test *post hoc* Dunn's testi.

MOTOR KOORDİNASYONUN DEĞERLENDİRİLMESİ

Tolerans Gruplarında

Tolerans gruplarında motor koordinasyon değerlendirilmesinde bazal ölçümlere göre istatistiksel açıdan bir farklılık gözlenmedi (Şekil 20).



Şekil 20. Tolerans gruplarında motor koordinasyonun rota rod testiyle değerlendirilmesi.

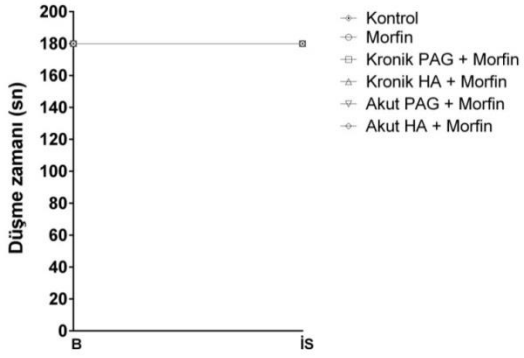
B: Bazal; **İS:** İlaç sonrası.

PAG: Propargilglisin; **HA:** Hidroksilamin.

Morfin: 10 mg/kg/s.k. 2x1; **Kontrol (SF):** 0,1 ml/10 gr/s.k. 2x1; **PAG:** 30 mg/kg/i.p 1x1; **HA:** 12,5 mg/kg/i.p. 1x1.

Bağımlılık Gruplarında

Bağımlılık gruplarında motor koordinasyon değerlendirilmesinde bazal ölçümlere göre istatistiksel açıdan bir farklılık gözlenmedi (Şekil 21).



Şekil 21. Bağımlılık gruplarında motor koordinasyonun rota rod testiyle değerlendirilmesi.

B: Bazal; **İS:** İlaç sonrası.

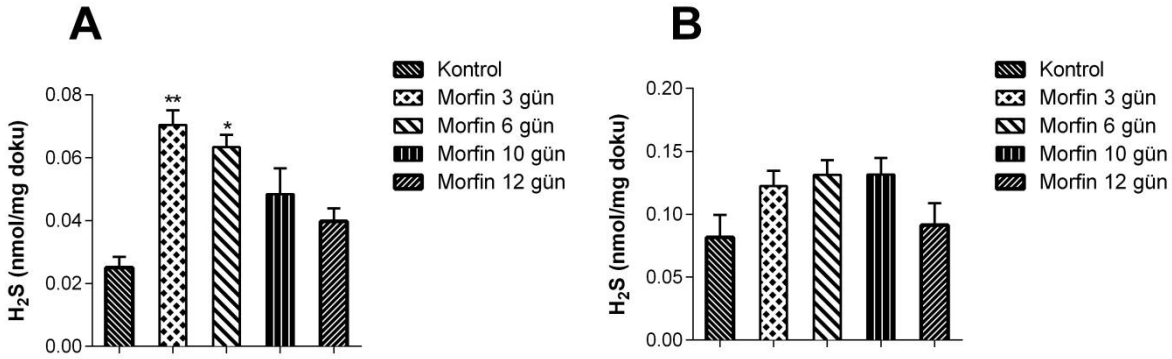
PAG: Propargilglisin; **HA:** Hidroksilamin.

Morfin: 10 mg/kg/s.k. 2x1; **Kontrol (SF):** 0,1 ml/10 gr/s.k. 2x1; **PAG:** 30 mg/kg/i.p 1x1; **HA:** 12,5 mg/kg/i.p. 1x1.

HİDROJEN SÜLFÜR DÜZEYİ ÖLÇÜMÜ

Tolerans Gelişim Sürecinde Beyin Ve Omurilik Hidrojen Sülfür Düzeyleri

Morfin gruplarında hidrojen sülfür düzeyleri hem beyin hem de omurilik dokusunda genel olarak artmış gözükmektedir. Ancak bu artış sadece beyin dokusunda 3. ($p<0,001$) ve 6. ($p<0,01$) günlerde istatistiksel olarak anlamlı düzeydedir (Şekil 22).



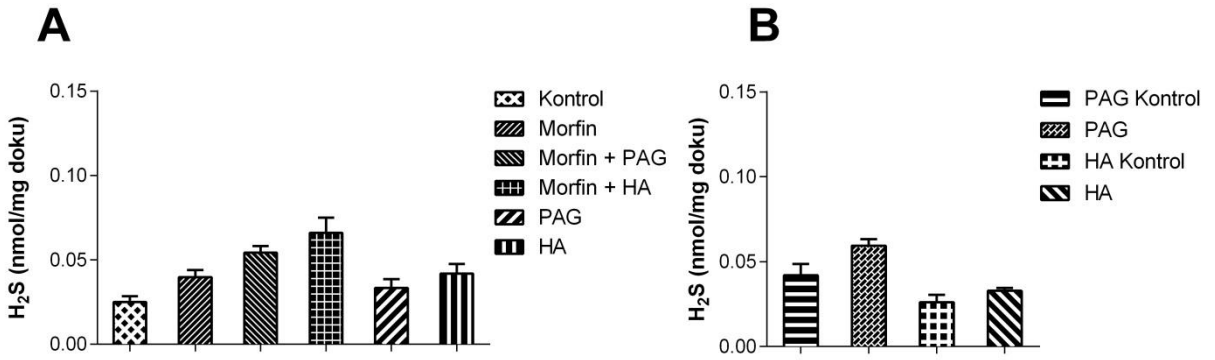
Şekil 22. Morfin toleransının gelişim sürecinde beyin (A) ve omurilik (B) hidrojen sülfür düzeyleri.

Morfin: 10 mg/kg/s.k. 2x1; **Kontrol (SF):** 0,1 ml/10 gr/s.k. 2x1.

*****p<0,01, **p<0,001 kontrol grubuna göre, Kruskal-Wallis test *post hoc* Dunn's testi.

Tolerans Gruplarında

Beyin düzeyleri: 12. gün hidrojen sülfür düzeylerinde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmadı (Şekil 23).

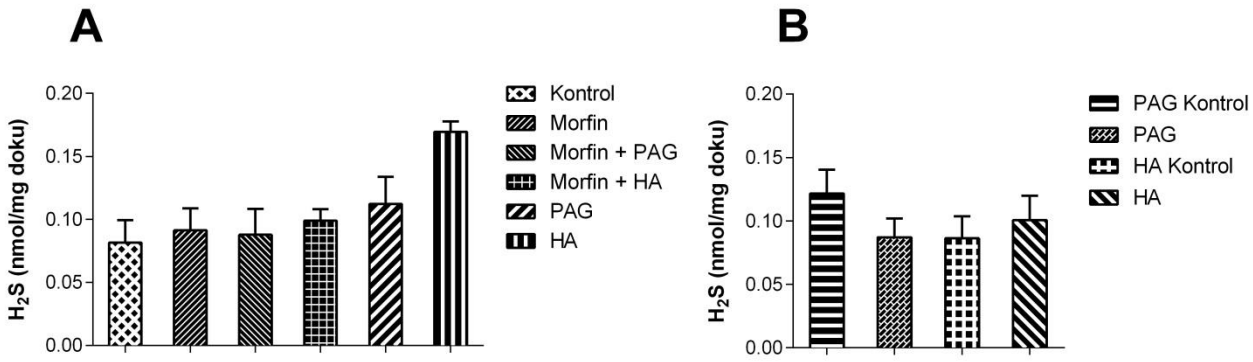


Şekil 23. Morfin toleransında beyin hidrojen sülfür düzeyleri ve bu düzeyler üzerine hidrojen sülfür sentaz enzim inhibitörlerinin kronik (A) ve akut (B) etkileri.

PAG: Propargilglisin; **HA:** Hidroksilamin.

Morfin: 10 mg/kg/s.k. 2x1; **Kontrol (SF):** 0,1 ml/10 gr/s.k. 2x1; **PAG:** 30 mg/kg/i.p 1x1; **HA:** 12,5 mg/kg/i.p. 1x1.

Omurilik düzeyleri: 12. gün hidrojen sülfür düzeylerinde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmadı (Şekil 24).



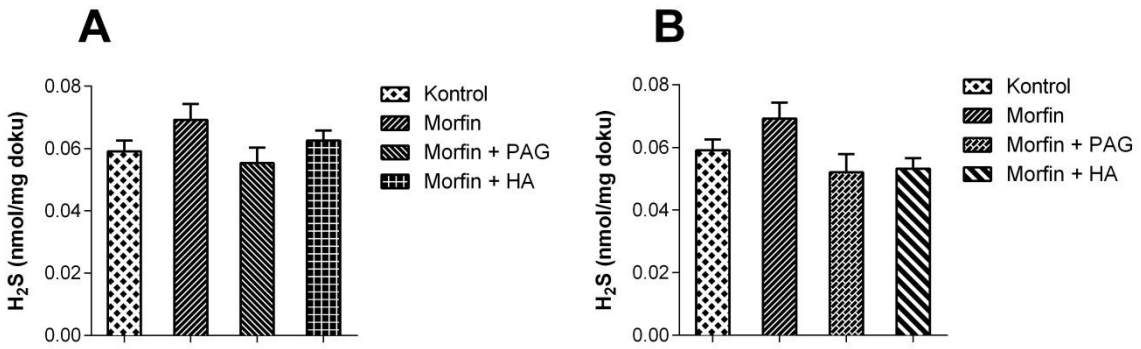
Şekil 24. Morfin toleransında omurilik hidrojen sülfür düzeyleri ve bu düzeyler üzerine hidrojen sülfür sentaz enzim inhibitörlerinin kronik (A) ve akut (B) etkileri.

PAG: Propargilglisin; **HA:** Hidroksilamin.

Morfin: 10 mg/kg/s.k. 2x1; **Kontrol (SF):** 0,1 ml/10 gr/s.k. 2x1; **PAG:** 30 mg/kg/i.p 1x1; **HA:** 12,5 mg/kg/i.p. 1x1.

Bağımlılık Gruplarında

Beyin düzeyleri: 12. gün hidrojen sülfür düzeylerinde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmadı (Şekil 25).

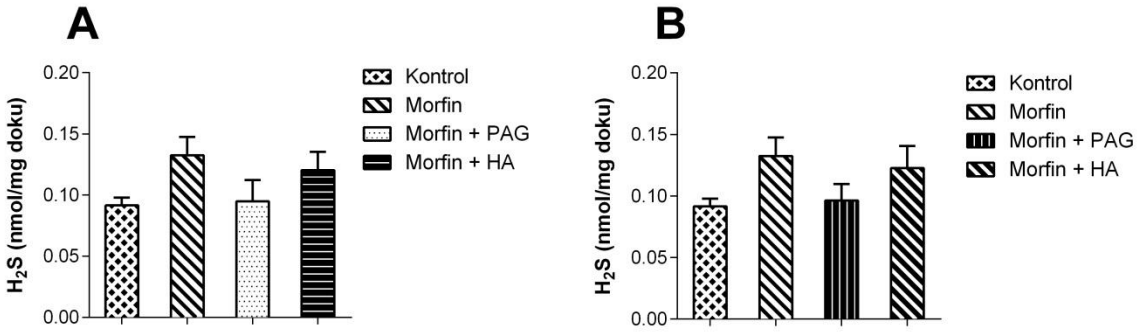


Şekil 25. Morfin bağımlılığında beyin hidrojen sülfür düzeyleri ve bu düzeyler üzerine hidrojen sülfür sentaz enzim inhibitörlerinin kronik (A) ve akut (B) etkileri.

PAG: Propargilglisin; **HA:** Hidroksilamin.

Morfin: 10 mg/kg/s.k. 2x1; **Kontrol (SF):** 0,1 ml/10 gr/s.k. 2x1; **PAG:** 30 mg/kg/i.p 1x1; **HA:** 12,5 mg/kg/i.p. 1x1.

Omurilik düzeyleri: 12. gün hidrojen sülfür düzeylerinde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmadı (Şekil 26).



Şekil 26. Morfin bağımlılığında omurilik hidrojen sülfür düzeyleri ve bu düzeyler üzerine hidrojen sülfür sentaz enzim inhibitörlerinin kronik (A) ve akut (B) etkileri.

PAG: Propargilglisin; **HA:** Hidroksilamin.

Morfin: 10 mg/kg/s.k. 2x1; **Kontrol (SF):** 0,1 ml/10 gr/s.k. 2x1; **PAG:** 30 mg/kg/i.p 1x1; **HA:** 12,5 mg/kg/i.p. 1x1.

TARTIŞMA

Ağrı vücutta oluşabilecek doku hasarına karşı koruyucu bir yanıttır. Opioid ilaçlar, terapötik dozda uygulandıklarında şiddetli ve kronik ağrının tedavisinde kullanılan en etkili ilaçlar arasında yer almaktadır. Fakat analjezik etkilerine karşı tolerans ve bağımlılık oluşması bu ilaçların uzun süreli kullanılmasını kısıtlamaktadır. Toleransı ortadan kaldırmak için yüksek dozlarda kullanılmaları gerekmektedir. Opioid ilaçların yüksek dozlarda kullanılmaları solunum depresyonu, bulantı, kabızlık, bağımlılık vb. advers etkilerinin ortaya çıkmasına yol açmaktadır.

Opioidlerin analjezik etkilerine tolerans ve bağımlılık gelişimi önlemek için çok sayıda araştırma yapılmış olmasına ve çeşitli mekanizmalar ileri sürülmesine rağmen moleküler temeli henüz tam olarak anlaşılamamıştır. Dolayısı ile günümüzde bu tür ilaçlara karşı gelişen tolerans ve bağımlılık halen önemli bir problem durumundadır.

Opioidlere tolerans gelişiminde rol oynadığı düşünülen mekanizmalar; opioid reseptör desensitizasyonu, reseptör afinitesindeki değişiklikler, reseptörlerin internalizasyonu, reseptör down-regülasyonu, cAMP transdüksiyon sisteminin up-regülasyonu ve sinyal iletim basamaklarındaki değişikliklerdir (59,123-125). Opioid tolerans ve bağımlılığının ortaya çıkmasında NMDA/NO sisteminin anahtar bir rolü olduğuna yönelik çok sayıda çalışma yapılmıştır (1,126,127). NO, nitrik oksit sentaz (NOS) enzimi tarafından L-arginin'den sentezlenir. Glutamat, ağrı iletiminde önemli bir nöromediyatördür. NMDA, iyonotropik bir glutamat reseptörüdür ve merkezi sinir sisteminde yaygın bir şekilde

bulunmaktadır. Glutamat tarafından bu reseptörlerin aktivasyonu hücre içerisine Ca^{2+} girişini uyarır. Kalsiyum kalmoduline bağlanarak NOS aktivitesini arttırır. Sentezlenen NO santral duyarlılaşmada rol oynar (126).

Hidrojen sülfür, vücutta NO ve CO'den sonra saptanmış, memeli dokularında birçok fizyolojik ve patolojik olayların modülasyonunda rolü olan bir gaz mediyatördür. Vücutta başlıca CBS ve CSE enzimleri tarafından, *L*-sistein amino asidinden sentezi gerçekleşmektedir. CBS ekspresyonu, santral sinir sisteminde beyindeki H_2S'nin birincil fizyolojik kaynağı olarak önemlidir. CBS, hipokampus ve serebellumda, serebral korteks ve beyin sapı ile karşılaştırıldığında yüksek oranda eksprese edildiği bulunmuştur (71,81). CSE ise başlıca kardiyovasküler sistem olmak üzere omurilik, karaciğer, böbrek, ileum ve lenfositler gibi pek çok hücre ve dokuda bulunmaktadır (71,91). H_2S'nin tanımlanan ilk fizyolojik etkilerinden biri, damar düz kasını gevşetme yeteneğidir (6,128). Son yirmi yıldır yapılan çalışmalar H_2S'nin inflamasyon ve ağrı gibi birçok patolojik olaylarda önemini göstermiştir (7,129,130).

H_2S'nin birçok hücre tipinde Ca^{2+} homeostazısını etkileme yeteneğinin olduğu, çeşitli doku örneklerinde NO üretimini desteklediği ve endotelyal nitrik oksit sentaz (eNOS) ve nöronal nitrik oksit sentaz (nNOS) aktivitesini kalsiyum bağımlı şekilde düzenlediği bildirilmiştir (131,132). Daha önceki yapılan çalışmalarda H_2S donörü olan NaHS'nin farelerde kolonik mezenterik aferent sinir üzerinde inhibe edici etki gösterdiği bulunmuştur. Benzer şekilde, periferik organlardaki NO'nun nosiseptörün uyarılabilirliğini azalttığı kanıtlanmıştır (133). H_2S'nin, kalsiyum bağımlı yolak üzerinden nNOS'yi aktive ederek NO salıverilmesini kolaylaştırdığı ve böylece kolonik mezenterik aferent sinir üzerinde antinosiseptif etki gösterdiği bulunmuştur (134). Sıçanlar üzerinde yapılan bir diğer çalışmada da eksojen H_2S'nin, kolorektal distansiyonun neden olduğu viseral ağrıyı μ opioid reseptörünü uyararak azalttığı bulunmuştur (135). Bu çalışmalar H_2S'nin periferde antinosiseptif etkisi olduğunu göstermektedir.

H_2S'nin çeşitli voltaj ve ligand kapılı reseptörler üzerine (K^+_{ATP} kanalı, voltaj kapılı T ve L-tipi Ca^{2+} kanalları, TRPA1-TRPV1 kanallarını ve NMDA reseptörü) ve aynı zamanda transkripsiyon faktörleri ve protein kinaz üzerine de etkileri olduğu bulunmuştur (71,93,99,112,136,137). H_2S nosiseptör nöronlarında, $Ca_V3.2$ T-tipi Ca^{2+} kanallarının ve TRPA1 kanallarının fonksiyonunu arttırarak nöronal uyarılmaya ve ardından ağrı hissine veya hiperaljezi/allodiniye yol açmaktadır (112,138,139). Cunha

ve ark. (7) H_2S'nin inflamatuvar hipernosisepsiyonda; bir yandan nötrofil göçünü artırarak (up-regülasyon) endojen bir nosiseptif etki oluşturduğunu diğer yandan ise K^+_{ATP} kanallarını direkt bloke ederek nosiseptör duyarlılığını azalttığını ve böylece dual rol oynadığını göstermişlerdir. Bir başka çalışmada da benzer şekilde sıçanlarda formalin ile oluşturulan orafasiyal ağrı modelinde endojen olarak üretilen H_2S'nin, muhtemelen T-tipi Ca^{+2} kanalları üzerinden nosiseptif bir etki gösterirken, eksojen olarak uygulanan H_2S'nin ise K^+_{ATP} kanallarının aracılık ettiği antinosiseptif etkilere neden olduğu gösterilmiştir (6). Çalışmamızda endojen H_2S üretiminin akut kullanılan HA ile inhibe edilmesiyle gözlenen antinosiseptif etki bu verileri desteklemektedir; ancak akut PAG kullanımıyla aynı etki gözlenmemiştir. Bu durum iki enzim inhibitörünün etkiledikleri enzimlerin dağılım yerlerinin farklılık göstermesinden kaynaklanıyor olabilir. CBS daha fazla santral sinir sisteminde dağılım gösterirken, CSE ise periferde yaygın bir dağılım göstermektedir.

Kawabata ve ark. (113) çalışmalarında, periferik dokuya NaHS veya endojen H_2S kaynağı olan *L*-sistein'in intraplantar (i.pl.) olarak verilmesi sonucunda oluşan H_2S'nin büyük olasılıkla primer aferent nöronlarda bulunan T-tipi Ca^{2+} kanallarını modüle ederek sıçan arka pençesinde hiperaljezi geliştirdiğini bulmuşlardır. Oluşan hiperaljeziyi, T-tipi Ca^{2+} kanal blokörü olan mibefradil, yükseltgen bir kimyasal olan 5,5'-ditiyo-bis-(2-nitrobenzoik asit) (DTNB) ve PAG ile önemli ölçüde azalttıklarını da bildirmişlerdir.

H_2S'nin etkilediği çeşitli iyon kanalları ve reseptörlerin morfinin analjezik etkisine tolerans gelişiminde ve morfine bağımlılık gelişiminde rol oynayabilecekleri düşünülebilir. Morfin tolerans ve bağımlılığının çeşitli aşamalarını görebilmek amacıyla günde iki defa 10 mg/kg s.k. olarak morfin verilen tolerans ve bağımlılık grupları oluşturduk. Morfinin analjezik etkisinde ilk günden itibaren sürekli bir azalma saptadık. Günde iki kez s.k. 10 mg/kg morfin uygulanması sonucunda, tail flick ve hot plate testlerinde yaklaşık 11-12. günlerde morfinin analjezik etkisine tam bir tolerans geliştiğini saptadık. Bölümümüzde Gunduz ve ark. (2) tarafından yapılan diğer bir çalışmada morfinin analjezik etkisine tolerans gelişiminin ortalama 6-9. günlerde oluştuğu gösterilmiştir. Hamdy ve ark. (140) fareler üzerinde yaptıkları benzer bir çalışmada bupropion'un morfin tolerans ve bağımlılık gelişimindeki rolünü incelemişler ve morfine toleransın 9. günde oluştuğunu tespit etmişlerdir. Morfinin antinosiseptif etkisine karşı gelişen tolerans ve bağımlılık üzerine glukozamin'in

etkisinin incelendiği bir başka çalışmada da morfine toleransın 7. günde oluştuğu bulunmuştur (141). Tolerans gelişim süresinde ortaya çıkan bu farklılıklar, kullanılan deney hayvanlarının yaşlarının, cinslerinin veya türlerinin farklı olmasından, morfin enjeksiyon saatleri ve dozlarının birbirinden farklı olmasından veya laboratuvar koşullarındaki farklılıklardan kaynaklanıyor olabilir.

Morfine tolerans gelişmesi ile nöropatik ağrı oluşum mekanizmaları arasında benzerlik olduğunu gösteren çalışmalar bulunmaktadır (142,143). H_2S'nin $Ca_v3.2$ T-tipi Ca^{2+} kanalları ve TRP kanalları üzerinden nosiseptif ve nöropatik ağrıya katkısı olduğu ve morfin tolerans-bağımlılığında bu kanalların da rol oynadığı düşünülmektedir (12). Biz de bu düşünceden yola çıkarak endojen H_2S'nin üretiminin azaltılmasının morfine tolerans ve bağımlılık oluşması üzerine etkisini araştırdık. Tolerans ve bağımlık oluşum sürecinde, 12 gün boyunca günde iki kez morfine ek olarak tek doz intraperitoneal PAG ve HA'nın kronik uygulanmasının yapılan antinosiseptif testler sonucunda morfine tolerans gelişiminin önlediğini gördük.

Literatürde nöropatik ağrıda H_2S'nin rolü olduğunu gösteren çeşitli çalışmalar mevcuttur. Endojen H_2S'nin, nöropatik ağrının gelişiminde rol oynayan $Ca_v3.2$ T-tipi Ca^{2+} kanallarını up-regüle ettiği ve TRPA1 iyon kanalını aktive ettiği bildirilmiştir (5,12,120). Streptozotosin ile oluşturulan diabetik periferik nöropatide H_2S'nin nosiseptif etkisinin olduğu gösterilmiştir. CBS veya CSE'nin sırasıyla HA ve PAG ile inhibisyonunu ile H_2S'nin sentezinin azaltılmasının diyabet ile ilişkili periferik nöropati tedavisi için önemli bir hedef olabileceği rapor edilmiştir (10). Fakat HA'nın antinosiseptif etkinliğinin sadece CBS enzimini inhibe etmek yoluyla olmayıp, ayrıca NO salıverilmesi gibi diğer non-spesifik yolaklar üzerinden de olabileceği akılda tutulmalıdır (10,144,145).

Takahashi ve ark. (12) sıçanlarda L5 spinal sinir hasarı (L5SNC) ile oluşturulan nöropatik ağrı modelinde H_2S'nin üretiminin PAG ile inhibisyonunun ve $Ca_v3.2$ kanalının mibefradil ile bloke edilmesinin hiperaljezi-allodoni gelişimini tersine çevirdiğini görmüşlerdir. Buna bağlı olarak CSE ve $Ca_v3.2$ T-tipi Ca^{2+} kanallarının nöropatik ağrının tedavisi için terapötik ilaçların geliştirilmesinde potansiyel hedef olabileceği sonucuna varmışlardır. Bir başka çalışmada H_2S'nin CBS inhibitörü ile azaltılmasının, nöropatik ağrı oluşumunda rol oynayan ERK1/2, CREB ve NF-κB(p65)'nin aktivasyonunun inhibe edildiğini ve kronik siyatik sinir hasarı modelinde mekanik ve termal hiperaljeziyi önlediği gösterilmiştir (5).

Sıçan, insan ve inek beyin dokularında H_2S'nin yüksek konsantrasyonda bulunduğunu (50-160 μmol/L) gösteren çalışmalar olmakla beraber, daha yeni çalışmalarda nanomolar konsantrasyonlarda bulunduğu gösterilmiştir (72,146). Tolerans ve bağımlılık gruplarımızdaki elde ettiğimiz omurilik H_2S düzeyi ile Gui ve ark. (5) $L_{4\text{-}6}$ omurilikteki endojen CBS/H_2S yolağı ile nöropatik ağrı arasındaki ilişkiyi araştıran çalışmalarından elde ettikleri H_2S doku düzeyi ile uyumludur.

Yang ve ark. (147) farelerde morfin kullanımı sonrası nalokson kaynaklı geri çekilme sıçramalarını, eksojen H_2S uygulanması ile önemli ölçüde azalttığını göstermişlerdir. Opioid bağımlığının gelişiminin azaltılmasında H_2S'nin potansiyel bir rolü olduğunu ve altında yatan mekanizmanın adenilat siklaz (AC)/cAMP yolağının inhibisyonundan kaynaklı olabileceğini rapor etmişlerdir. Çalışmamızda kronik ve akut uygulanan PAG ve HA'nın morfin bağımlılığı üzerine davranış deneylerinde etkisinin olmadığını ve beyin ve omurilik H_2S düzeylerinde de anlamlı farklılık oluşturmadıklarını gözlemledik. Çalışmamızda beklediğimiz şekilde beyin ve omurilik H_2S düzeylerinde azalma oluşmadı. Beyin ve omurilik H_2S düzeylerinde azalma belki her iki enzimin birlikte inhibe edilmesiyle sağlanabilir. Yang ve ark. (147) yaptıkları çalışmada normal düzeylerin üzerinde olan H_2S'nin bağımlılığı önlediğini düşünülecek olursak H_2S düzeylerin normal düzeylerin altına indirilmesinin de etkili olabileceğini düşünebiliriz.

Fareler üzerinde yapmış olduğumuz çalışmamızda tekrarlayan dozlarda morfin uygulanması ile tolerans oluştuğunu ve oluşan toleransın kronik ve akut PAG veya kronik HA kullanımı ile önlendiğini belirledik. Ancak PAG ve HA'nın ortaya çıkardığı morfin toleransı üzerine önleyici etkilerini beyin ve omurilik H_2S düzeylerindeki değişimle açıklayamadık. PAG ve HA'nın toleransı önleyici etkisinde çalışmamızda değerlendirmediğimiz periferik dokulardaki H_2S düzeylerini azaltıcı etkileri veya H_2S'den düzeylerinden bağımsız NO üzerine direk etkilerinden kaynaklanabileceği düşünülebilir. Tüm bu veriler göz önüne alınırsa hidrojen sülfür sentaz enzim inhibitörlerinin morfin toleransının önlenmesinde ve toleransın mekanizmasının anlaşılmasında rol alabileceğini düşünmekteyiz. Özellikle periferik dokulardaki H_2S düzeylerinin incelendiği yeni çalışmalarla sentaz enzim inhibitörlerinin etki yerleri daha iyi anlaşılabilir. Morfin bağımlılığında her iki sentaz enziminin birlikte inhibe edileceği çalışmaların yapılmasıyla bağımlılık üzerine H_2S'nin etkisi daha iyi anlaşılabilir.

SONUÇLAR

Kronik morfin kullanımı sırasında ortaya çıkan, morfin ve benzeri ilaçların kullanımını ciddi olarak kısıtlayan bağımlılık ve toleransın, oluşum mekanizmasına endojen H_2S'nin etkisini araştırdığımız çalışmamızda aşağıdaki sonuçlar elde edilmiştir.

- Morfinin subkutan olarak günde iki kere 10 mg/kg tekrarlayan injeksiyonunu takiben antinosiseptif etkisi ilk günden itibaren azalmaya başladı, yaklaşık 11, 12. günlerde tail flick ve hot plate testlerinde tam bir tolerans oluştuğu görüldü (Şekil 13).
- Kronik PAG ve HA kullanımı morfine tolerans gelişimini önledi (Şekil 14, 15).
- Akut PAG uygulanması morfine karşı gelişen toleransı önledi (Şekil 16).
- Akut HA uygulamasının sadece morfin grubunda değil, kontrol grubunda da antinosiseptif etki oluşturduğu görüldü. Bu bulgu, akut kullanılan HA'nın tolerans üzerine etkinlik göstermekten ziyade antinosiseptif etkinliğinin ön planda olduğunu düşündürmektedir (Şekil 17).
- Tolerans gelişim sürecinde (3-6-10-12. günler) hidrojen sülfür düzeylerinin hem beyin hem de omurilik dokusunda arttığı belirlendi. Ancak bu artış sadece beyin dokusunda 3. ($p<0,001$) ve 6. ($p<0,01$) günlerde istatistiksel olarak anlamlı düzeydeydi (Şekil 22).
- Tolerans gruplarında hidrojen sülfür sentaz enzim inhibitörlerinin (PAG, HA) kronik ve akut uygulamasının, beyin ve omurilik H_2S düzeylerinde kontrol

gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı farklılık oluşturmadığı saptandı (Şekil 23, 24).

- Antinosisepsiyon testlerinin tamamlanmasından sonra 12. günde nalokson uygulaması ile denekler yoksunluk sendromuna sokuldu. Bağımlı farelerde yoksunluğun göstergesi olan sıçrama sayısı kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksekti ($p<0,05$).
- Kronik ve akut PAG ve HA kullanımının kontrol gruplarına göre morfin bağımlılığı üzerine istatistiksel olarak anlamlı bir etki oluşturmadığı belirlendi (Şekil 18, 19).
- Bağımlılık gruplarında hidrojen sülfür sentaz enzim inhibitörlerinin (PAG, HA) kronik ve akut uygulamasının, beyin ve omurilik H_2S düzeylerinde kontrol gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı farklılık oluşturmadığı saptandı (Şekil 25, 26).
- Morfin ve hidrojen sülfür sentaz enzim inhibitörlerinin kullanılan dozlarında motor fonksiyonu bozucu etkisinin olmadığı görüldü (Şekil 20, 21).

Tüm sonuçlar ele alındığında morfin toleransını önlemede kronik ve akut kullanılan PAG'ın ve kronik kullanılan HA'nın etkili olduğu görülmektedir. Ancak hidrojen sülfür düzeylerinde beklenen değişimlerin görülmemesi nedeniyle PAG ve HA'nın etki yeri (omurilik ya da beyin düzeyi) belirlenemedi. Ölçtüğümüz hidrojen sülfür doku (beyin, omurilik) düzeyleri literatürle uyumlu olmakla birlikte standart sapma değerlerimiz yüksekti. Serbest sinir sonlanmaları düzeyindeki doku hidrojen sülfür düzeylerinin ölçülmesi PAG ve HA'nın etki yeri için yeni bir hedef olabilir.

ÖZET

Hidrojen sülfür ağrı oluşumu mekanizmalarında rol aldığı gösterilmiş olan endojen bir gaz mediyatördür Vücutta başlıca sistatyonin-*β*-sentaz ve sistatyonin-*γ*-liyaz enzimleri tarafından, *L*-sistein amino asidinden sentez edilir. Bu çalışmada, tolerans ve bağımlılığın gelişiminin çeşitli zamanlarında beyin ve omurilik hidrojen sülfür düzeylerindeki değişimi tespit etmeyi ve hidrojen sülfürün endojen olarak üretiminin inhibe edilmesinin tolerans ve bağımlılık oluşumu üzerine etkisinin olup olmadığını belirlemeyi amaçladık. Morfine tolerans ve bağımlılık, 12 gün boyunca günde iki kez morfin (10 mg/kg) subkutan enjeksiyonuyla oluşturuldu. Fiziksel bağımlılık 12. gün tek doz naloksonun (5 mg/kg) intraperitoneal verilmesini takiben meydana gelen yoksunluk sendromu bulgusu olan sıçrama hareketinin 20 dakika süresince sayılmasıyla belirlendi. Sistatyonin-*γ*-liyaz inhibitörü olarak propargilglisin (30 mg/kg, i.p. 1x1) ve sistatyonin-*β*-sentaz inhibitörü olarak da hidroksilamin (12,5 mg/kg, i.p.1x1) kullanılmıştır. Tail flick ve hot plate testleri morfinin antinosiseptif etkisinin kaybı ve tolerans gelişimini belirlemek için kullanıldı. Kronik ve akut kullanılan propargilglisinin ve kronik kullanılan hidroksilaminin morfine tolerans gelişimini önlediği belirlendi. Tolerans gruplarında hidrojen sülfür sentaz enzim inhibitörlerinin kronik ve akut uygulamasının, beyin ve omurilik hidrojen sülfür düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı farklılık oluşturmadığı saptandı. Kronik ve akut propargilglisin ve hidroksilamin kullanımının morfin bağımlılığı üzerine bir etki oluşturmadığı; beyin omurilik hidrojen sülfür düzeylerinde de farklılık oluşturmadığı belirlendi. Morfin toleransını önlemede kronik ve akut kullanılan propargilglisinin

ve kronik kullanılan hidroksilaminin etkili olduğu görülmüştür ancak etkinin yeri (omurilik ya da beyin düzeyi) belirlenememiştir. Tüm bu veriler doğrultusunda hidrojen sülfür sentaz enzim inhibitörleri morfin toleransının önlenmesinde ve toleransın mekanizmasının anlaşılmasında rol alabilir.

Anahtar kelimeler: Morfin, tolerans, bağımlılık, hidrojen sülfür

THE ROLE OF HYDROGEN SULFIDE IN DEVELOPMENT OF TOLERANCE AND DEPENDENCE TO MORPHINE IN MICE

SUMMARY

Hydrogen sulfide is an endogenous gaseous mediator that has been indicated to have a role in pain mechanisms. It is mainly synthesized from the amino acid L-cysteine by cystathionine-*β*-synthase and cystathionine-*γ*-lyase enzymes in the body. In this study, we aimed to detect brain and spinal cord hydrogen sulfide levels during different terms of tolerance and dependence to morphine and to determine the effects of inhibition of endogenous hydrogen sulfide production on the development of tolerance and dependence. Morphine tolerance and dependence was developed with subcutaneous injection of morphine (10 mg/kg) twice daily for 12 days. Physical dependence was determined by counting the jumps for 20 minutes which is a withdrawal symptom occuring after a single dose of naloxone (5 mg/kg) administered intraperitoneally. Propargylglycine (30 mg/kg, i.p. 1x1) was used as a cystathionine-*γ*-lyase inhibitor and hydroxylamine (12,5 mg/kg, i.p.1x1) was used as a cystathionine-*β*-synthase inhibitor. The tail flick and hot plate tests were used to determine the loss of antinociceptive effects of morphine and development of tolerance. It was found that chronic and acute use of propargylglycine and chronic use of hydroxylamine prevent the development of tolerance to morphine. It was determined that chronic and acute administration of hydrogen sulfide synthase

inhibitors does not create a statistically significant difference in hydrogen sulfide levels in brain and spinal cord in tolerance groups. It was also found that in chronic and acute administrations of propargylglycine and hydroxylamine had no effect on morphine dependence; no difference was found in hydrogen sulfide levels in brain and spinal cord. Chronic and acute administrations of propargylglycine and chronic administration of hydroxylamine were found to be effective in preventing morphine tolerance, however its site of action (brain or spinal cord levels) could not be determined. It has been concluded according to the data that hydrogen sulfide synthase inhibitors may take role in preventing morphine tolerance and understanding the mechanism of tolerance.

Keywords: Morphine, tolerance, dependence, hydrogen sulfide

KAYNAKLAR

1. Abdel-Zaher AO, Hamdy MM, Aly SA, Abdel-Hady RH, Abdel-Rahman S. Attenuation of morphine tolerance and dependence by aminoguanidine in mice. Eur J Pharmacol 2006;540(1-3):60-6.

2. Gunduz O, Karadag CH, Ulugol A. Modulatory role of the endogenous nitric oxide synthase inhibitor, asymmetric dimethylarginine (ADMA), in morphine tolerance and dependence in mice. J Neural Transm (Vienna) 2010;117(9):1027-32.

3. Lamberts JT, Rosenthal LD, Jutkiewicz EM, Traynor JR. Role of the guanine nucleotide binding protein, Gαo, in the development of morphine tolerance and dependence. Psychopharmacology 2018;235(1):71-82.

4. Demirel Yılmaz E, Kayaalp SO. Peptid Yapılı Otakoidler, Gaz Otakoidler ve Diğerleri. Kayaalp SO, (Editor). Akılcı Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji. 13. Basım. Ankara: Pelikan Yayıncılık; 2012. cilt 2 s.1311-26.

5. Gui Y, Li A, Qiu B, Chen F, Chen L, Liu D, et al. Endogenous CBS-H2S Pathway Contributes to the Development of CCI-Induced Neuropathic Pain. Neurochem Res 2016;41(6):1381-9.

6. Donatti AF, Araujo RM, Soriano RN, Azevedo LU, Leite-Panissi CA, Branco LG. Role of hydrogen sulfide in the formalin-induced orofacial pain in rats. Eur J Pharmacol 2014;73849-56.

7. Cunha TM, Dal-Secco D, Verri WA, Jr., Guerrero AT, Souza GR, Vieira SM, et al. Dual role of hydrogen sulfide in mechanical inflammatory hypernociception. Eur J Pharmacol 2008;590(1-3):127-35.
8. Predmore BL, Lefer DJ, Gojon G. Hydrogen sulfide in biochemistry and medicine. Antioxid Redox Signal 2012;17(1):119-40.

9. Kimura H. Physiological role of hydrogen sulfide and polysulfide in the central nervous system. Neurochem Int 2013;63(5):492-7.

10. Velasco-Xolalpa ME, Barragan-Iglesias P, Roa-Coria JE, Godinez-Chaparro B, Flores-Murrieta FJ, Torres-Lopez JE, et al. Role of hydrogen sulfide in the pain processing of non-diabetic and diabetic rats. Neuroscience 2013;250786-97.

11. Li L, Bhatia M, Zhu YZ, Zhu YC, Ramnath RD, Wang ZJ, et al. Hydrogen sulfide is a novel mediator of lipopolysaccharide-induced inflammation in the mouse. Faseb j 2005;19(9):1196-8.

12. Takahashi T, Aoki Y, Okubo K, Maeda Y, Sekiguchi F, Mitani K, et al. Upregulation of Ca(v)3.2 T-type calcium channels targeted by endogenous hydrogen sulfide contributes to maintenance of neuropathic pain. Pain 2010;150(1):183-91.

13. Bao Y, Gao Y, Yang L, Kong X, Yu J, Hou W, et al. The mechanism of mu-opioid receptor (MOR)-TRPV1 crosstalk in TRPV1 activation involves morphine anti-nociception, tolerance and dependence. Channels (Austin) 2015;9(5):235-43.

14. Okubo K, Takahashi T, Sekiguchi F, Kanaoka D, Matsunami M, Ohkubo T, et al. Inhibition of T-type calcium channels and hydrogen sulfide-forming enzyme reverses paclitaxel-evoked neuropathic hyperalgesia in rats. Neuroscience 2011;188148-56.

15. Önal A. Ağrı. Önal A (Editör). Algoloji. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri; 2004. s.1-20.

16. Raj PP. Ağrı taksonomisi. Erdine S (Editör). Ağrı. 3 baskı. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri; 2007. s.19-26.

17. International association for the study of pain. IASP Terminology. Erişim zamanı 14.11.2018. https://www.iasp-pain.org/terminology?navItemNumber=576#Pain.
18. Erdine S. Ağrı mekanizmaları ve ağrıya genel yaklaşım. Erdien S (Editör). Ağrı. 3. basım. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri; 2007. s.37-48.

19. Rosenow JM, Henderson JM. Anatomy and physiology of chronic pain. Neurosurg Clin N Am 2003;14(3):445-62, vii.

20. Bourne S, Machado AG, Nagel SJ. Basic anatomy and physiology of pain pathways. Neurosurg Clin N Am 2014;25(4):629-38.

21. McGlone F, Reilly D. The cutaneous sensory system. Neurosci Biobehav Rev 2010;34(2):148-59.

22. Koivisto A, Jalava N, Bratty R, Pertovaara A. TRPA1 Antagonists for Pain Relief. Pharmaceuticals (Basel, Switzerland) 2018;11(4):117.

23. Palazzo E, Luongo L, de Novellis V, Berrino L, Rossi F, Maione S. Moving towards supraspinal TRPV1 receptors for chronic pain relief. Mol Pain 2010;666.

24. Ghazizadeh V, Naziroglu M. Electromagnetic radiation (Wi-Fi) and epilepsy induce calcium entry and apoptosis through activation of TRPV1 channel in hippocampus and dorsal root ganglion of rats. Metab Brain Dis 2014;29(3):787-99.

25. Steenland HW, Ko SW, Wu LJ, Zhuo M. Hot receptors in the brain. Mol Pain 2006;234.

26. Petrus M, Peier AM, Bandell M, Hwang SW, Huynh T, Olney N, et al. A role of TRPA1 in mechanical hyperalgesia is revealed by pharmacological inhibition. Mol Pain 2007;340.

27. Nakanishi M, Hata K, Nagayama T, Sakurai T, Nishisho T, Wakabayashi H, et al. Acid activation of Trpv1 leads to an up-regulation of calcitonin gene-related peptide expression in dorsal root ganglion neurons via the CaMK-CREB cascade: a potential mechanism of inflammatory pain. Mol Biol Cell 2010;21(15):2568-77.

28. Szallasi A, Cortright DN, Blum CA, Eid SR. The vanilloid receptor TRPV1: 10 years from channel cloning to antagonist proof-of-concept. Nature Reviews Drug Discovery 2007;6357.

29. Caterina MJ, Leffler A, Malmberg AB, Martin WJ, Trafton J, Petersen-Zeitz KR, et al. Impaired nociception and pain sensation in mice lacking the capsaicin receptor. Science 2000;288(5464):306-13.

30. Cui M, Honore P, Zhong C, Gauvin D, Mikusa J, Hernandez G, et al. TRPV1 receptors in the CNS play a key role in broad-spectrum analgesia of TRPV1 antagonists. J Neurosci 2006;26(37):9385-93.

31. Nilius B, Appendino G, Owsianik G. The transient receptor potential channel TRPA1: from gene to pathophysiology. Pflugers Arch 2012;464(5):425-58.

32. Schumacher MA. Transient receptor potential channels in pain and inflammation: therapeutic opportunities. Pain practice : the official journal of World Institute of Pain 2010;10(3):185-200.

33. Costigan M, Scholz J, Woolf CJ. Neuropathic pain: a maladaptive response of the nervous system to damage. Annu Rev Neurosci 2009;321-32.

34. Colloca L, Ludman T, Bouhassira D, Baron R, Dickenson AH, Yarnitsky D, et al. Neuropathic pain. Nat Rev Dis Primers 2017;317002.

35. Sari CC, Gunduz O, Ulugol A. Spinal Serotonin and 5HT6 Receptor Levels During Development of Neuropathy and Influence of Blockade of these Receptors on Thermal Hyperalgesia in Diabetic Mice. Drug Res (Stuttg) 2019.

36. Campbell JN, Meyer RA. Mechanisms of Neuropathic Pain. Neuron 2006;52(1):77-92.

37. Ulugol A, Aslantas A, Karadag HC, Bulbul ED, Tuncer A, Dokmeci I. The effect of combined systemic administration of morphine and L-NAME, a nitric oxide synthase inhibitor, on behavioral signs of neuropathic pain in rats. Neuroscience Research Communications 2002;30(3):143-53.

38. Jensen TS, Finnerup NB. Allodynia and hyperalgesia in neuropathic pain: clinical manifestations and mechanisms. Lancet Neurol 2014;13(9):924-35.

39. Köknel Talu G. Nöropatik Ağrı. Erdine S (Editör). Ağrı. 2007. s.461-70.

40. Ertekin C. Ağrının nöroanatomisi ve nörofizyolojisi. Yedigül İ (Editör). Ağrı ve tedavisi. İzmir: Yapım Matbaacılık; 2003. s.1-13.

41. Khalid S, Tubbs RS. Neuroanatomy and Neuropsychology of Pain. Cureus 2017;9(10):e1754.

42. Aydın ON. Ağrı ve ağrı mekanizmalarına güncel bakış. Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi 2002;3(2):37-48.

43. Lenz FA, Weiss N, Ohara S, Lawson C, Greenspan JD. Chapter 6 The role of the thalamus in pain. In: Hallett M, Phillips LH, Schomer DL, Massey JM, editors. Supplements to Clinical Neurophysiology: Elsevier; 2004. p. 50-61.

44. Dostrovsky JO. Role of thalamus in pain. Prog Brain Res 2000;129245-57.

45. Kayaalp SO. Opioid analjezikler. Kayaalp SO (Editör). Rasyonel tedavi yönünden tıbbi farmakoloji. 13. Basım. Ankara: Pelikan Yayıncılık; 2012. cilt 2 s.826-45.

46. Yoshimura M, Furue H. Mechanisms for the anti-nociceptive actions of the descending noradrenergic and serotonergic systems in the spinal cord. J Pharmacol Sci 2006;101(2):107-17.

47. Millan MJ. Descending control of pain. Progress in Neurobiology 2002;66(6):355-474.

48. Wilder-Smith CH. The balancing act: endogenous modulation of pain in functional gastrointestinal disorders. Gut 2011;60(11):1589-99.

49. Dogrul A, Seyrek M, Yalcin B, Ulugol A. Involvement of descending serotonergic and noradrenergic pathways in CB1 receptor-mediated antinociception. Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry 2012;38(1):97-105.

50. Stein C, Lang LJ. Peripheral mechanisms of opioid analgesia. Curr Opin Pharmacol 2009;9(1):3-8.

51. Gunduz O, Karadag HC, Ulugol A. Synergistic anti-allodynic effects of nociceptin/orphanin FQ and cannabinoid systems in neuropathic mice. Pharmacology Biochemistry and Behavior 2011;99(4):540-4.

52. Micheli L LE, Corti F, Ciccocioppo R, Calò G, Rizzi A, et al. . Involvement of the N/OFQ-NOP system in rat morphine antinociceptive tolerance: Are astrocytes the crossroad? . European Journal of Pharmacology 2018;82379-86.

53. Shumacher MA, Basbaum AI, Way WL. Opioid analjezikler ve antagonistleri (çeviri: A. Ulugöl). Katzung BG, Trevor AJ. Masters SB. (Editörler).Temel ve klinik farmakoloji. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri;2014. s.543-64.

54. Inturrisi CE. Clinical Pharmacology of Opioids for Pain. The Clinical Journal of Pain 2002;183-13.

55. Naidu PS, Singh A, Joshi D, Kulkarni SK. Possible mechanisms of action in quercetin reversal of morphine tolerance and dependence. Addict Biol 2003;8(3):327-36.

56. Schumacher MA, Basbaum AI, Naidu RK. Opioid Agonists & Antagonists. In: Katzung BG, Trevor AJ. (Eds). Basic Clinical Pharmacology. 13th ed. 2015. p. 531-51.

57. Mayer DJ, Mao J, Price DD. The development of morphine tolerance and dependence is associated with translocation of protein kinase C. PAIN 1995;61(3).

58. Alboghobeish S, Naghizadeh B, Kheirollah A, Ghorbanzadeh B, Mansouri MT. Fluoxetine increases analgesic effects of morphine, prevents development of morphine tolerance and dependence through the modulation of L-type calcium channels expression in mice. Behavioural Brain Research 2018.

59. Liu J-G, Anand KJS. Protein kinases modulate the cellular adaptations associated with opioid tolerance and dependence. Brain Research Reviews 2001;38(1):1-19.

60. Raghavendra V, Kulkarni SK. Possible mechanisms of action in melatonin reversal of morphine tolerance and dependence in mice. Eur J Pharmacol 2000;409(3):279-89.

61. Abdel-Zaher AO, Mostafa MG, Farghly HM, Hamdy MM, Omran GA, Al-Shaibani NKM. Inhibition of brain oxidative stress and inducible nitric oxide synthase expression by thymoquinone attenuates the development of morphine tolerance and dependence in mice. European Journal of Pharmacology 2013;702(1):62-70.

62. Wen Z-H, Chang Y-C, Cherng C-H, Wang J-J, Tao P-L, Wong C-S. Increasing of intrathecal CSF excitatory amino acids concentration following morphine challenge in morphine-tolerant rats. Brain Research 2004;995(2):253-9.

63. Jhamandas KH, Marsala M, Ibuki T, Yaksh TL. Spinal amino acid release and precipitated withdrawal in rats chronically infused with spinal morphine. The Journal of Neuroscience 1996;16(8):2758.

64. Smith FL, Dombrowski DS, Dewey WL. Involvement of Intracellular Calcium in Morphine Tolerance in Mice. Pharmacology Biochemistry and Behavior 1999;62(2):381-8.

65. Dogrul A, Bilsky EJ, Ossipov MH, Lai J, Porreca F. Spinal L-Type Calcium Channel Blockade Abolishes Opioid-Induced Sensory Hypersensitivity and Antinociceptive Tolerance. Anesthesia & Analgesia 2005;101(6).

66. Meng G, Wu N, Zhang C, Su R-B, Lu X-Q, Liu Y, et al. Analgesic activity of ZC88, a novel N-type voltage-dependent calcium channel blocker, and its modulation of morphine analgesia, tolerance and dependence. European Journal of Pharmacology 2008;586(1):130-8.

67. Martini L, Whistler JL. The role of mu opioid receptor desensitization and endocytosis in morphine tolerance and dependence. Current Opinion in Neurobiology 2007;17(5):556-64.

68. Vardanyan A, Wang R, Vanderah TW, Ossipov MH, Lai J, Porreca F, et al. TRPV1 receptor in expression of opioid-induced hyperalgesia. J Pain 2009;10(3):243-52.

69. Chen Y, Geis C, Sommer C. Activation of TRPV1 contributes to morphine tolerance: involvement of the mitogen-activated protein kinase signaling pathway. J Neurosci 2008;28(22):5836-45.

70. Rowan MP, Bierbower SM, Eskander MA, Szteyn K, Por ED, Gomez R, et al. Activation of mu opioid receptors sensitizes transient receptor potential vanilloid type 1 (TRPV1) via beta-arrestin-2-mediated cross-talk. PLoS One 2014;9(4):e93688.

71. Wang R. Physiological implications of hydrogen sulfide: a whiff exploration that blossomed. Physiol Rev 2012;92(2):791-896.

72. Qu K, Lee SW, Bian JS, Low CM, Wong PT. Hydrogen sulfide: neurochemistry and neurobiology. Neurochem Int 2008;52(1-2):155-65.

73. Panthi S, Chung HJ, Jung J, Jeong NY. Physiological Importance of Hydrogen Sulfide: Emerging Potent Neuroprotector and Neuromodulator. Oxid Med Cell Longev 2016;20169049782.

74. Lowicka E, Beltowski J. Hydrogen sulfide (H2S) - the third gas of interest for pharmacologists. Pharmacol Rep 2007;59(1):4-24.

75. Lin JQ, Luo HQ, Lin CZ, Chen JZ, Lin XZ. Sodium hydrosulfide relieves neuropathic pain in chronic constriction injured rats. Evid Based Complement Alternat Med 2014;2014514898.

76. Warenycia MW, Smith KA, Blashko CS, Kombian SB, Reiffenstein RJ. Monoamine oxidase inhibition as a sequel of hydrogen sulfide intoxication: increases in brain catecholamine and 5-hydroxytryptamine levels. Archives of Toxicology 1989;63(2):131-6.

77. Geng B, Yang J, Qi Y, Zhao J, Pang Y, Du J, et al. H2S generated by heart in rat and its effects on cardiac function. Biochem Biophys Res Commun 2004;313(2):362-8.

78. Stipanuk MH, Beck PW. Characterization of the enzymic capacity for cysteine desulphhydration in liver and kidney of the rat. Biochem J 1982;206(2):267-77.

79. Erickson PF, Maxwell IH, Su LJ, Baumann M, Glode LM. Sequence of cDNA for rat cystathionine gamma-lyase and comparison of deduced amino acid sequence with related Escherichia coli enzymes. Biochem J 1990;269(2):335-40.

80. Swaroop M, Bradley K, Ohura T, Tahara T, Roper MD, Rosenberg LE, et al. Rat cystathionine beta-synthase. Gene organization and alternative splicing. J Biol Chem 1992;267(16):11455-61.

81. Abe K, Kimura H. The possible role of hydrogen sulfide as an endogenous neuromodulator. The Journal of Neuroscience 1996;16(3):1066-71.

82. Shibuya N, Koike S, Tanaka M, Ishigami-Yuasa M, Kimura Y, Ogasawara Y, et al. A novel pathway for the production of hydrogen sulfide from D-cysteine in mammalian cells. Nat Commun 2013;41366.

83. Szabo C. Hydrogen sulphide and its therapeutic potential. Nat Rev Drug Discov 2007;6(11):917-35.

84. Mikami Y, Shibuya N, Kimura Y, Nagahara N, Ogasawara Y, Kimura H. Thioredoxin and dihydrolipoic acid are required for 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase to produce hydrogen sulfide. Biochem J 2011;439(3):479-85.

85. Lee M, Schwab C, Yu S, McGeer E, McGeer PL. Astrocytes produce the antiinflammatory and neuroprotective agent hydrogen sulfide. Neurobiology of Aging 2009;30(10):1523-34.

86. Kolluru GK, Shen X, Bir SC, Kevil CG. Hydrogen sulfide chemical biology: pathophysiological roles and detection. Nitric Oxide 2013;355-20.

87. Enokido Y, Suzuki E, Iwasawa K, Namekata K, Okazawa H, Kimura H. Cystathionine beta-synthase, a key enzyme for homocysteine metabolism, is preferentially expressed in the radial glia/astrocyte lineage of developing mouse CNS. Faseb j 2005;19(13):1854-6.

88. Ichinohe A, Kanaumi T, Takashima S, Enokido Y, Nagai Y, Kimura H. Cystathionine β-synthase is enriched in the brains of Down's patients. Biochemical and Biophysical Research Communications 2005;338(3):1547-50.

89. Hu LF, Wong PT, Moore PK, Bian JS. Hydrogen sulfide attenuates lipopolysaccharide-induced inflammation by inhibition of p38 mitogen-activated protein kinase in microglia. J Neurochem 2007;100(4):1121-8.

90. Lee SW, Hu YS, Hu LF, Lu Q, Dawe GS, Moore PK, et al. Hydrogen sulphide regulates calcium homeostasis in microglial cells. Glia 2006;54(2):116-24.

91. Distrutti E, Sediari L, Mencarelli A, Renga B, Orlandi S, Antonelli E, et al. Evidence that hydrogen sulfide exerts antinociceptive effects in the gastrointestinal tract by activating KATP channels. J Pharmacol Exp Ther 2006;316(1):325-35.

92. Garcia-Bereguiain MA, Samhan-Arias AK, Martin-Romero FJ, Gutierrez-Merino C. Hydrogen sulfide raises cytosolic calcium in neurons through activation of L-type Ca2+ channels. Antioxid Redox Signal 2008;10(1):31-42.

93. Tan BH, Wong PT, Bian JS. Hydrogen sulfide: a novel signaling molecule in the central nervous system. Neurochem Int 2010;56(1):3-10.

94. Ishigami M, Hiraki K, Umemura K, Ogasawara Y, Ishii K, Kimura H. A source of hydrogen sulfide and a mechanism of its release in the brain. Antioxid Redox Signal 2009;11(2):205-14.

95. Wang J-F, Li Y, Song J-N, Pang H-G. Role of hydrogen sulfide in secondary neuronal injury. Neurochemistry International 2014;6437-47.

96. Qu K, Chen CP, Halliwell B, Moore PK, Wong PT. Hydrogen sulfide is a mediator of cerebral ischemic damage. Stroke 2006;37(3):889-93.

97. Beauchamp RO, Jr., Bus JS, Popp JA, Boreiko CJ, Andjelkovich DA. A critical review of the literature on hydrogen sulfide toxicity. Crit Rev Toxicol 1984;13(1):25-97.

98. Wang R. Two's company, three's a crowd: can H2S be the third endogenous gaseous transmitter? Faseb j 2002;16(13):1792-8.

99. Li L, Rose P, Moore PK. Hydrogen sulfide and cell signaling. Annu Rev Pharmacol Toxicol 2011;51169-87.

100. Simonnet G, Rivat C. Opioid-induced hyperalgesia: abnormal or normal pain? NeuroReport 2003;14(1).

101. Van Elstraete AC, Sitbon P, Mazoit JX, Conti M, Benhamou D. Protective effect of prior administration of magnesium on delayed hyperalgesia induced by fentanyl in rats. Can J Anaesth 2006;53(12):1180-5.

102. Sullivan JM, Traynelis SF, Chen HS, Escobar W, Heinemann SF, Lipton SA. Identification of two cysteine residues that are required for redox modulation of the NMDA subtype of glutamate receptor. Neuron 1994;13(4):929-36.

103. Kimura H. Hydrogen Sulfide Induces Cyclic AMP and Modulates the NMDA Receptor. Biochemical and Biophysical Research Communications 2000;267(1):129-33.

104. Nelson MT, Joksovic PM, Perez-Reyes E, Todorovic SM. The Endogenous Redox Agent L-Cysteine Induces T-Type Ca²+ Channel-Dependent Sensitization of a Novel Subpopulation of Rat Peripheral Nociceptors. The Journal of Neuroscience 2005;25(38):8766.

105. Todorovic SM, Jevtovic-Todorovic V. T-type voltage-gated calcium channels as targets for the development of novel pain therapies. Br J Pharmacol 2011;163(3):484-95.

106. Rose KE, Lunardi N, Boscolo A, Dong X, Erisir A, Jevtovic-Todorovic V, et al. Immunohistological demonstration of CaV3.2 T-type voltage-gated calcium channel expression in soma of dorsal root ganglion neurons and peripheral axons of rat and mouse. Neuroscience 2013;250263-74.

107. Ogawa H, Takahashi K, Miura S, Imagawa T, Saito S, Tominaga M, et al. H2S functions as a nociceptive messenger through transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1) activation. Neuroscience 2012;218335-43.

108. Bautista DM, Movahed P, Hinman A, Axelsson HE, Sterner O, Hogestatt ED, et al. Pungent products from garlic activate the sensory ion channel TRPA1. Proc Natl Acad Sci U S A 2005;102(34):12248-52.

109. Streng T, Axelsson HE, Hedlund P, Andersson DA, Jordt S-E, Bevan S, et al. Distribution and Function of the Hydrogen Sulfide–Sensitive TRPA1 Ion Channel in Rat Urinary Bladder. European Urology 2008;53(2):391-400.

110. Story GM, Peier AM, Reeve AJ, Eid SR, Mosbacher J, Hricik TR, et al. ANKTM1, a TRP-like channel expressed in nociceptive neurons, is activated by cold temperatures. Cell 2003;112(6):819-29.

111. Bandell M, Story GM, Hwang SW, Viswanath V, Eid SR, Petrus MJ, et al. Noxious cold ion channel TRPA1 is activated by pungent compounds and bradykinin. Neuron 2004;41(6):849-57.

112. Terada Y, Kawabata A. H2S and pain: A novel aspect for processing of somatic,visceral and neuropathic pain signals. In: Moore PK WM, editor. Handbook Experimental Pharmacology 230. Springer International Publishing Switzerland2015. p. 217–30.

113. Kawabata A, Ishiki T, Nagasawa K, Yoshida S, Maeda Y, Takahashi T, et al. Hydrogen sulfide as a novel nociceptive messenger. Pain 2007;132(1-2):74-81.

114. Maeda Y, Aoki Y, Sekiguchi F, Matsunami M, Takahashi T, Nishikawa H, et al. Hyperalgesia induced by spinal and peripheral hydrogen sulfide: evidence for involvement of Cav3.2 T-type calcium channels. Pain 2009;142(1-2):127-32.

115. Bourinet E, Alloui A, Monteil A, Barrere C, Couette B, Poirot O, et al. Silencing of the Cav3.2 T-type calcium channel gene in sensory neurons demonstrates its major role in nociception. Embo j 2005;24(2):315-24.

116. Nelson MT, Woo J, Kang H-W, Vitko I, Barrett PQ, Perez-Reyes E, et al. Reducing Agents Sensitize C-Type Nociceptors by Relieving High-Affinity Zinc Inhibition of T-Type Calcium Channels. The Journal of Neuroscience 2007;27(31):8250.

117. Matsunami M, Kirishi S, Okui T, Kawabata A. Chelating luminal zinc mimics hydrogen sulfide-evoked colonic pain in mice: possible involvement of T-type calcium channels. Neuroscience 2011;181257-64.

118. Terada Y, Fujimura M, Nishimura S, Tsubota M, Sekiguchi F, Kawabata A. Roles of Cav3.2 and TRPA1 channels targeted by hydrogen sulfide in pancreatic nociceptive processing in mice with or without acute pancreatitis. Journal of Neuroscience Research 2015;93(2):361-9.

119. Kimura Y, Mikami Y, Osumi K, Tsugane M, Oka J-i, Kimura H. Polysulfides are possible H2S-derived signaling molecules in rat brain. The FASEB Journal 2013;27(6):2451-7.

120. Nassini R, Materazzi S, Benemei S, Geppetti P. The TRPA1 Channel in Inflammatory and Neuropathic Pain and Migraine. In: Nilius B, Gudermann T, Jahn R, Lill R, Offermanns S, Petersen OH, editors. Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology, Vol 167. Cham: Springer International Publishing; 2014. p. 1-43.

121. Okubo K, Matsumura M, Kawaishi Y, Aoki Y, Matsunami M, Okawa Y, et al. Hydrogen sulfide-induced mechanical hyperalgesia and allodynia require activation of both Cav3.2 and TRPA1 channels in mice. Br J Pharmacol 2012;166(5):1738-43.

122. Messinger RB, Naik AK, Jagodic MM, Nelson MT, Lee WY, Choe WJ, et al. In vivo silencing of the Ca(V)3.2 T-type calcium channels in sensory neurons alleviates hyperalgesia in rats with streptozocin-induced diabetic neuropathy. Pain 2009;145(1-2):184-95.

123. Koch T, Höllt V. Role of receptor internalization in opioid tolerance and dependence. Pharmacology & Therapeutics 2008;117(2):199-206.

124. Bailey CP, Connor M. Opioids: cellular mechanisms of tolerance and physical dependence. Current Opinion in Pharmacology 2005;5(1):60-8.

125. Ueda H, Ueda M. Mechanisms underlying morphine analgesic tolerance and dependence. Front Biosci (Landmark Ed) 2009;145260-72.

126. Elliott K, Minami N, Kolesnikov YA, Pasternak GW, Inturrisi CE. The NMDA receptor antagonists, LY274614 and MK-801, and the nitric oxide synthase inhibitor, NG-nitro-L-arginine, attenuate analgesic tolerance to the mu-opioid morphine but not to kappa opioids. Pain 1994;56(1):69-75.

127. Heinzen EL, Pollack GM. The development of morphine antinociceptive tolerance in nitric oxide synthase-deficient mice. Biochem Pharmacol 2004;67(4):735-41.

128. Zhao W, Wang R. H(2)S-induced vasorelaxation and underlying cellular and molecular mechanisms. Am J Physiol Heart Circ Physiol 2002;283(2):H474-80.

129. Smith HS. Hydrogen sulfide's involvement in modulating nociception. Pain Physician 2009;12(5):901-10.

130. Wallace JL, Ferraz JG, Muscara MN. Hydrogen sulfide: an endogenous mediator of resolution of inflammation and injury. Antioxid Redox Signal 2012;17(1):58-67.

131. Kida M, Sugiyama T, Yoshimoto T, Ogawa Y. Hydrogen sulfide increases nitric oxide production with calcium-dependent activation of endothelial nitric oxide synthase in endothelial cells. Eur J Pharm Sci 2013;48(1-2):211-5.

132. Coletta C, Papapetropoulos A, Erdelyi K, Olah G, Modis K, Panopoulos P, et al. Hydrogen sulfide and nitric oxide are mutually dependent in the regulation of angiogenesis and endothelium-dependent vasorelaxation. Proc Natl Acad Sci U S A 2012;109(23):9161-6.

133. Petho G, Reeh PW. Sensory and signaling mechanisms of bradykinin, eicosanoids, platelet-activating factor, and nitric oxide in peripheral nociceptors. Physiol Rev 2012;92(4):1699-775.

134. Xu X, Li S, Shi Y, Tang Y, Lu W, Han T, et al. Hydrogen sulfide downregulates colonic afferent sensitivity by a nitric oxide synthase-dependent mechanism in mice. Neurogastroenterol Motil 2019;31(1):e13471.

135. Distrutti E, Cipriani S, Renga B, Mencarelli A, Migliorati M, Cianetti S, et al. Hydrogen sulphide induces micro opioid receptor-dependent analgesia in a rodent model of visceral pain. Mol Pain 2010;636.

136. Fukami K, Fukami K, Sekiguchi F, Sekiguchi F, Kawabata A, Kawabata A. Hydrogen Sulfide and T-Type Ca2+ Channels in Pain Processing, Neuronal Differentiation and Neuroendocrine Secretion. Pharmacology 2017;99(3-4):196-203.

137. Roa-Coria JE, Pineda-Farias JB, Barragan-Iglesias P, Quinonez-Bastidas GN, Zuniga-Romero A, Huerta-Cruz JC, et al. Possible involvement of peripheral TRP channels in the hydrogen sulfide-induced hyperalgesia in diabetic rats. BMC Neurosci 2019;20(1):1.

138. Sekiguchi F, Kawabata A. T-type calcium channels: functional regulation and implication in pain signaling. J Pharmacol Sci 2013;122(4):244-50.

139. Andersson DA, Gentry C, Bevan S. TRPA1 has a key role in the somatic pro-nociceptive actions of hydrogen sulfide. PLoS One 2012;7(10):e46917.

140. Hamdy MM, Elbadr MM, Barakat A. Bupropion attenuates morphine tolerance and dependence: Possible role of glutamate, norepinephrine, inflammation, and oxidative stress. Pharmacological Reports 2018;70(5):955-62.

141. Basiri F, Rad A, Mahdian D, Molavi M, Amin B. Effects of glucosamine against morphine-induced antinociceptive tolerance and dependence in mice. J Biomed Sci 2019;26(1):21.

142. Mayer DJ, Mao J, Holt J, Price DD. Cellular mechanisms of neuropathic pain, morphine tolerance, and their interactions. Proc Natl Acad Sci U S A 1999;96(14):7731-6.

143. Zhang X, Wang J, Yu T, Du D, Jiang W. Minocycline can delay the development of morphine tolerance, but cannot reverse existing tolerance in the maintenance period of neuropathic pain in rats. Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology 2015;42(1):94-101.

144. Hervera A, Negrete R, Leánez S, Martín-Campos JM, Pol O. Peripheral effects of morphine and expression of μ-opioid receptors in the dorsal root ganglia during neuropathic pain: nitric oxide signaling. Molecular pain 2011;725-.

145. Antoine M-H, Ouedraogo R, Sergooris J, Hermann M, Herchuelz A, Lebrun P. Hydroxylamine, a nitric oxide donor, inhibits insulin release and activates K+ATP channels. European Journal of Pharmacology 1996;313(3):229-35.

146. Furne J, Saeed A, Levitt MD. Whole tissue hydrogen sulfide concentrations are orders of magnitude lower than presently accepted values. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 2008;295(5):R1479-85.

147. Yang H-Y, Wu Z-Y, Wood M, Whiteman M, Bian J-S. Hydrogen Sulfide Attenuates Opioid Dependence by Suppression of Adenylate Cyclase/cAMP Pathway. Antioxidants & Redox Signaling 2013;20(1):31-41.

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekiller **Sayfa no.**

Şekil 1. Morfinin kimyasal yapısı 8

Şekil 2. Morfin kaynaklı antinosisepsiyon, tolerans ve bağımlılıkta TRPV1 aktivasyonunun sinyal iletimi 12

Şekil 3. Hidrojen sülfürün biyosentezi 13

Şekil 4. Hidrojen sülfürün katabolizması 15

Şekil 5. Birinci duyusal nöronun periferik ve santral terminallerinde H_2S'nin rolleri 17

Şekil 6. Sodyum hidrosülfür kalibrasyon eğrisi 28

Şekil 7. Subkutan enjeksiyon 30

Şekil 8. İntraperitoneal enjeksiyon 30

Şekil 9. Tail flick cihazı 31

Şekil 10. Hot plate cihazı 31

Şekil 11. Rota rod cihazı 31

Şekil 12. Morfinin analjezik etkisine tolerans gelişmesinin tail flick (A) ve hot plate (B) testlerinde gösterilmesi 33

Şekil 13. Morfinin analjezik etkisine tolerans gelişmesinin tail flick (A) ve hot plate (B) testlerinde gösterilmesi 34

Şekil 14. Kronik propargilglisin kullanımının tolerans üzerine etkisinin tail flick (A) ve hot plate (B) testlerinde gösterilmesi 35

Şekil 15. Kronik hidroksilamin kullanımının tolerans üzerine etkisinin tail flick (A) ve hot plate (B) testlerinde gösterilmesi 36

Şekil 16. Akut propargilglisin kullanımının tolerans üzerine etkisinin tail flick (A) ve hot plate (B) testlerinde gösterilmesi 37

Şekil 17. Akut hidroksilamin kullanımının tolerans üzerine etkisinin tail flick (A) ve hot plate (B) testlerinde gösterilmesi 38

Şekil 18. Kronik propargilglisin ve hidroksilamin kullanımı sonrasında nalokson uygulamasıyla farelerin sıçrama sayıları 39

Şekil 19. Akut propargilglisin ve hidroksilamin kullanımı sonrasında nalokson uygulamasıyla farelerin sıçrama sayıları 39

Şekil 20. Tolerans gruplarında motor koordinasyonun rota rod testiyle değerlendirilmesi 40

Şekil 21. Bağımlılık gruplarında motor koordinasyonun rota rod testiyle değerlendirilmesi 40

Şekil 22. Morfin toleransının gelişim sürecinde beyin (A) ve omurilik (B) hidrojen sülfür düzeyleri 41

Şekil 23. Morfin toleransında beyin hidrojen sülfür düzeyleri ve bu düzeyler üzerine hidrojen sülfür sentaz enzim inhibitörlerinin kronik (A) ve akut (B) etkileri 42

Şekil 24. Morfin toleransında omurilik hidrojen sülfür düzeyleri ve bu düzeyler üzerine hidrojen sülfür sentaz enzim inhibitörlerinin kronik (A) ve akut (B) etkileri 42

Şekil 25. Morfin bağımlılığında beyin hidrojen sülfür düzeyleri ve bu düzeyler üzerine hidrojen sülfür sentaz enzim inhibitörlerinin kronik (A) ve akut (B) etkileri 43

Şekil 26. Morfin bağımlılığında omurilik hidrojen sülfür düzeyleri ve bu düzeyler üzerine hidrojen sülfür sentaz enzim inhibitörlerinin kronik (A) ve akut (B) etkileri 43

ÖZGEÇMİŞ

1988 yılında Antalya'nın Serik İlçesinde doğdum. İlköğretim ve ortaöğretimimi Antalya'da tamamladım. Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya bölümünden 2010 yılında mezun olduktan sonra aynı bölümde yüksek lisans eğitimimi 2013 yılında tamamladım.

Çalışma hayatına Aralık 2013 yılında halen bünyesinde bulunduğum Trakya Üniversitesi Arda Meslek Yüksekokulu Laboratuvar Teknolojisi programında öğretim görevlisi olarak başladım. 2015 yılında Trakya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans programına başladım.

Yayınlar

Çetin, Z., Dede, B., "Synthesis, Structural Characterization, Catecholase and Catalase-like Enzyme Activity Studies of Novel Tridentate Schiff Base and its Mononuclear Cu(II) and Mn(II) Complexes", International Conference on Science, Ecology and Technology I, 25-28 August 2015, Vienna, Austria.

EKLER

Ek 1

T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu
(Trakya University, Local Ethics Committee of Animal Experiments)

Oturum Sayısı: 2016/07 **Karar Tarihi: 29.06.2016**

KARAR NO: 2016.07.02

Yürütücülüğünü Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi öğretim üyesi Prof. Dr. Ahmet ULUGÖL'ün yaptığı, Zeynep ÇETİN'in Yüksek Lisans tezi olarak planlanan TÜHADYEK-2016/10 protokol nolu "**Farelerde morfine tolerans ve bağımlılık gelişiminde hidrojen sülfitin rolü**'' başlıklı çalışmanın adının **"Farelerde morfine tolerans ve bağımlılık gelişiminde hidrojen sülfürün rolü''** olarak değiştirilmesi isteği görüşüldü. Araştırmanın amaç, yaklaşım, gereç ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmesi sonucunda; Hayvan deneyleri yerel etik kurulu yönergesinde belirtilen ilke ve kurallara uygun bulunarak, çalışmanın yapılabileceğine mevcudun oy birliği ile karar verilmiştir.

Doç. Dr. Enis ULUÇAM
Başkan
Araştırma ile İlişki: ☐ var ☑ yok
Toplantı Katılım: ☑ evet ☐ hayır

Vet. Hekim Ziya ÇUKUR
Vet. Hek. Üye
Araştırma ile İlişki: ☐ var ☐ yok
Toplantı Katılım: ☐ evet ☐ hayır

Yrd. Doç. Dr. Hayati ARDA
Fen Fakültesi Öğretim Üyesi
Araştırma ile İlişki: ☐ var ☐ yok
Toplantı Katılım: ☐ evet ☐ hayır

Yrd. Doç. Dr. Beytullah ÖZKAN
Fen Fakültesi Öğretim Üyesi
Araştırma ile İlişki: ☐ var ☑ yok
Toplantı Katılım: ☑ evet ☐ hayır

-KATILMADI-
Doç. Dr. Y. Atakan SEZER
Tıp Fakültesi Öğretim Üyesi
Araştırma ile İlişki: ☐ var ☐ yok
Toplantı Katılım: ☐ evet ☐ hayır

-KATILMADI-
Doç. Dr. Tevfik AKTOZ
Tıp Fakültesi Öğretim Üyesi
Araştırma ile İlişki: ☐ var ☐ yok
Toplantı Katılım: ☐ evet ☐ hayır

Doç. Dr. Hakan GÜRKAN
Tıp Fakültesi Öğretim Üyesi
Araştırma ile İlişki: ☐ var ☑ yok
Toplantı Katılım: ☑ evet ☐ hayır

Yrd. Doç. Dr. Elvan BAKAR
Eczacılık Fakültesi Öğretim Üyesi
Araştırma ile İlişki: ☐ var ☑ yok
Toplantı Katılım: ☑ evet ☐ hayır

Ecz. F. Uygar GÜLER
Sivil Toplum Kuruluşu Sivil Üye
Araştırma ile İlişki: ☐ var ☐ yok
Toplantı Katılım: ☐ evet ☐ hayır

-KATILMADI-
Osman GÜLTEKİN
Sivil Üye
Araştırma ile İlişki: ☐ var ☐ yok
Toplantı Katılım: ☐ evet ☐ hayır