T.C.
İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ENDOJEN OPİOİD RESEPTÖRLERİN DİNAMİĞİNİN ARAŞTIRILMASI

GÜLSENA BAYDAŞ

SİNİRBİLİM ANABİLİM DALI

DANIŞMAN
Prof. Dr. GÜRKAN ÖZTÜRK

İSTANBUL – 2018

T.C.
İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ENDOJEN OPİOİD RESEPTÖRLERİN DİNAMİĞİNİN ARAŞTIRILMASI

GÜLSENA BAYDAŞ

SİNİRBİLİM ANABİLİM DALI

DANIŞMAN
Prof. Dr. GÜRKAN ÖZTÜRK

İSTANBUL- 2018

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam boyunca bilgi ve tecrübelerini esirgemeyen, yaptığım hataları bir baba şefkatiyle karşılayan ve büyük bir sabırla bana yardımcı olmaya çalışan saygıdeğer danışman hocam Prof. Dr. Gürkan Öztürk'e,

Her ihtiyacım olduğunda yardım eli uzatan ve destekleriyle bana güç veren takım arkadaşlarım Sadık Bay, Neşe Altuncu, Esra Nur Yiğit ve Tuba Akgül Çağlar'a,

Samimiyeti ve dostluğu ile yanımda olan sevgili arkadaşım Berna Yıldırım'a,

Kardeşlerimden ayırmadığım, her zaman yanımda olan can dostum Nazlı Üzmez'e,

REMER ailesinin her bir bireyine ve İstanbul Medipol Üniversitesi'ne,

Teşekkürlerin az kaldığı, haklarını hiçbir zaman ödeyemeyeceğim, beni bugünlere getiren ve her zaman destekleyen babam Mehmet Gündüz'e, annem Nurten Öztürk'e ve her zaman yanımda olan kardeşlerim Gülenda Gündüz, Rüveyda Gündüz ve Mehmet Hakan Gündüz'e,

Gece gündüz demeden benimle beraber okulun yollarını aşındıran, hiçbir fedakarlıktan kaçınmayan, maddi ve manevi her türlü desteği ile yanımda olan sevgili eşim Mehmet Salih Baydaş'a,

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAY FORMU i
BEYAN ii
TEŞEKKÜR iii
ŞEKİLLER LİSTESİ vi
RESİMLER LİSTESİ vii
TABLOLAR LİSTESİ viii
1. ÖZET 1
2. ABSTRACT 2
3. GİRİŞ VE AMAÇ 3
4. GENEL BİLGİLER 6
4.1. Primer Duyu Nöronları ve Arka Kök Gangliyonu 6
4.2. Sinir Hasarı ve Gelişen Cevaplar 8
4.3. Opioidler 10
4.3.1. Endojen Opioidler 11
4.4. Opioid Reseptörleri 13
4.4.1. Opioid Reseptörlerinin Yapısı ve Dağılımı 16
4.4.2. Opioid Reseptörlerinin Trafiği 18
4.4.3. Reseptörlerin Dimerizasyonu; MOR-DOR 20
5. MATERYAL VE METOD 24
5.1. Deney Hayvanları 24
5.2. Materyaller 24
5.3. Kültür Hazırlıkları ve Hücre İzolasyonu 26
5.3.1. Kültür Kabı Kaplama 26
5.3.2. Besiyerlerinin hazırlanması 26
5.3.3. Doku Diseksiyonu 27
5.3.4. Hücre İzolasyon Protokolü 27
5.4. Aksotomi ve Öncesi Hazırlıklar 29
5.4.1. Deney Grupları Hazırlığı 29
5.4.2. Aksotomi 31
5.5. Aksotomi Sonrası 34
5.6. İmmünositokimya 34
5.6.1. Solüsyon Hazırlama 34

5.6.2. Boyama 36
5.7. Konfokal Mikroskobu ile Görüntüleme 37
5.8. Parlaklık Ölçümü ve Analiz 38
5.9. İstatistik 40
5.10. Kolokalizasyon Analizi 40
6. BULGULAR 41
6.1. Kolokalizasyon Sonuçları 41
6.2. Hücre Zarı ve Sitoplazmadaki Reseptör Dağılımı 42
6.2.1. MOR (μ opioid reseptörü) Dağılımı 42
6.2.2. DOR (δ opioid reseptörü) Dağılımı 45
6.2.3. HET (μ-δ heteromer opioid reseptörü) Dağılımı 49
6.3. Reseptör Dağılımının Hücre Zarı/Sitoplazma Oranı Bakımından Değerlendirilmesi 53
6.3.1. MORoran Dağılımı 53
6.3.2. DORoran Dağılımı 55
6.3.3. HEToran Dağılımı 57
7. TARTIŞMA 60
7.1. Kolokalizasyon analizleri kullanılan antikorların özgünlüğünü doğrulamıştır 60
7.2. Mu Opioid Reseptör (MOR) Dinamikleri 61
7.3. Delta Opioid Reseptör (DOR) Dinamikleri 62
7.4. MOR-DOR Heteromer Reseptör (HET) Dinamikleri 64
7.5. Travma Sonrası Meydana Gelen Opioid Reseptör Dağılım Değişikliklerinin Olası Etkileri 67
8. SONUÇ 68
9. KAYNAKLAR 69
10. ETİK KURUL ONAYI 80
11. ÖZGEÇMİŞ 83

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 4.1.1. Arka kök gangliyonunun (AKG) spinal kanaldaki anatomik ilişkileri. 6

Şekil 4.1.2. Tek kutuplu ve yalancı tek kutuplu nöron tiplerinin şematik gösterimi. .. 8

Şekil 4.2.1. CNTF ve LIF uyarımıyla sinyal yolağı aktivasyonunun şematik gösterimi. 10

Şekil 4.3.1.1. Merkezi sinir sisteminde endojen opioid yolağı organizasyonu. 13

Şekil 4.4.1.1. Opioid reseptörlerinin yapısı. 17

Şekil 4.4.2.1. Opioid reseptör sinyalizasyonunun özeti. 19

Şekil 4.3.3.1. Opioid dimerizasyonu. 21

Şekil 5.4.2.1. Element listesi sekmesi. 33

Şekil 5.8.1. Hücre zarının parlaklık ölçümü. 39

Şekil 5.8.2. Sitoplazma parlaklık ölçümü. 39

Şekil 5.8.3. Parlaklık ölçüm sonucunun gösterildiği pencere. 40

Şekil 6.2.1.1. Hücrelerde MOR dağılımının her gruptaki genel görüntüsü. 43

Şekil 6.2.1.2. Hücre zarı ve sitoplazmadaki MOR dağılımı.. 43

Şekil 6.2.2.1. Hücrelerde DOR dağılımının gruplardaki genel görüntüsü.. 46

Şekil 6.2.2.2. Hücre zarı ve sitoplazmadaki DOR dağılımı 47

Şekil 6.2.3.1. Hücrelerde HET dağılımının Kontrol37 ve Kontrol25 gruplarındaki genel görüntüsü.. 50

Şekil 6.2.3.2. Hücrelerde HET dağılımının NaloksonAksotomi37 grubundaki genel görüntüsü. 51

Şekil 6.2.3.3. Hücre zarı ve sitoplazmadaki HET dağılımı. 51

Şekil 6.3.1.1. Gruplara göre MORoran dağılımı. 54

Şekil 6.3.2.1. Gruplara göre DORoran dağılımı. 56

Şekil 6.3.3.1. Gruplara göre HEToran dağılımı. 58

RESİMLER LİSTESİ

Resim 5.4.2.1. Palm CombySystem Mikroskobu. 31

Resim 5.4.2.2. Hücre seçimi ve 10x objektifle çekilen fotoğrafı. 32

Resim 5.4.2.3. Aksotomi yapılacak olan bölgenin mesafesinin ölçülmesi. 33

Resim 5.5.1. Aksotomi sonrası hücre (40x). 34

Resim 5.7.1. Zeiss LSM780 Konfokal Mikroskobu. 58

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 4.4.1. Opioid reseptör çeşitleri, etkileri ve ligandları. 16

Tablo 5.2.1. Kullanılan malzemeler 24

Tablo 6.1.1. Kolokalizasyon analizi sonuçları. 41

Tablo 6.2.1.1. Her hücrede ölçülen parlaklık değerlerinin gruplara göre ortalaması.. 42

Tablo 6.1.1.2. Hücre zarındaki MOR dağılımının gruplar arasındaki farkının anlamlılık (p) değerleri 44

Tablo 6.1.1.3. Sitoplazmadaki MOR dağılımının gruplar arasındaki farkının anlamlılık (p) değerleri. 44

Tablo 6.2.2.1. Her hücrede ölçülen parlaklık değerlerinin gruplara göre ortalaması. 46

Tablo 6.2.2.2. Hücre zarındaki DOR dağılımının gruplar arasındaki farkının anlamlılık (p) değerleri. 47

Tablo 6.2.2.3. Sitoplazmadaki DOR dağılımının gruplar arasındaki farkının anlamlılık (p) değerleri. 48

Tablo 6.2.3.1. Her hücrede ölçülen parlaklık değerlerinin gruplara göre ortalaması. 50

Tablo 6.2.3.2. Hücre zarındaki HET dağılımının gruplar arasındaki farkının anlamlılık (p) değerleri. 52

Tablo 6.2.3.3. Sitoplazmadaki HET dağılımının gruplar arasındaki farkının anlamlılık (p) değerleri. 52

Tablo 6.3.1.1. MORoran değerleri, hücre sayısı ve standart sapma değerleri. 54

Tablo 6.2.3.3. MORoran dağılımının gruplar arasındaki farkının anlamlılık (p) değerleri 55

Tablo 6.3.2.1. DORoran değerleri, hücre sayısı ve standart sapma değerleri. 56

Tablo 6.3.2.2. DORoran dağılımının gruplar arasındaki farkının anlamlılık (p) değerleri 57

Tablo 6.3.3.1. HEToran değerleri, hücre sayısı ve standart sapma değerleri. 58

Tablo 6.3.3.2. HEToran dağılımının gruplar arasındaki farkının anlamlılık (p) değerleri 59

Tablo 7.2.1. MOR dinamiğindeki değişimin tablosu…….62
Tablo 7.3.1. DOR dinamiğindeki değişimin tablosu……..64
Tablo 7.4.1. HET dinamiğindeki değişimin tablosu……...66

1. ÖZET

ENDOJEN OPİOİD RESEPTÖRLERİN DİNAMİĞİNİN ARAŞTIRILMASI

Nöronal hasar, ağrı ve dejenerasyon olarak sonuçlanan önemli rahatsızlıklardan bir tanesidir. Bu tür ağrıların tedavisinde kullanılan morfin benzeri ilaçlar opioid olarak adlandırılmaktadır ve etkilerini kendilerine özgü reseptörler aracılığı ile göstermektedir. Opioid reseptörleri analjezi ve hipotermi gibi birçok biyolojik süreci düzenlemektedir. Bu süreçte agonist ve antagonist ligandların etkisiyle hücresel düzeyde farklı yolaklara katılmaktadır. Reseptörler aktifleştikten sonra endositoz ile sitoplazmaya alınıp daha sonra tekrar ekzositoz ile hücre zarına yerleştirilmektedir ve bu süreç reseptör trafiğinin varlığını göstermektedir. Bu reseptör trafiğinin ilaç toleransı ve bağımlılıkla ilgili olduğu düşünülmektedir. Çalışmamızda arka kök gangliyon hücrelerinde, kültür ortamında, μ opioid reseptörü (MOR), δ opioid reseptörü (DOR) ve μ-δ heteromer reseptörün (HET) agonist ve antagonist varlığında nöronal hasara bağlı dinamiği immünositokimya yöntemi ile incelenmiştir. Ayrıca bu dinamiğin sıcaklık değişimiyle nasıl değiştiği araştırılmıştır. Konfokal mikroskobu ile görüntülenen hücrelerin hücre zarı ve sitoplazmadaki immünoreaktiviteleri, parlaklık değerleri olarak ayrı ayrı ölçülmüştür. Sonuç olarak bu üç reseptör alt tipinin aksotomiye, agonist ve antagonist muamelesine ve sıcaklık değişimine farklı tepkiler verdikleri gözlendi. Heteromer reseptörün dinamiğinin, MOR ve DOR'un trafiği ile ilişkili olabileceği ve üç reseptör alt tipi arasında en hareketli olanın DOR olduğu sonucuna varıldı. Bu çalışmanın sonuçları opioid sistem fizyoloji ve farmakolojisi ile ilgili bilinenlere önemli katkılar sağlamaktadır.

Anahtar Kelimeler: Arka kök gangliyonu, sinir hasarı, aksotomi, opioid, opioid reseptörleri, MOR, DOR, MOR-DOR.

2. ABSTRACT

INVESTIGATION OF THE DYNAMICS OF ENDOGENOUS OPIOID RECEPTORS

Neuronal damage is one of the major disorders that result in pain and degeneration. Morphine-like drugs used in the treatment of such pain are called opioids and show their effects through their specific receptors. Opioid receptors regulate many biological processes like analgesia and hypothermia. In this process, it is involved in different pathways at the cellular level under the influence of agonist and antagonist ligands. After activation, the receptors are taken up by endocytosis into the cytoplasm and then placed back into the cell membrane by exocytosis, which indicates presence of receptor trafficking. This is thought to be related to drug tolerance and dependence. In our study, with the presence of agonist and antagonist, neuronal damage-induced dynamics of μ opioid receptor (MOR), δ opioid receptor (DOR) and μ-δ heteromeric receptor (HET) were investigated by immunocytochemistry in the cultured dorsal root ganglion cells. The effect of temperature on these dynamics was also investigated. Using confocal microscopic images, immunoreactivity for the receptors on the cell membrane and cytoplasm denoted by signal intensities were analyzed. The three receptor subtypes gave different responses to axotomy, agonist and antagonist treatment and temperature changes. It was concluded that HET dynamics may be related to MOR and DOR trafficking and DOR has the highest mobility among three receptor subtypes. The results of this study contribute to what is known about physiology and pharmacology of opioid system.

Key Words: Dorsal root ganglion, nerve damage, axotomy, opioid, opioid receptors, MOR, DOR, MOR-DOR.

3. GİRİŞ VE AMAÇ

Duyusal bilginin dönüştürülmesinden sorumlu olan ve primer duyu sinir hücrelerinin hücre gövdelerini içeren yapılara arka kök gangliyonu denilmektedir (1). Yalancı tek kutuplu nöron tipine sahip olan arka kök gangliyonu nöronları uydu glial hücreler ile çevrilidir (2). Somatik duyu sistemi hakkında bilinmeyen pek çok mekanizmanın yanı sıra nöropatik ağrı gelişimi gibi duyusal işleme modülasyonundaki önemli rollerinden dolayı arka kök gangliyonu nöronları, pek çok araştırmanın odağında bulunmaktadır (3).

Periferik sinir yaralanması, nöronların aksonlarına veya uzantılarına verilen hasar sonucu meydana gelmektedir. İn vitro ortamda aksonu keserek ya da ezerek gerçekleştirilen hasar modeline aksotomi denilmektedir (4). Hasardan sonra, arka kök gangliyonunda (AKG) duyusal nöronlar hayatta kalmayı ve onarımı desteklemek için morfolojik ve moleküler değişikliğe uğrarlar (5). Aksotomi sonrasında hücrelerde, gen ifadesi azalımı ya da artışı görülebileceği gibi bağışıklıkla ilgili cevaplar da gözlenebilmektedir.

Haşhaş bitkisinin özünden elde edilen ve "afyon" adıyla bilinen, morfine benzer kimyasal özellikler gösteren maddelere opioid adı verilmektedir (6). Opioidler genel olarak analjezik özelliğinden dolayı ağrı kesici olarak kullanılmaktadır fakat solunum baskılanması, kabızlık ve en önemlisi bağımlılık gibi yan etkileri bulunmaktadır (7).

Opioidlerin etki ettiği reseptörlerin olduğu bulunduktan sonra, memelilerde endojen olarak bulunabilen opioidlerin varlığı da kanıtlanmıştır (8). Yapılan çalışmalar sonucunda üç farklı endojen opioid peptidi ve bu peptitlerin öncü peptitleri bulunmuştur. Bunlar; β-endorfin ve öncüsü preproopiomelanokortin (POMC), lösin(Leu)- ve metiyonin (Met)- enkefalinleri ve öncüsü olan prepeproenkefalin (PENK), dinorfinler (dinorfin A ve B ve neoendorfinler dahil) ve öncüsü preprodinorfin (proenkefalin B)(PDNY)'dir (9).

Opioid reseptörleri, G proteine bağlı reseptör (GPCR)'nin ailesine ait olan yedi transmembran yayılımlı (7TM) reseptörlerdir (10). Opioid reseptörleri μ (MOR), δ

(DOR) ve κ (KOR) reseptörlerinden oluşur ve sırasıyla OPRM1, OPRD1 ve OPRK1 genleri tarafından kodlanmaktadır (10). Bu reseptörler agonistlere ve antagonistlere bağlanma farklılıkları gösteren alt tiplere sahiptir. Örneğin literatürde μ reseptörünün alt tipleri μ_1 ve μ_2; δ reseptörünün alt tipleri ise δ_1 ve δ_2 olarak bahsedilmektedir (11, 12). β-endorfin öncelikle μ ve δ reseptörleri, enkefalinler δ reseptörleri ve dinorfinler ise κ reseptörleri vasıtasıyla etkilerini göstermektedir (13).

Opioid reseptörleri kendilerine özgü agonistlerle aktive edildikten sonra Gα ve Gβγ alt birimleri birbirinden ayrılır ve hücre içinde çeşitli yolaklara katılımı gerçekleşir (14). Örneğin reseptör aktivasyonu adenilil siklazın (cAMP) inhibisyonuna voltaj kapılı kalsiyum (Ca2 +) kanallarının inhibisyonuna ve potasyum kanallarının aktivasyonuna sebep olabilmektedir (15). Ek olarak bu reseptörler GRK/β-arrestin sinyaline bağlı olan yolağa katılıp duyarsızlaştırılırlar (16). Bu duyarsızlaştırılmadan sonra opioid reseptörleri, hızla hücre içine endositozla alınmaktadır. Endositozun tolerans gelişimini azaltıp koruyucu bir role hizmet ettiği öne sürülmüştür (17).

Opioid reseptörleri oligomer oluşturabilmektedir. Bu oligomerizasyon iki çeşittir; homodimerler (aynı reseptör) ve heterodimerler (farklı reseptör tipi) (18). MOR-DOR heteromer yapısı araştırmalarda daha fazla öne çıkmaktadır. Çünkü antagonizmin veya DOR'un yokluğunun morfin toleransını ve bağımlılık gelişimini azalttığı savunulmaktadır. Dolayısıyla MOR-DOR heteromer yapının bu konuda etkili olduğu düşünülmektedir. Çalışmalar aynı zamanda MOR ve DOR heterodimerlerinin farklı ligand bağlama ve sinyal iletim özelliklerine sahip olduklarını ortaya koymuştur (19).

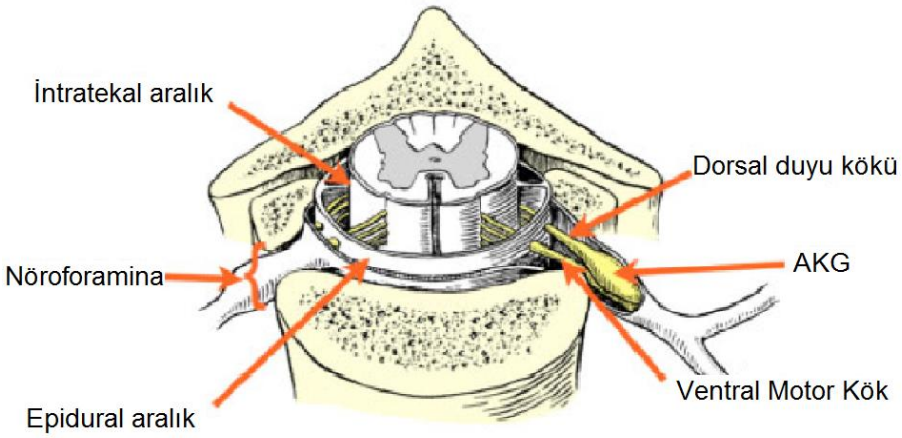
Opioid reseptörlerinin dinamiğini ve hücre zarı ve sitoplazma arasındaki trafiğini inceleyen çalışmalar farklı farklı sonuçlar doğurmuş ve tartışmalara sebep olmuştur. Genetik çalışmalarla yeşil floresan protein (GFP) gibi floresan proteinlerle birleştirilen ve reseptörlerin hareketini inceleyen çalışmaların, gerçek protein yapısını bozduğundan dolayı reseptörün endositoz ve ekzositoza bağlı hareketini değiştirebileceği savunulmaktadır (20). Ayrıca reseptör trafiğinin, enzimatik birçok süreçle ilişkili olduğundan, sıcaklığa bağlı değişiklik gösterebileceği düşünülmektedir (20). Aynı zamanda, merkezi sinir sistemi ve çevresel sinir sisteminin her bölgesinde farklı bir dinamik sergileyen reseptörlerin (21) arka kök gangliyonu nöronları

hasarında agonist ve antagonist etkisiyle nasıl etkilendiğine dair literatürde çalışma bulunmamaktadır. Amacımız immünositokimya yöntemi ile fizyolojik koşullarda ve oda sıcaklığında, agonist ve antagonist etkisinde MOR, DOR ve MOR-DOR heteromer reseptörlerinin trafiğinin nasıl değiştiğini gözlemlemek ve aksotomiye bağlı olarak bu reseptörlerin dinamiğinin nasıl etkilendiğini araştırmaktır. Bu çalışmalardan elde edilen sonuçların, nöron hasarından sonra oluşan opioid cevabı ve reseptörlerin dinamiği ile ilgili çalışmalara ışık tutacağını ve literatüre katkıda bulunacağını düşünmekteyiz.

4. GENEL BİLGİLER

4.1. Primer Duyu Nöronları ve Arka Kök Gangliyonu

Arka kök gangliyonları (AKG), duyusal bilginin dönüştürülmesinden modülasyonundan ve omuriliğe iletilmesinden sorumlu primer duyu sinir hücrelerinin hücre gövdelerini içeren yapılardır (1). AKG nöronlarının çeşitli türleri, hücre gövdelerinin büyüklüğüne ve işlevlerine göre sınıflandırılmaktadır. Tip A AKG nöronları büyüktür ve dokunma, titreşim ve propriosepsiyondan sorumludur; B tipi nöronların boyutu küçüktür ve nosisepsiyondan sorumludur (1). Histolojik çalışmalar, küçük nöronların (B tipi) sayısının büyük nöronların (A tipi) sayısını 71: 29 oranında aştığını tahmin etmektedir (22). Daha önce periferik süreçlere metabolik depo "yardımcı" olarak etki ettiği düşünülen hücre gövdelerinin, sitokin ve kemokin üretimi, bağışıklık faktörlerinin yukarı-aşağı regülasyonu veya Na+, K+ ve Ca++ iyon kanallarındaki değişiklikler gibi düzenlemelerle sinyal verme sürecine katıldığı bilinmektedir (23). Nosiseptif ağrı ve nöropatik ağrı gelişimi gibi duyusal işleme modülasyonundaki önemli rolleri ve klinik müdahaleye anatomik erişilebilirliği ile AKG, ağrı kontrolü için mükemmel bir klinik hedef olmaktadır (3) (Şekil 4.1.1).

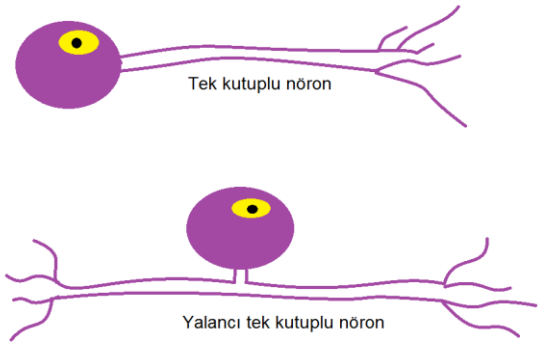


Şekil 4.1.1. Arka kök gangliyonunun (AKG) spinal kanaldaki anatomik ilişkileri (1).

İnsanlarda omurilik ve çevre arasında otonom ve duyu-motor bilgi taşıyan 31 sağ ve sol çift "karışık" spinal sinir vardır (24). Dorsal köklere dönüşen dorsal afferent duyu aksonlarından ve ventral köklerine dönüşen ventral efferent motor aksonlardan oluşan bu spinal sinirler, bitişik vertebral segmentler arasındaki ve üst ve alt pedikül arasındaki intervertebral sinir boşluğundan ortaya çıkarlar (24). Dorsal duyusal kök lifleri yanal olarak ilerlerken AKG 'i oluşturan hücre gövdeleri ile bir T-kavşak yoluyla bağlanmaktadır. AKG, sinir boşluğundaki pedikülün medial ve lateral yönleri arasındadır. Yalancı tek kutuplu yapıda olan bu hücre kütlesi, uydu glial hücreleri kompleksleri (SGC'ler) ile çevrilidir. Arka duyu kökünün distal aksonları birincil duyu sinirini oluşturmaktadır (2).

Birincil duyu nöronu, vücudun uyarı-yaralanma ya da iltihaplanma gibi, nöronun çevresel alıcı alanında başlar; nöronun atışını değiştirir ve merkezi sinir sistemi (CNS) içinde son bulur (25). Bu nöronlar, 1,5 m uzunluğa kadar olabilmektedir ve vücudun en büyük nöronlarıdır (26).

AKG nöronları, dallanmış aksonlardan hücre gövdesine giden bir T-birleşimiyle bağlı ikiye bölünmüş aksonlara sahip oldukları için ve aynı zamanda tek kutuplu nöronlardan da ayırt edilebilmesi için yalancı tek kutuplu nöronlar olarak adlandırılmaktadır (Şekil 4.1.2). Yalancı tek kutuplu nöronun aksonunun bir dalı T-kavşağından periferiye uzanır ve bir dalı T-kavşağından omuriliğe doğru uzanmaktadır. AKG nöronunun T-kavşağı, periferik nosiseptörden omuriliğin arka kök giriş bölgesine hareket eden, elektriksel uyaranın yayılımına katılan veya düşük geçiren bir filtre gibi davranan elektriksel uyarımların engellenmesine neden olabilmektedir (27).



Şekil 4.1.2. Tek kutuplu ve yalancı tek kutuplu nöron tiplerinin şematik gösterimi.

4.2. Sinir Hasarı ve Gelişen Cevaplar

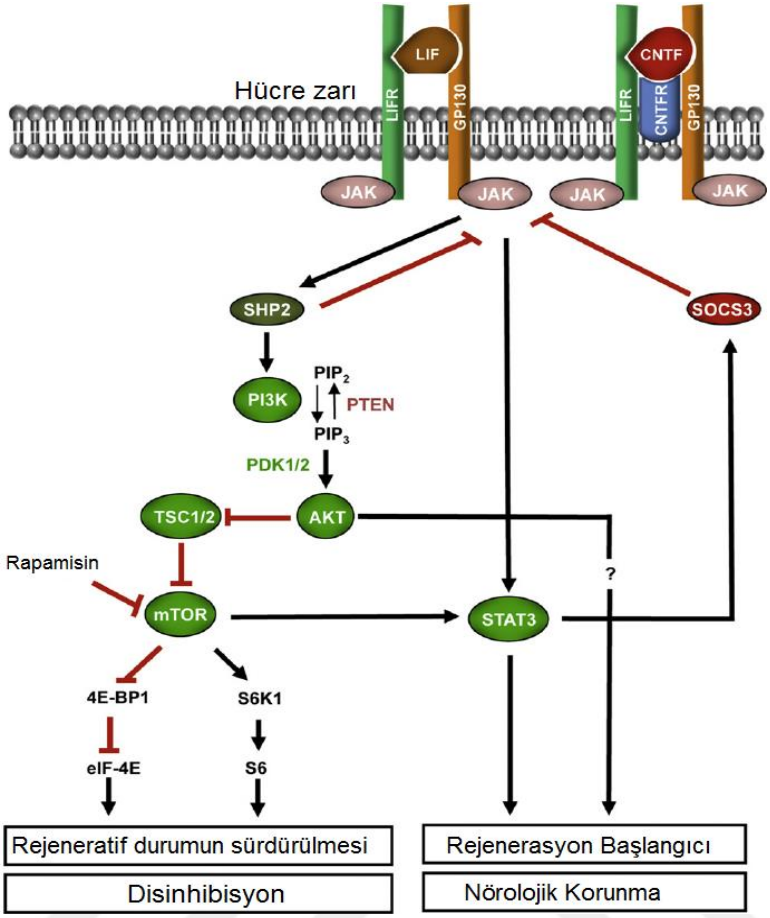
Periferik sinir yaralanması, endonöryumdaki hücresel ve moleküler değişiklikler ve aksonları kesilen nöronların hücre gövdeleri içindeki reaksiyonlarla desteklenen yara iyileşmesinin özel bir şeklidir (28). İn vivo ve in vitro ortamlarda oluşturulan periferik sinir hasarının diğer bir ismi de aksotomidir. Aksotomi terimi, akson kesmek ya da ezmek gibi aksonal bütünlüğü bozan süreçler için kullanılan bir terimdir (4). Aksotomi programlanmış hücre ölümüne yol açmaktadır. Aynı zamanda nöral büyüme hormonu (NGF) yokluğu da aksotominin izlediği yolağı takip eden programlanmış hücre ölümüne yol açabilmektedir (29). Periferik sinir hasarından sonra, arka kök gangliyonunda (AKG) duyusal nöronlar ve omurilikte veya beyin sapındaki motor nöronlar hayatta kalmayı ve onarımı desteklemek için morfolojik ve moleküler değişikliğe uğrarlar (5). Aynı zamanda motor ve duyu nöronlarının bir kısmı özellikle proksimal hasardan sonra ölebilmektedir.

Aksotomi sonrasında hücresel düzeyde, gen ifadesi azalımı ya da artışı veya bağışıklıkla ilgili cevaplar gibi birçok değişiklik gözlenebilmektedir. Görülen değişiklikler geriye dönük taşıma ile hücre gövdesine iletilirler. Bunu ilk gösteren Nissl'dir (30). Gen ifadesi ve protein azalımına baktığımızda yapılan bir çalışmada araştırmacı Harkonen, sempatik nöronların akson kesimine bağlı olarak hücre gövdesindeki katekolamin immünoreaktivitesinin tamamen kaybolduğu ve katekolamin yıkımında rol oynayan bir enzim olan monoamin oksidazın aktivitesinde de bir azalma olduğu sonucuna varmıştır (31). Başka bir çalışmada ise siyatik sinir

hasarı sonucunda omuriliğin arka boynuzunda P maddesinin azaldığı gözlemlenmiştir (32). Bunlara ek olarak, muskarinik ve glisinerjik reseptörlerin hipoglossal motor nöronlarda (33) ve nikotinik reseptörlerin de sırasıyla hipoglossal ve fasiyal sinirlerin kesiminden sonra yüz motor nöronlarında azaldığı öne sürülmektedir (34).

Aksotomi sonrası gen ifadesi azalımı veya protein miktarı azalmasının yanı sıra artış da gözlenebilmektedir. Örneğin, siyatik sinir hasarından sonra dördünü ve beşinci lumbar AKG'lerdeki duyu nöronlarında tübülin ve aktin ifadesinin arttığı gözlemlenmiştir (35). Gelişen aksonlarda büyük bir rol oynayan ve aksotomi sonrasında, AKG nöronlarında; hem mRNA seviyesinde hem de protein seviyesinde artışı gözlemlenen bir diğer protein ise Büyümeyle İlişkili Protein-43 (GAP-43)'tür (36). Diğer bir çalışmada ise aksotomiye uğrayan sempatik ve motor nöronlarda Vazoaktif İntestinal Peptidin (VIP) hem kendisinin hem de mRNA seviyesinin arttığı gözlemlenmiştir. Bu bahsi geçen proteinlerin genel olarak rejenerasyonla ilgili olduğu tespit edilmiştir (37).

Yapılan bir araştırmada, nöronal olmayan bir hücre fraksiyonu, nöronla zenginleştirilmiş kültüre şartlandırmak için eklendiğinde, VIP artışını sağlayan bazı faktörlerin ortama salındığı görülmüştür (38). Bu faktörlerin Schwann hücrelerinde üretilen Lösemi-İnhibe edici Faktör (LIF) ve Siliyer Nörotrofik Faktör (CNTF) olduğu tespit edilmiştir (39). İnterlökin (IL)-6 ve onkostatin M gibi sitokinlerin ait olduğu aileye üye olan LIF ve CNTF, glikoprotein gp130 içeren reseptör tipleriyle etkileşimde bulunmaktadır (40). Bu reseptörler yoluyla gerçekleşen sinyal iletimi Janus kinazın (JAK) aktivasyonu ve sinyal dönüştürücü ve transkripsiyon aktifleyici (STAT) proteini ile kontrol edildiği kanıtlanmıştır (Şekil 4.2.1) (41). Bütün bu proteinler ve sinyal yolakları sinir hasarlarına verilen cevaplar olarak öne sürülmektedir.



Şekil 4.2.1. CNTF ve LIF uyarımıyla sinyal yolağı aktivasyonunun şematik gösterimi (41).

4.3. Opioidler

Opium, latince ismi “Papaver Somniferum” olan haşhaş bitkisinin özünden elde edilmektedir ve halk dilinde “afyon” olarak bilinmektedir. “Opioid” terimi opiumdan köken alır ve sentetik ya da doğal olarak bulunan morfine benzeyen bileşiklerin geneline verilen isimdir (6).

Haşhaş bitkisi, antik çağlardan beri ağrının semptomatik olarak hafifletilmesi için kullanılmıştır. Bu bitkiden elde edilen morfin, bir opioid prototipidir ve yüz yıllarca tıbbi amaçlar doğrultusunda kullanılmıştır. Morfin kullanımını ilk raporlayan ikinci yüzyıl Yunan doktoru Galen’dir. Acıyı hafifletmek ve astım ve konjestif kalp yetmezliği çeken hastaları rahatlatmak için afyon kullanmıştır. Yakın geçmişte, 1806 yılında Alman kimyacı Serturner opium alkaloidlerini izole etmiştir, bunlardan biri de

morfindir. Fakat 167 yıl sonrasına kadar morfinin farmakolojisi reseptör seviyesinde tanımlanamamıştır (42, 43).

Morfinin; analjezik etkisi, solunum depresanı, kabızlık ve bağımlılık yapan özellikleri deney hayvanlarında ve insanlarda karakterize edilmiştir (7). Bazı kimyacılar morfinin yapısını manipüle ederek, analjezik etkisini koruyacak ve aynı zamanda solunum depresanı ve bağımlılığı azaltacak türevlerini geliştirmeye çalışmışlardır. Bu şekilde eroin (diasetilmorfin), hidromorfin, levorfanol ve bunlara benzer diğer yarı sentetik ilaçlar geliştirilmiştir. Bu ilaçlar ilk çıktığı zaman bağımlılık yapmadığı iddia edilmiştir fakat daha sonra bu iddiaların yanlış olduğu çok hızlı bir şekilde gösterilmiştir (9). Daha sonra, opiumdan izole edilen bir başka alkaloid olan tebain kullanılarak, morfine benzer birçok farklı ilaç geliştirilmiştir. Bu ilaçlardan etorfin, morfin benzeri ilaçlar arasında en güçlü olanlardan bir tanesidir ve günümüzde veteriner analjezik ve immobilize edici ajan olarak kullanılmaktadır. Bu ilacın yakın analoğu olan buprenorfin ise hem analjezik olarak kullanılmaktadır hem de eroin bağımlılığı tedavisinde kullanılmaktadır (44).

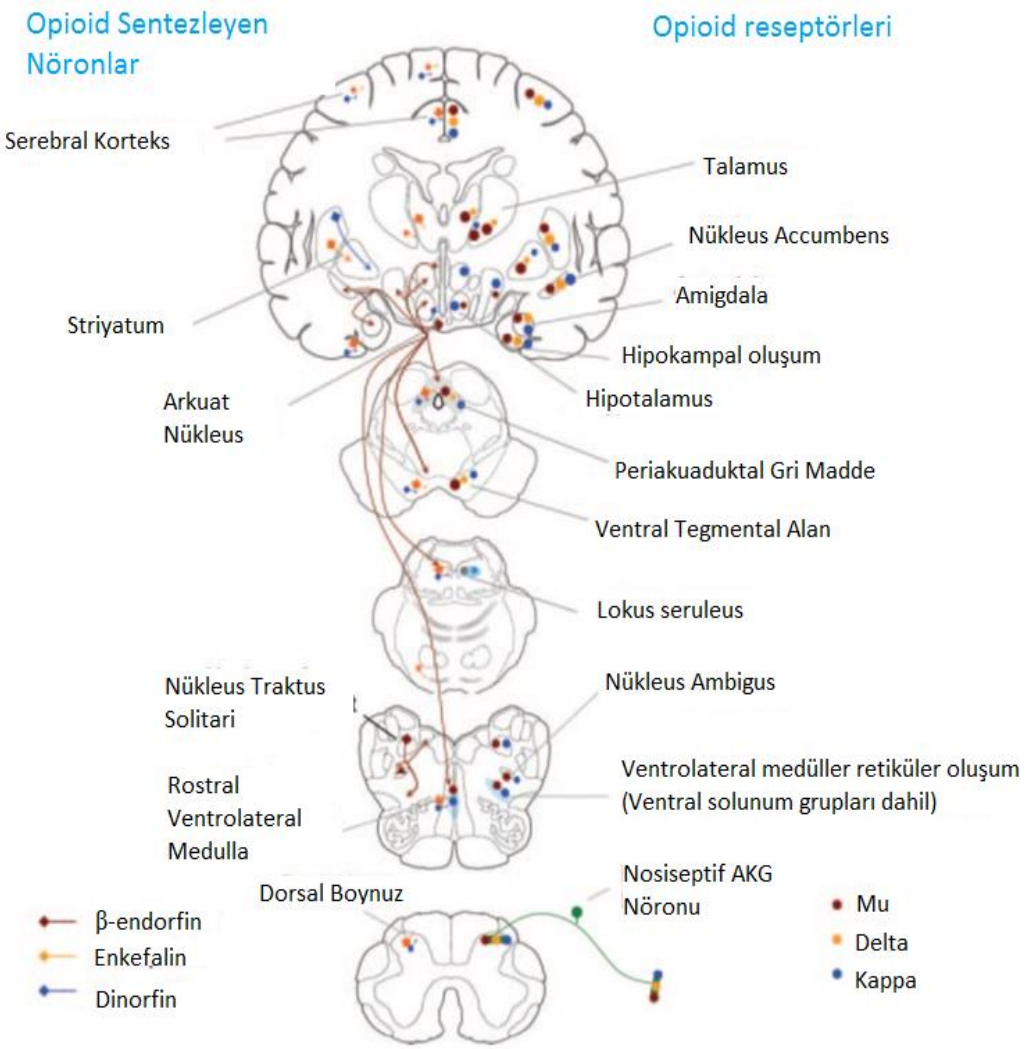
4.3.1. Endojen Opioidler

Uzun süren araştırmalar sonucunda, opiyat ilaçlarının reseptörleri olduğu deneysel olarak kanıtlanmaya başlanmıştır ve bu endojen reseptörlerin aktivitesinin endojen bir ligand tarafından düzenlenebileceği görüşü ortaya çıkmıştır. Daha sonra memeli beyninde endojen opioidlerin varlığı kanıtlanmıştır. Bu sonuçlar ilk olarak MTE'de (Massachusetts Teknoloji Enstitüsü-MIT) gerçekleştirilen Sinirbilim Araştırma Programı'nda (Neuroscience Research Program) 1974 yılında raporlanmıştır (8). Akabinde kimyasal karakterizasyonlar yapılmaya başlanmıştır. Araştırmacı Hughes ve arkadaşları hem fare vas deferensleri hem de guinea pig ileum preparatlarında güçlü nalokson-tersinir opiyat benzeri aktiviteye sahip, domuz beyninden izole edilen iki peptidin yapısını bildirmişlerdir. (45). Bu yakından ilişkili pentapeptidler Kosterlitz ve meslektaşları tarafından [Met5] enkefalin ve [Leu5] enkefalin olarak adlandırılmıştır. Bu çalışma, endojen nörotransmitterlerin kimyasal yapılarını tanımlamak için yeni geliştirilmiş kütle spektrometresi tekniğinin ilk defa kullanılmış olması bakımından dikkate değer bir çalışma olmuştur.

Daha sonra yapılan çalışmalar sonucunda [Met5] enkefalin dizisinin daha önce yayınlanmış hipofiz bezi peptidi olan ve adrenokortikotropinin (ACTH) üretildiği öncü peptidin bir parçası olan b-lipotropinin (b-LPH) dizisinde yer aldığı fark edilmiştir (9). Yarı saflaştırılmış hipofiz özütünün hızlı bir analizi, b-LPH hipofiz bezi peptidinin bir C-terminal fragmanının gerçekten güçlü bir opiyat aktivitesi uyguladığını göstermiştir (46). Bu peptid daha sonraları β-endorfin olarak adlandırılmaya başlanmıştır. Diğer bir çalışmada ise Goldstein ve arkadaşları domuz hipofiz bezlerinden "dinorfin" olarak adlandırılan çok güçlü, son derece basit bir opioid heptadekapeptidi izole etmiş ve karakterize etmişlerdir (47). Beyinde ve çevresinde fizyolojik ve patofizyolojik roller oynayan endojen peptidler, eylemlerinde opiyat uyuşturucularının benzerliklerini yansıttıkları için "opioid" peptidleri olarak anılmaya başlanmıştır. Daha sonraları ise "Endorfinler" genel terimi, kullanılmaya başlanmıştır. Yapılan çalışmalarda üç endojen opioid ailesini kodlayan mRNA'ların yapısı belirlenmiştir. Bunlar; β-endorfinin öncüsü olan preproopiomelanokortin (POMC), lösin(Leu)- ve metiyonin (Met)- enkefalinleri öncüsü olan preproenkefalin (PENK) ve dinorfinlerin (dinorfin A ve B ve neoendorfinler dahil) öncüsü olan preprodinorfin (proenkefalin B diye de adlandırılır)(PDNY)'dir (9). Bütün opioid peptidleri amino(N)-terminalinde bulunan, Tyr (tirozin)-Gly (glisin)-Gly-Phe (fenilalanin) dizilerinden oluşan ortak bir tetrapeptid bulundurmaktadır. Bu tetrapeptid dizisi üç farklı opioid reseptörüyle etkileşimde bulunmaktadır. Fakat öncü pronosiseptin (PNOC) tarafından üretilen nosiseptinin (önceleri orfanin FQ olarak bilinen) N-terminalinde tirozin amino asidi bulunmadığı için bu peptid farklı tip bir reseptörle etkileşimde bulunmaktadır (13).

Endojen opioid yolağının merkezi sinir sisteminde farklı organizasyonları mevcuttur (Şekil 4.3.1.1)(48). β-endorfin sentezleyen POMC nöronlarının lokasyonu, hipotalamusun arkuat nükleusu ve dorsal medulladaki nükleus traktus ile sınırlıdır ve merkezi sinir sistemi boyunca yaygın projeksiyonlar sağlar. Arkuat nükleustaki POMC nöronları, nükleus akumbens, amigdala, hipotalamus, periakutuktal gri bölge(PAG) ve ventral tegmental alan (VTA) dahil bütün limbik ön beyin ve orta beyin bölgelerini etkilerken; nükleus traktus solitari de bulunan POMC nöronları ise öncelikli olarak beyin sapı ve omuriliği etkilemektedir. Tam tersi PENK, PDYN, and PNOC'ler merkezi sinir sisteminin birçok seviyesine dağılmış neokorteks,

hipokampüs, talamus; bazal gangliyonlar, hipotalamus; PAG, VTA; rostral ventromediyal medulla (RVM) ve arka boynuzun yüzeysel katmanları ve trigeminal nükleus kaudalis gibi lokal nöronlarda ifade edilmektedir. Bu lokal opioderjik nöronlar heterojen bir dağılıma sahiptir. Örneğin, PENK çoğunlukla talamusta ifade edilirken PDYN ise çoğunlukla hipokampüste, hipotalamusta ve nükleus akumbenste ifade edilmektedir (49-51).



Şekil 4.3.1.1. Merkezi sinir sisteminde endojen opioid yolağı organizasyonu (48).

4.4. Opioid Reseptörleri

Son yüzyılın ortalarında, opiyat ilaç farmakolojisi çalışmalarındaki temalar, morfinin belirli bir reseptör formunu aktive ederek omurgalıların beynine etki ettiği

olasılığını, güçlü bir şekilde desteklemeye başlamıştır. Bu görüş ilk olarak araştırmacılar Beckett ve Casy tarafından yaptıkları çalışmaya bağlı olarak ileri sürülmüştür. Çalışmada; stereo izomer elde edebilmek için kimyasal manipülasyonlara morfinden daha açık, sentetik bir ajan olan meperidinin antinosiseptif özellikleri incelenmiştir (52). Opiyat ilaçları için spesifik reseptörler kavramı, 1960'ların sonuna kadar alanda çalışan birçok grup tarafından, ilaç-reseptör etkileşimini gerçekçi ölçümlerle gösterebilecek tekniklerin gelişmesiyle, kabul edilmeye başlanmıştır. Radyoaktif olarak işaretlenebilen ilaç moleküllerinin bulunmasıyla, radyoaktif işaretlenmiş ilacın, ilaç etkilerinin uygulandığı dokulardaki bağlanma bölgelerine bağlanması ölçülebilir hale gelmiştir (9). Goldstein ve ark. reseptörlere bağlanmanın yüksek afiniteli, doyurulabilir ve stereo spesifik olması gerektiğini belirtmiştir. Bu yaklaşımla Goldstein ve meslektaşları, toplam işaretlenmiş opiyat bağlanmasının yalnızca % 2'sinin doyurulabilir ve stereo spesifik olduğunu ve dolayısıyla bu durumun reseptör bağlanmasını yansıttığını ileri sürmüşlerdir (53).

Birkaç yıl içinde, üç grup, belirgin olarak daha yüksek özgül etkinliğe sahip olan [3H]- işaretli opiyatlar elde etmiştir ve böylece daha az serbest ilaç konsantrasyonları ile bağlanmanın araştırılması mümkün hale gelmiştir (spesifik olmayan bağlanmayı önemli ölçüde azaltarak). Aynı zamanda, cam fiber filtreleri kullanan ligand bağlama testleri geliştirilmiştir, bu da spesifik olarak bağlanmamış ilacın daha kapsamlı "yıkanması" na izin vermiştir. Bütün bu teknik gelişmeler sayesinde Pert ve Snyder (43), Terenius (54), ve Simon ve ark. (55) deneysel koşullar altında toplam gözlemlenen bağlanmanın %70'inden büyük olan, nicel olarak güvenilir, spesifik ilaç bağlanmayı göstermişledir. Rekabet çalışmaları, bu çalışmalarda bulunan işaretli bölgelerin, in vivo analjezik eylemin yapı-aktiflik çalışmalarından tahmin edildiği gibi, opiyat reseptörleri için beklenen bağlanma özelliklerine çarpıcı şekilde benzer bağlanma özellikleri sergilediğini hızla doğrulamıştır.

Daha sonraları yapılan çalışmalarda, reseptörleri aktive edebilen birden fazla endojen ajan tanımlanmıştır ve bu durum ajanların hepsinin aynı endojen reseptörü etkinleştirip etkinleştirmediği sorusunu derhal ortaya çıkarmıştır. Araştırmacılar Martin ve meslektaşları daha önce, morfin için M, nalorfin için N olarak adlandırılan

en az iki reseptör tipinin bulunduğu sonucuna varmışlardır (56). Daha ileri çalışmalar tamamlanınca, araştırmacı, tercih edilen ligandlar olan morfin, ketosiklazokin ve SKF 10,047'nin isimlerinden türetilen yeni isimleri sırasıyla μ, κ ve σ olan opiyat ilaçları için üç reseptör varlığını önermiştir (57). Fakat diğer araştırmacılar, sentetik opiyat benzeri ilaç olan SKF 10,047'ye (N-allil-normetazosin) tercihen yanıt veren σ reseptörlerinin nalokson tarafından antagonize edilmediği için aslında opioid reseptörleri ailesinin üyesi olmadığı sonucuna varmışlardır (58). Martin'in çalışması yayınlandıktan sonra Lord ve ark. yeni keşfedilen opioid peptitlerin morfin benzeri ilaçlarla karşılaştırmalarında, önce beyin zarlarındaki radyoligand bağlanma yerleri için rekabet çalışması yaparak ve ikinci olarak da izole edilmiş iki nöro-efektör biyoesey'de nalokson-tersinir agonist kullanarak nitel analiz sonuçlarını bildirmişlerdir. Bu sonuçlar ışığında, ikisi önceden Martin ve meslektaşlarının da belirttiği reseptörlerden μ ve κ reseptörleri olan üç farklı reseptörün varlığı tespit edilmiş olup, üçüncü reseptörün ise δ (Tercihen [D-Ala2] ikame edilmiş enkefalinlere ve aynı zamanda endojen enkefalinlere cevap veren) olarak isimlendirildiği bir reseptör olduğu kanıtlanmıştır (59).

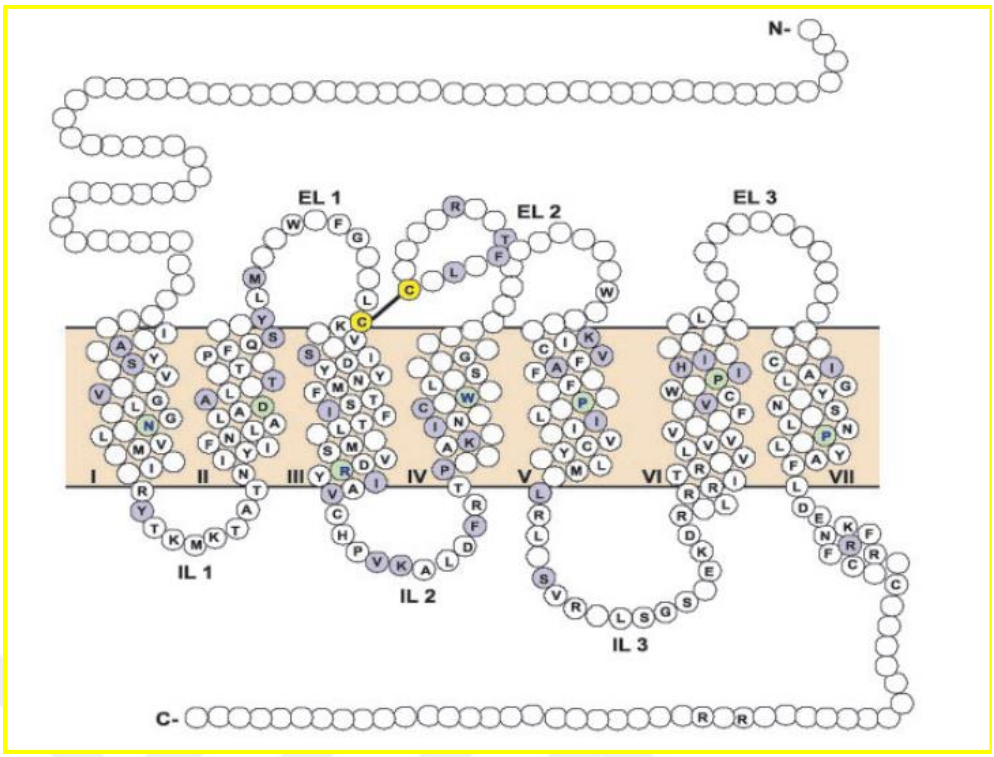
Araştırmalar ışığında δ, μ ve κ reseptörlerinin klonlanabilmesiyle yeni bir sürpriz ortaya çıkmıştır. Homoloji klonlama teknikleri kullanılarak, üç "klasik" opioid reseptörüne benzer reseptör klonları bulunmuş fakat kodlama diziliminde bazı farklılıklar olduğu hızla tespit edilmiştir. Geçici olarak ORL-1(60), KOR-3(61), veya LC132(62) olarak adlandırılan bu önceden bilinmeyen (ve özdeş) reseptör klonlarının ekspresyonu ve karakterizasyonu, μ, δ, veya κ reseptörlerine bağlanan ligandların bu yeni reseptöre önemsiz bir afiniteyle bağlandığını ortaya çıkarmıştır. İki araştırma grubu endojen ligandların beyne etkisini araştırmak için ifade edilen "ailesiz" klonların aktivasyonunu kullanmıştır (ORL1 veya LC132'yi ifade eden hücre hatlarında adenil siklaz aktivitesinin inhibisyonunu ölçerek). Her iki grup da aynı yeni heptadekapeptiti endojen ligandı olarak belirlemiştir ve nosiseptin (63) veya orphanin FQ (64) olarak isimlendirilmiştir. Daha sonra reseptör nosiseptin orfanin peptid reseptörü (veya NOP reseptörü) olarak tanınmaya başlamıştır. Şu anda kabul gören opioid reseptör tipleri, etkileri ve bunların önemli endojen ligandları, tabloda gösterilmektedir (Tablo 4.4.1).

Tablo 4.4.1. Opioid reseptör çeşitleri, etkileri ve ligandları (65).

Opioid reseptör çeşitleri		Etkileri	Endojen Ligandları
μ, mu veya MOP, MOR	μ1	Supraspinal analjezi, bağımlılık, yoksunluk, analjezik tolerans, mutluluk, kusma, yatıştırma, prolaktin salınımı, iştah artması immün baskılama, kaşınma	β-endorfin (seçici değil) Enkefalinler (seçici değil) Endomorfin-1
	μ2	Spinal analjezi, solunum depresyonu, gastrointestinal motilitede	Endomorfin-2
δ, delta veya DOP, DOR	δ1	Supraspinal analjezi, beslenmeyi tetikleme, büyüme hormonu salınımı	Enkefalinler (seçici değil)
	δ2	Supraspinal ve spinal analjezi	β-endorfin (seçici değil)
κ, kappa veya KOP, KOR	κ1	Disforik cevaplar	Dinorfin A
	κ2	Gastrointestinal geçişte azalma, yatıştırma, beslenme davranışı	Dinorfin B
	κ3	Supraspinal analjezi	α-neoendorfin
NOP		Analjezi ve morfin toleransı	Nosisepsiyon/orfanin FQ (N/OFQ)

4.4.1. Opioid Reseptörlerinin Yapısı ve Dağılımı

Opioid reseptörleri, yedi transmembran yayılımlı (7TM) G proteine bağlı reseptör (GPCR)'nin büyük süper familyasına aittir ve hücresel etkilerini Gi / Go iletim basamakları ile birleşerek üretirler (Şekil 4.4.1.1)(10, 16). Opioid reseptör ailesi OPRM1 geni tarafından kodlanan μ reseptörü (MOR, MOP veya OP1); OPRD1 geni tarafından kodlanan δ reseptörü (DOR, DOP, OP3); Ve OPRK1 geni tarafından kodlanan κ reseptörü (KOR, KOP, OP2) çeşitlerinden oluşmaktadır (10). Bu reseptörler, farklı agonistler ve antagonistlere olan afiniteleri ile tanımlanan farklı alt tipleri içermektedir (66). Örneğin, μ opioid reseptörleri supraspinal analjeziden sorumlu μ1 reseptörleri ve opioid tetiklemeli solunum depresyonuna ve miyoza aracılık eden μ2 reseptörlerini içerir (Tablo 4.4.1). Yapılan bir çalışmada, Porreca ve meslektaşları iki dengesiz antagonist olan, naltrindol 5'-izotiosiyanat (5'-NTII) (12) ve [D-Ala^2,Leu^5,Cys^6]enkefalinin (DALCE) (11), [D-Pen^2,D-Pen^5]enkefalinin (DPDPE) ve [D-Ala^2]deltorfin II'nin analjezik aktivitesi üzerine olan etkisini kıyaslamışlardır. Sonuç olarak 5'-NTII'nin seçici olarak [D-Ala^2] deltorphin II'nin etkisini engellediğini ve DALCE'nin de seçici olarak DPDPE'nin aktivitesini engellediğini bulmuşlardır. Bu etkilere göre [D-Ala^2] deltorfin II/5'NTII kısmı delta$_1$ olarak adlandırılırken DPDPE/DALCE kısmı ise delta$_2$ olarak adlandırılmaya başlanmıştır. Bu antagonistler delta alt tiplerinin geniş eylem yelpazesini aydınlatmak için yaygın bir şekilde kullanılmıştır (11, 12, 67).



Şekil 4.4.1.1. Opioid reseptörlerinin yapısı. Her transmembran sarmal yapı Roma rakamlarıyla işaretlenmiştir. İçi boş beyaz daireler MOR, DOR VE KOR arasında korunmamış amino asitleri temsil etmektedir. İçinde harf olan beyaz daireler bu üç reseptörde de aynı olan amino asitleri göstermektedir. Mor renkli olan daireler reseptörlerin kendi kimliklerini belirleyen amino asitleri ve yeşil olan daireler ise A reseptörü ailesine mensup olduklarını belirleyen amino asitleri temsil etmektedir (16).

Farmakolojik araştırmalar, β-endorfinin öncelikle μ ve δ reseptörleri, enkefalinlerin δ reseptörleri ve dinorfinlerin κ reseptörleri vasıtasıyla etkilerini gösterdiklerini kanıtlamıştır. Nosiseptin, geleneksel opioid reseptörleriyle yakından ilişkili olan ve aynı zamanda nosiseptin reseptörü (NOP) olarak da adlandırılan ORL1 (opioid reseptör benzeri-1) reseptörüne bağlanır, fakat bu reseptör seçici agonist ve antagonistlerine karşı düşük bağlanma afinitesi göstermektedir (13).

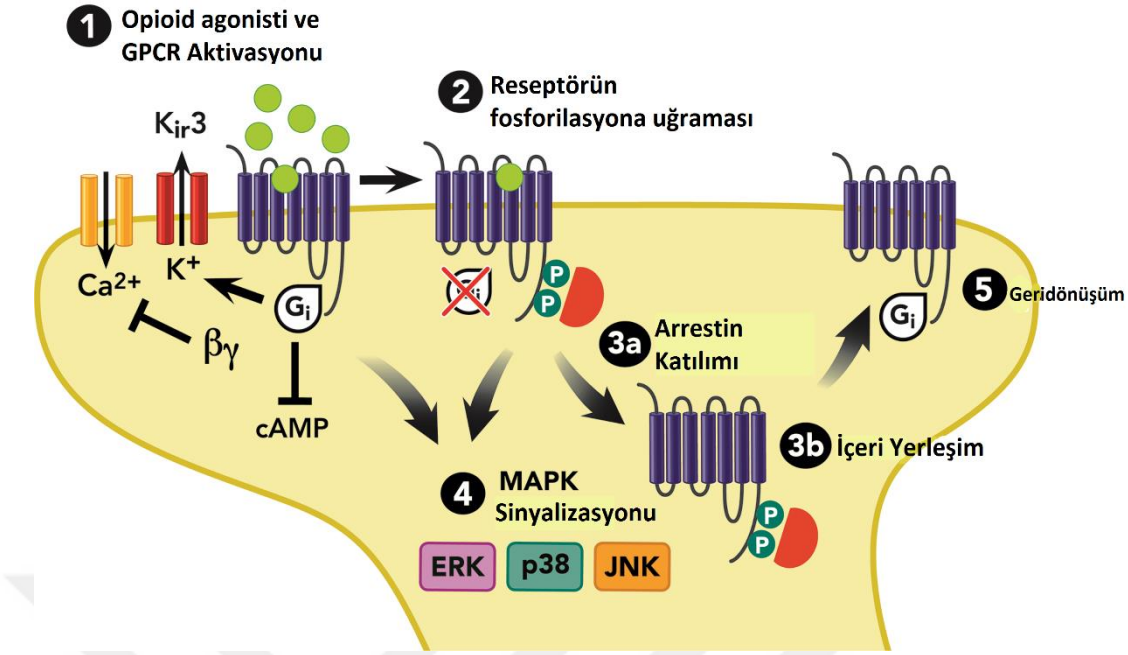
Opioid reseptörleri şekilde de görüldüğü üzere, serebral korteks, limbik sistem, bazal gangliyonlar, beyin sapı ve dorsal boynuz ve ayrıca arka kök ganglionu (AKG) ve enterik sinir sistemi de dahil olmak üzere MSS boyunca geniş çapta fakat farklı şekilde ifade edilmektedir (Şekil 4.3.1.1). μ reseptörü amigdala, talamus ve beyin sapında en fazla bulunan reseptörken; δ reseptörü çoğunlukla serebral korteks, koku sistemi, striatum ve limbik kortekste ve κ reseptörü claustrum, striatum ve

hipotalamusta ifade edilmektedir. Bu 3 reseptör alt tipi, arka boynuzu ve trigeminal nükleus kaudalisin yüzeysel katmanlarında eksprese edilir (49-51).

4.4.2. Opioid Reseptörlerinin Trafiği

Sınıf olarak, GPCR'ler, bilinen nörotransmitterlerin ve hormonların çoğunun eylemlerine aracılık eden temel fizyolojik öneme sahiptir (42). Opioid reseptörleri, medulla, locus coeruleus ve periakuduktal gri alan gibi ağrının modüle edildiği bölgelerde ifade edilmektedir. Bu bölgelerdeki opioid reseptörlerinin aktivasyonu, nöronları doğrudan inhibe eder ve bu da omuriliğin ağrı iletimini engeller (68). Bu sürecin çoğunlukla analjezi ile ilgili olduğu anlaşılmıştır.

Opioid reseptörleri, μ opioid reseptörü peptidi endorfin gibi endojen ya da morfin gibi ekzojen agonistlerle aktive edildikten sonra Gα ve Gβγ alt birimleri birbirinden ayrılır ve daha sonra çeşitli hücre içi yolaklar üzerinde etki göstermektedir (14). Opioid reseptör farmakolojisinde yapılan çalışmalar, guanozin trifosfataz (GTPase) aktivitesi gibi guanin nükleotitlerinin, opioid agonistleri ve endojen opioid peptidler tarafından uyarıldığını göstermiştir (69). Agonist müdahalesinin ayrıca adenilil siklazın (ve dolayısıyla siklik adenosil monofosfat (cAMP) üretiminin) inhibisyonuna, voltaj kapılı kalsiyum (Ca2 +) kanallarının (özellikle presinaptik P / Q- ve N tipi kanalların) inhibisyonuna ve içe doğru rektifiye potasyum (K +) kanallarının aktivasyonuna sebep olduğu çalışmalarda gösterilmektedir (15). Hücresel seviyede, tüm bu eylemler, nörotransmitter salınımının presinaptik inhibisyonuna, postsinaptik hiperpolarizasyona ve nöronal uyarılabilirliğin azalmasına sebep olmaktadır (70). Opioid reseptörleri aynı zamanda mitojenle aktive olan protein kinaz yolağını aktive eder ve çoğu GPCR gibi, aynı zamanda G-protein bağımsız yolaklar yoluyla hücre içi sinyalizasyonu tetikleyebilir (Şekil 4.4.2.1)(10).



Şekil 4.4.2.1. Opioid reseptör sinyalizasyonunun özeti. Genel olarak dört opioid reseptörü alt tipi ortak yolakları paylaşmaktadır (71).

Alkaloit veya peptid agonistleri tarafından aktive edildikten sonra opioid reseptörleri, birçok mekanizma tarafından düzenlenir ve sonucunda reseptör duyarsızlaşması veya tolerans görülebilmektedir. Reseptör duyarsızlaşması, herhangi bir reseptörün kendi G proteinine ya da ikincil mesajcı sinyal yolağına fonksiyonel bağlanmasını değiştiren süreç olarak tanımlanmaktadır (16). Bu duyarsızlaştırmayı sağlayan mekanizmalardan biri fosforilasyondur. G proteinine bağlı reseptör kinazlar (GRK) tarafından fosforlanan reseptörler β-arrestinin de katılımıyla kendi G proteininden ayrılarak hızlı bir reseptör duyarsızlaşmasına sebep olur. Bu süreç, reseptörün aktifleşmesiyle başlayan ve dakikalar içerisinde gerçekleşebilen hızlı bir süreçtir (72).

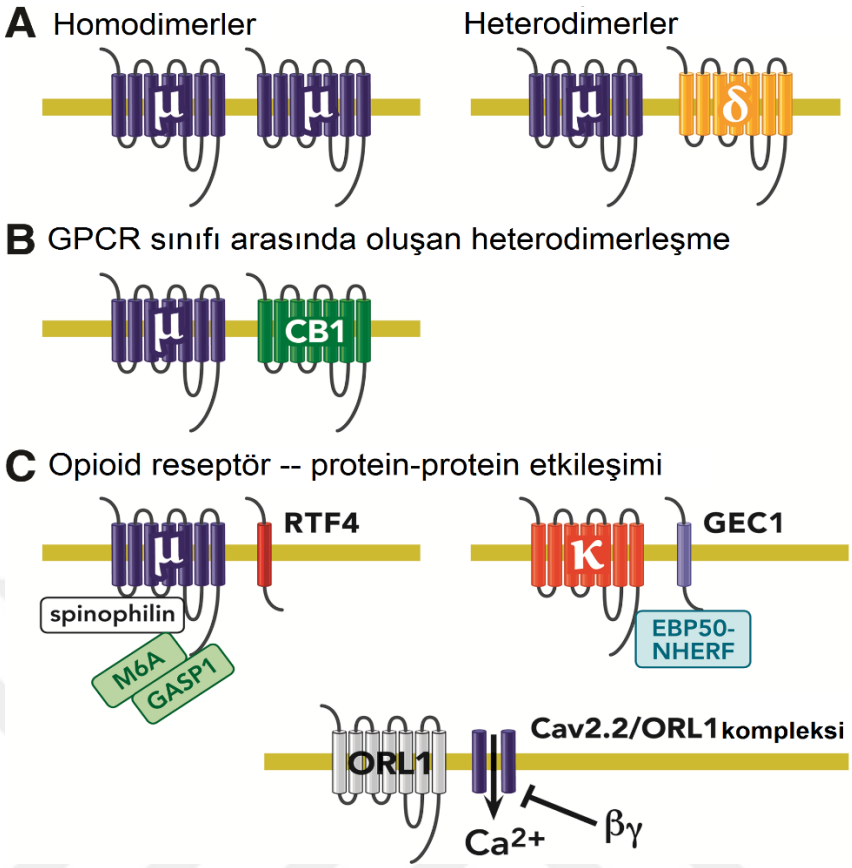
İlaç toleransı, sorumlu hücresel veya moleküler mekanizmaları belirtmeksizin, bir agoniste sürekli olarak maruz kaldıktan sonra karşı oluşan tepki kaybı olarak tanımlanır (20). Daha önceleri yapılan *in vitro* çalışmalarda bildirilene göre, kronik agoniste maruz kaldıktan sonra opioid reseptörlerinin aşağı regülasyonunun toleransı indüklediği düşünülmüştür (73). Fakat sonra yapılan çalışmalarda, aşağı-regülasyonun her agonist ile tutarlı bir şekilde gerçekleşmediğini ve toleransı tamamen açıklayamayacağını göstermişlerdir. Bu bulgular ışığında, MOR proteinlerinin aslında

aşağı-regüle edilmediği, bunun yerine aşağı yönlü sinyal yolaklarından ayrışabildiği ve duyarsızlaştırılabileceği öne sürülmüştür (16). Ayrıca araştırmalarda kronik olarak morfine maruz bırakılan hücrelerde ikincil mesajcı cAMP molekülünün seviyesinin arttığı gözlemlenmiştir. Fakat, cAMP'deki bu yükselmenin, inhibitör G proteinlerinden opioid reseptör ayrılmasına atfedilemeyebileceği, bunun yerine adenilil siklaz, protein kinaz A ve cAMP tepki-elementi bağlayıcı proteinin yukarı regülasyonu da dahil olmak üzere hücresel adaptif değişiklikleri yansıtabileceği de savunulmaktadır (74).

Opioid reseptörleri için endositoz, GRK/β-arrestin sinyaline bağlı duyarsızlaşmayı, fosforilasyon gibi diğer duyarsızlaştırma yollarından ayıran önemli bir özelliktir (16). GRK ve β-arrestin tarafından duyarsızlaştırıldıktan sonra opioid reseptörleri, hızla hücre içine endositozla alınmaktadır (Şekil 4.4.2.1). Endositoz ile opioid reseptörlerinin düzenlenmesinin tolerans gelişimini azalttığı ve bu nedenle de koruyucu bir role hizmet ettiği öne sürülmüştür (17). Endositozdan sonra, hücresel tepki agoniste karşı duyarsızlaştırılır ve aktif bir durumda hücre yüzeyine geri döndürülen reseptörler tekrar agonist için duyarlı hale gelmektedir (75). In vivo çalışmalar, morfine yanıt olarak MOR endositozunun kolaylaştırılmasının morfin toleransının gelişmesini engellediğini göstermiştir (75). Buna ek olarak, in vivo olarak, β-arrestin 2 eksikliğinin, kronik morfin tedavisinden sonra MOR'un duyarsızlaşmasını önlediği ve bu farelerin antinosiseptif toleransı geliştirmedikleri de gösterilmiştir (76).

4.4.3. Reseptörlerin Dimerizasyonu; MOR-DOR

Birçok rapor, GPCR'lerin proteinler ve diğer reseptör türleri arasındaki büyük etkileşimlerle, dinamik protein kompleksleri olarak var olduğunu göstermiştir. Çalışmalar, GPCR'lerin dimer ve oligomer oluşturabileceğini göstermiştir. Bu oligomerizasyon iki çeşit içerir: homodimerler (aynı reseptör) ve heterodimerler (farklı reseptör tipi)(18) (Şekil 4.4.3.1). Bu GPCR homomerlerinin ve heteromerlerinin varlığı transfekte hücre hattı sistemleri, hücre hatları ve birincil kültürlerde ve bazı durumlarda in vivo olarak gösterilmiştir (77).



Şekil 4.3.3.1. Opioid dimerizasyonu. Şekil, opioid reseptör homodimerlerini ve opioid reseptörü heterodimerlerini tasvir etmektedir (71).

Devi ve meslektaşları, opioid dimerizasyonu ile ilgili araştırmalara öncülük etmiş ve orijinal olarak opioid reseptörü heterodimerlerini tespit etmişlerdir (78). Ayrıca, δ reseptörlerinin homodimerler olarak var olabildiklerini ve agonist uyarımının onların ayrışmasına neden olduğunu bulmuşlardır (79). Yazarlar, başka bir çalışmada, KOR ve DOR'un, bu reseptörlerin trafiğini değiştiren heterodimerik kompleksler oluşturduğunu keşfetmişlerdir. DOR reseptörlerinin agonistinin neden olduğu hücre içine yönelimin, DOR / KOR reseptörlerini ifade eden hücrelerde esas olarak indirgendiğini göstermişlerdir (78). Dahası, seçici olarak KOR veya DOR heterodimeri hedefleyen 6'-guanidinonaltrindolun, opioid heterodimerlerin varlığı için ek kanıt sağlayan benzersiz bir sinyal verme varlığı ürettiği gösterilmiştir (80). MOR'un ORL1 ile heterodimer oluşturabildiği gösterilmiştir (81) ancak MOR veya KOR heterodimerlerin varlığı tartışmalara konu olmaya devam etmektedir (82).

Araştırmalarda, antagonizmin veya DOR'un yokluğunun morfin toleransı ve bağımlılığın gelişimini azalttığına ilişkin yapılan gözlemler, iki reseptör arasında bir etkileşim olabileceğini düşündürmüştür. Çalışmalar yalnızca MOR ve DOR heterodimerlerin varlığını tanımlamakla kalmamış, aynı zamanda MOR ve DOR heterodimerlerinin farklı ligand bağlama ve sinyal iletim özelliklerine sahip olduklarını ortaya koymuştur (19). Bu durum, heterodimerizasyonun, hücrenin ikinci mesajlaşma aktivitesini ayarlamak ve kontrol etmek için alternatif bir mekanizma olduğunu düşündürmektedir. Son derece düşük dozda DOR seçici ligandlarla yapılan muamele, MOR agonistinin bağlanmasında önemli bir artışa neden olmuştur. Benzer şekilde, MOR seçici ligandlarla yapılan işlem, DOR agonistinin bağlanmasında önemli bir artışa neden olmuştur (19). Buna ek olarak, her reseptör için son derece seçici sentetik agonistler, heteromer için azaltılmış potansiyel sergilemiştir. Bu çalışmalarla birlikte MOR-DOR heteromerinin Endomorfin-1 ve Leu-enkefalin için artmış afinite gösterdiği ve dimerizasyonun yeni bir bağlanma bölgesi oluşturabileceği düşünülmüştür (83).

MOR-DOR heteromerinin sinyalizasyonunun kapsamını değerlendirmek için farklı birçok yöntem denenmiştir. Engelleyici G proteini Gαi ile birleşmiş opioid reseptörleri kullanılan çalışmalar, DOR'a kaynaştırılan G proteininin MOR agonistleri tarafından aktive olabileceğini göstermiştir (veya bunun tam tersi) (84). Voltaj kapılı kalsiyum kanallarının engellenmesinde rolü olup olmadığını anlamak için DRG nöronlarında yapılan çalışmalarda, DOR'un yokluğunda, MOR agonisti morfinin ya da DAMGO'nun kalsiyum kanallarını engelleyemediği gözlenmiştir (85). Ayrıca MOR-DOR aracılıklı sinyallemeyi inceleyen yakın tarihli bir çalışma, G proteini aracılığından β-arrestin aracılı yolağına sinyalizasyon geçişini bildirmiştir (86). Bunlara ek olarak MOR-DOR heteromerlerinin trafiğini inceleyen çalışmalar çelişkili sonuçlar vermiştir. Bir çalışma, reseptör seçici ligand ile yapılan deneyin, onun kökenli reseptörünün endositozuna yol açtığını, ancak dimerik partnerin endositozuna neden olmadığını bildirmiştir (87). Bir başka çalışmada, bazı ligandlar (DAMGO veya deltorfin II) reseptör kompleksinin birlikte içe alımına neden olurken, diğer ligandların (DPDPE veya DSLET) bu konuda etkili olmadığı sonucuna varılmıştır (88). Başka bir araştırmaya göre MOR-DOR heteromerinin Gαi ile bağlantılı olmasının ancak reseptörler hücre yüzeyine ulaştıktan sonra olabileceği savunulurken diğer bir

çalışmada ise heteromerin endoplazmik retikulumdan hemen sonra Gαz ile birleştiği ve hücre yüzeyine birlikte bağlandıkları öngörülmüştür (88). Bu farklılıklar, hücre sistemindeki farklılıklardan veya bu araştırmalarda kullanılan deneyin doğasından kaynaklanabilir. MOR-DOR heteromerlerinin trafiğinin (olgunlaşma ve endositik) özelliklerini keşfetmek ve onları reseptör homomerleriyle karşılaştırmak için ek çalışmalara ihtiyaç vardır.

5. MATERYAL VE METOD

5.1. Deney Hayvanları

Araştırmada kullanılan Balb-c ırkı (6-8 haftalık) albino fareler, İstanbul Medipol Üniversitesi Tıp Araştırmaları Merkezi'nden (MEDİ-TAM) temin edilmiştir. Etik kurul onayı, İstanbul Medipol Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan alınmıştır.

5.2. Materyaller

Tablo 5.2.1. Kullanılan malzemeler

Malzeme Adı	**Firma**	**Katalog Numarası**
35 mm cam tabanlı kültür kabı	WPI	FD35-100
Poly-L-Lysine	Sigma	P6282
Laminin	Sigma	L2020
NBA (Without L-Glutamine, with Phenol Red)	Gibco	10888-022
RPMI 1640 1X (Without L-Glutamine, Without Sodium Pyruvate, with Phenol Red)	Multicell	350-030-CL
HBSS (With Sodium Bicarbonate, with Phenol Red)	Multicell	311-510-CL
Antibiyotik antimikotik solüsyon	Sigma	A5955
GlutaMAX	Gibco	35050061

B-27® Serum-Free Supplement	Gibco	17504044
Kollajenaz	Sigma	C7657
Tripsin	Gibco	15400-054
DNAz	Sigma	D4513
Tripsin inhibitörü	Sigma	T6522
FBS (Fetal Sığır Serum)	Sigma	F4135
Percoll	Sigma	P4937
μ-opioid reseptörü (MOR) antikoru	Alomone Labs	AOR-011
δ-opioid reseptörü (DOR) antikoru	Santa Cruz	Sc -7492
μ-δ heteromer reseptörü antikoru	Kerafast	EMS007
Morfin	Galen İlaç San.	-
Naloxone	Sigma	N7758
Alexa Flour 488 Eşek anti- Tavşan	ThermoFisher	A21206
Alexa Flour 546 Eşek anti- Keçi	Invitrogen	A11056
Alexa Flour 488 Tavuk anti- Fare	ThermoFisher	A21200
Alexa Flour 594 Tavuk anti- Fare	ThermoFisher	A21201
Alexa Flour 594 Tavuk anti- Tavşan	ThermoFisher	A21442
PBS Tablet	Biomatik	A3602
Triton-x	Biomatik	A4025

Tween-20	Sigma	P1379
Sığır Serum Albumin (BSA)	Capricorn	BSA-15
Tavuk Serumu	Sigma	C5405
Eşek Serumu	Sigma	D9663
Sodyum Azit	Sigma	S8032
Paraformaldehit	Sigma	158127

5.3. Kültür Hazırlıkları ve Hücre İzolasyonu

5.3.1. Kültür Kabı Kaplama

Kültür yapılacağı günden bir gün önce hücrelerin ekilecekleri 35 mm'lik cam tabanlı kültür kapları, hücrelerin yapışması ve yaşayabilmeleri için 750 µl %10'luk Poly-L-Lizin (75µl Poly-L-Lizin + 675 µl steril su) 35 mm'lik steril kültür kabının ortasına yayılarak kaplandı. 2 saat oda sıcaklığında kabin içerisinde bekletildikten sonra 2 kere 1' er ml distile su ile yıkandı. Daha sonra kültür kaplarına 500µl %1 laminin (5µl laminin + 495 µl steril su) eklendi ve gece boyunca 37 ^{o}C'de inkübatör içerisinde bekletildi. Hücre ekiminden önce 2 defa distile su ile yıkandı ve kuruması için bekletildi.

5.3.2. Besiyerlerinin hazırlanması

Kültürün yapılacağı gün öncelikle besiyerleri hazırlandı. Doku diseksiyonu için kullanılacak olan besiyeri için %1 antibiyotik ve %1 glutamax olacak şekilde yaklaşık 15ml RPMI 1640 hazırlandı. Diseksiyona kadar soğuması için +4 ^{o}C'de bekletildi.

Yine aynı zamanda kültür besiyeri de hazırlandı. Kültür besiyeri için içinde %1 antibiyotik, %1 glutamax ve %2 B27 olacak şekilde ve kültür kabı sayısına göre

değişen miktarda Neurobasal A hazırlandı. Besiyeri 37 ºC'de inkübatör içerisinde kapağı yarım açık olacak şekilde bekletildi.

5.3.3. Doku Diseksiyonu

Balb-C farelere CO_2 solutarak ötenazi yapıldı. Farenin göğüs kafesi omurgayla birlikte çıkarılarak diseksiyon için hazırlanan besiyeri içerisine alındı. Diseksiyon -20˚C de bekletilen soğuk demir tabla üzerindeki silikon tabanlı bir cam kap içerisinde yapıldı. En az 20 tane olacak şekilde, arka kök gangliyonları stereo mikroskop altında hızlı bir şekilde steril koşullarda çıkarıldı. Çıkarılan gangliyonlar diseksiyon için hazırlanan besiyeri içerisinde bekletildi.

5.3.4. Hücre İzolasyon Protokolü

5.3.4.1 Kollajenaz inkübasyonu

990 µl kültür besiyeri + 10 µl kollajenaz olmak üzere 1 ml %1'lik kollajenaz enzimi ile besiyeri hazırlandı. Tam olarak karışması sağlandı. Çıkarılan AKG'ler hazırlanan enzimli besiyerine alındı. 37ºC'de inkübatörde 40 dakika kapağı açık şekilde bekletildi.

5.3.4.2 Kollajenaz enziminin uzaklaştırılması

Kollajenazlı besiyeri AKG'leri çekmeyecek şekilde alındı. 3 kez 1 ml HBSS ile gangliyonların hareket etmesi sağlanarak yıkama yapıldı. HBSS çekilmeden önce gangliyonları çekmemek için çökmeleri beklendi. Yıkamanın sonrasında HBSS dikkatlice çekildi.

5.3.4.3 Tripsin inkübasyonu

450 µl kültür besiyeri + 50 µl tripsin 10X olacak şekilde 500 µl Tripsin 1X hazırlandı ve gangliyonların bulunduğu yere homojen bir şekilde eklendi. 37ºC'de inkübatör içerisinde 15 dakika kapağı açık bir şekilde inkübe edildi.

5.3.4.4 Mekanik Ayrıştırma ve DNAz inkübasyonu

Enzim henüz besiyeri içerisindeyken gevşemiş olan dokular, gittikçe daralan pipet uçlarından geçirilerek mekanik olarak ayrıştırıldı. Hücreler önce 1000 µl'lik ucu biraz kesilmiş pipet ucu, sonra 1000 µl'lik kesilmemiş pipet ucu, sonra 200 µl'lik normal pipet ucu ve son olarak da insülin enjektörü kullanarak 1 kez ayrıştırıldı. Ayrıştırılmış hücre süspansiyonuna %2 olacak şekilde 10µl DNAz eklendi. 40 dk. 37^{o}C'de inkübatörde kapağı açık bir şekilde inkübe edildi.

5.3.4.5 DNAz ve Tripsinin Uzaklaştırılıp ve Aktivitesinin Durdurulması

Hücre süspansiyonu 15ml'lik falkon tüpe alındı ve 4^{o}C'ye soğutulan santrifüjde 3 dakika 1000 RPM' de çöktürüldü. Tüpün tabanında biriken hücrelere değmeden süpernatant alınıp atıldı ve enzim uzaklaştırıldı. Tüm enzim aktivitesini durdurmak için hücrelere, 360 µl kültür besiyeri, 40 µl FBS ve 30 µl tripsin inhibitörü eklendi. Bu şekilde bir sonraki aşama olan percoll gradiyenti için kullanılacak hücre tabakası oluşturuldu.

5.3.4.6 Hücrelerin ayrıştırılması

Hücrelerin özgül ağırlıklarına ve büyüklükleri göre ayrışabilmesi için %60'lık, %35'lik ve %10'luk olacak şekilde 3 tabakalı percoll gradienti hazırlandı. En önce %60'lık (300µl Percoll + 200µl kültür besiyeri), sonra %35'lik (175 µl Percoll + 325 µl kültür besiyeri) ve en son da %10'luk (50 µl Percoll + 450 µl kültür besiyeri) percoll solüsyonu yavaşça 15 ml'lik falkona eklendi. Hazırlanan tabakaların üzerine bir önceki adımda hazırlanan hücre solüsyonu yavaşça eklendi. 1700 RPM'de +4^{o}C'de 20 dakika santrifüj edildi. Pipet %60'lık tabakanın ortasına daldırılarak 750µl hücre solüsyonu çekildi.

5.3.4.7. Percoll'ün uzaklaştırılması

Çekilen 750µl hücre solüsyonu başka bir falkona alındı ve 3 ml kültür besiyeri eklendi. Hücre süspansiyonu 3 dakika 800 RPM'de 4 ^{o}C'ye soğutulmuş santrifüjde çöktürüldü. Falkon dibindeki hücrelere değmeden süpernatant kısmı atıldı.

5.3.4.8. Hücre ekimi

Falkon tüpün dibinde kalan hücrelerin üzerine kaç tane kültür kabı kullanılacaksa kap başı 500 µl kültür besiyeri olmak üzere besiyeri eklendi ve homojen olarak karıştırıldı. Kültür kaplarına çiçek şeklinde damla damla 500 µl hücre solüsyonu ekildi. Hücreler 2 saat 37 ^{o}C'de inkübatör içerisinde inkübe edildi. 2 saatin sonunda hücreler yapıştıktan sonra kültür kabı başına 1ml kültür besiyeri eklendi.

5.4. Aksotomi ve Öncesi Hazırlıklar

5.4.1. Deney Grupları Hazırlığı

5.4.1.1. 37 ˚C Kontrol Grupları

Kültür aşamasından 2 gün sonra 37˚C'de inkübe olan hücreler hiçbir aşamaya uğramadan paraformaldehit (PFA) ile tespit edildi.

5.4.1.2. 37˚C Aksotomi Grupları

Sadece aksotomi yapılacak olan gruplar için ayrılan hücreler hiçbir manipülasyona uğratılmadan aksotomi için mikroskoba alındı.

5.4.1.3. 37˚C Nalokson Grupları

Ticari olarak alınan toz halindeki nalokson distile su ile çözülerek 500µM'lık stok solüsyonu hazırlandı ve +4˚C'de saklandı. Kültür kabındaki ekili hücrelere ait besiyerinden 990µl alınıp 10µl nalokson stok solüsyonu ile karıştırıldı. Kültür kabındaki besiyerinin tamamı çekildi. Hazırlanan karışım tekrar kaba eklendi. Böylece 5µM'lık nalokson eklendi. 37˚C'de inkübatör içerisinde 4 sa bekletildi.

5.4.1.4. 37˚C Nalokson ve Aksotomi Grupları

Kültür kabındaki ekili hücrelere ait besiyerinden 990µl alınıp hazırlanmış olan nalokson stok solüsyonundan alınan 10µl ile karıştırıldı. Kültür kabındaki besiyerinin tamamı çekildi. Hazırlanan karışım tekrar kaba eklendi. Bu işlem aksotomi yapılmadan 1 sa önce gerçekleştirildi. Bu süreçte 37˚C'de inkübe edildi.

5.4.1.5. 37˚C Morfin Grupları

Ticari olarak alınan sıvı halindeki morfin HBSS ile karıştırılarak 500µM'lık stok solüsyonu hazırlandı. 10'ar µl alikotlanarak -20˚C de saklandı. Kültür kabındaki ekili hücrelere ait besiyerinden 990µl alınıp 10µl morfin stok solüsyonu ile karıştırıldı. Kültür kabındaki besiyerinin tamamı çekildi. Hazırlanan karışım tekrar kaba eklendi. Böylece 5µM'lık morfin eklendi. 37˚C'de inkübatör içerisinde 4 sa bekletildi.

5.4.1.6. 37˚C Morfin ve Aksotomi Grupları

Kültür kabındaki ekili hücrelere ait besiyerinden 990µl alınıp hazırlanmış olan morfin stok solüsyonundan alınan 10µl ile karıştırıldı. Kültür kabındaki besiyerinin tamamı çekildi. Hazırlanan karışım tekrar kaba eklendi. Bu işlem aksotomi yapılmadan 1 sa. önce gerçekleştirildi. Bu süreçte 37˚C'de inkübe edildi.

5.4.1.7. 25 ˚C Kontrol Grupları

Kültür aşamasından 2 gün sonra 37˚C'de inkübe olan hücreler 25˚C ve %5 CO_2 olan inkübatöre alındı ve 2 sa. bekletildi, daha sonra paraformaldehit (PFA) ile fikse edildi.

5.4.1.8. 25 ˚C Aksotomi Grupları

Sadece aksotomi yapılacak olan gruplar için ayrılan hücreler 25˚C ve %5 CO_2 olan inkübatöre alındı ve 1 sa. bekletildi. Daha sonra aksotomiye başlandı.

5.4.1.9. 25˚C Morfin Grupları

Kültür kabındaki ekili hücrelere ait besiyerinden 990µl alınıp 10µl morfin stok solüsyonu ile karıştırıldı. Kültür kabındaki besiyerinin tamamı çekildi. Hazırlanan karışım tekrar kaba eklendi. Böylece 5µM'lık morfin eklendi. 25˚C'de inkübatör içerisinde 4 sa bekletildi.

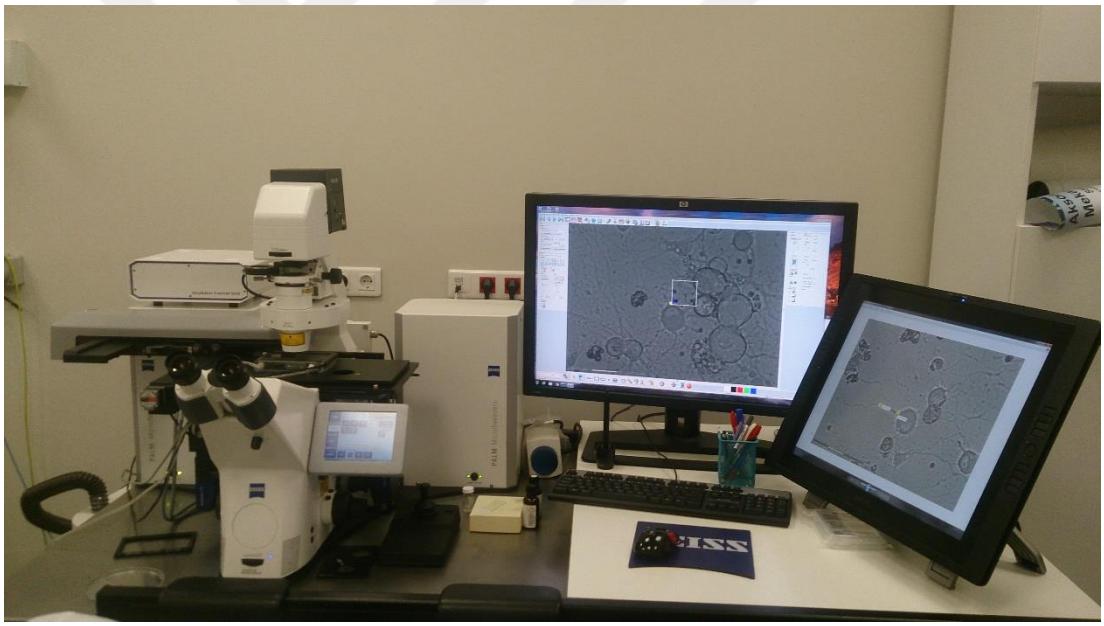
5.4.1.10. 25˚C Morfin ve Aksotomi Grupları

Kültür kabındaki ekili hücrelere ait besiyerinden 990µl alınıp hazırlanmış olan morfin stok solüsyonundan alınan 10µl ile karıştırıldı. Kültür kabındaki besiyerinin

tamamı çekildi. Hazırlanan karışım tekrar kaba eklendi. Bu işlem aksotomi yapılmadan 1 sa. önce gerçekleştirildi. Bu süreçte 25˚C'de inkübe edildi.

5.4.2. Aksotomi

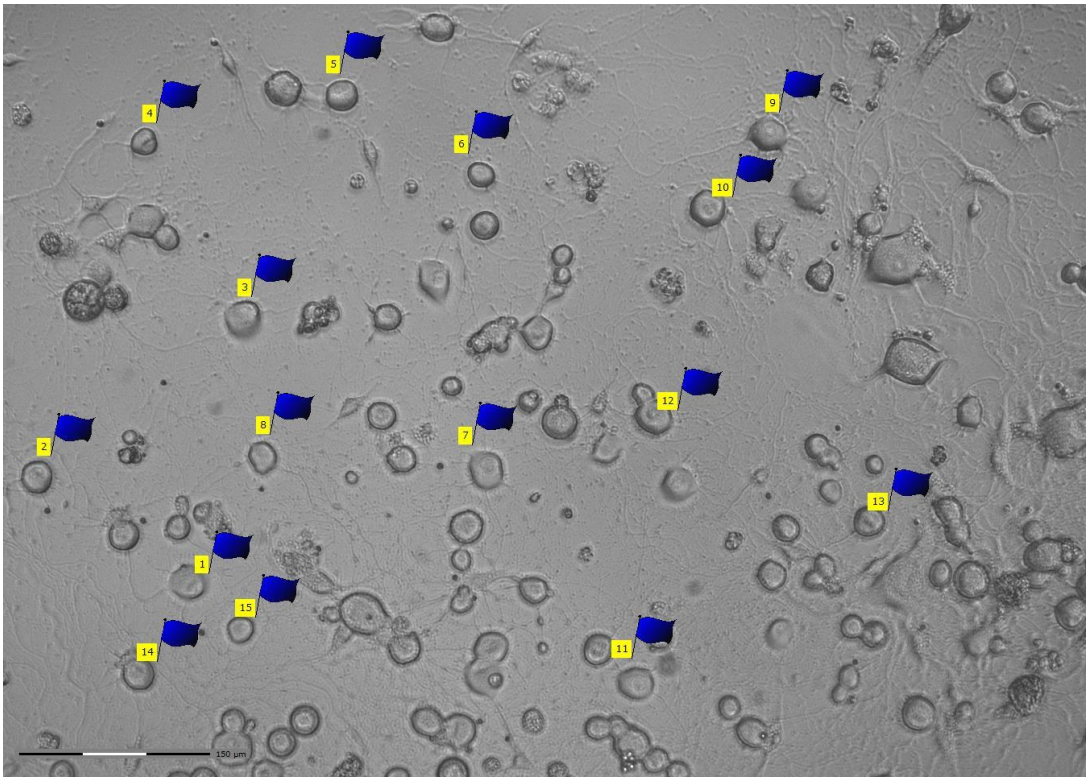
İn vitro şartlarda hücrelerde aksotomi modeli oluşturabilmek için Zeiss PALM CombiSystem mikroskobu kullanıldı (Resim 5.4.2.1). Cihazda infrared lazer ve ultraviole lazer olmak üzere iki farklı lazer bulunmaktadır. 1064 nm dalga boyundaki infrared lazer tutup taşıma işlemi yapabilirken ultraviole lazer ise kesim işlemi için kullanılmaktadır. Mikroskopta 10X, 20X, 40X, 32X ve 100X büyütmeli EC-Plan-Neofluar objektifler bulunmaktadır. Her büyütmedeki objektifte kesim yapılabilmektedir. Ayrıca cihazda canlı hücreler için sıcaklık ve %5 CO_2 sağlayan inkübatör sistemi de bulunmaktadır.



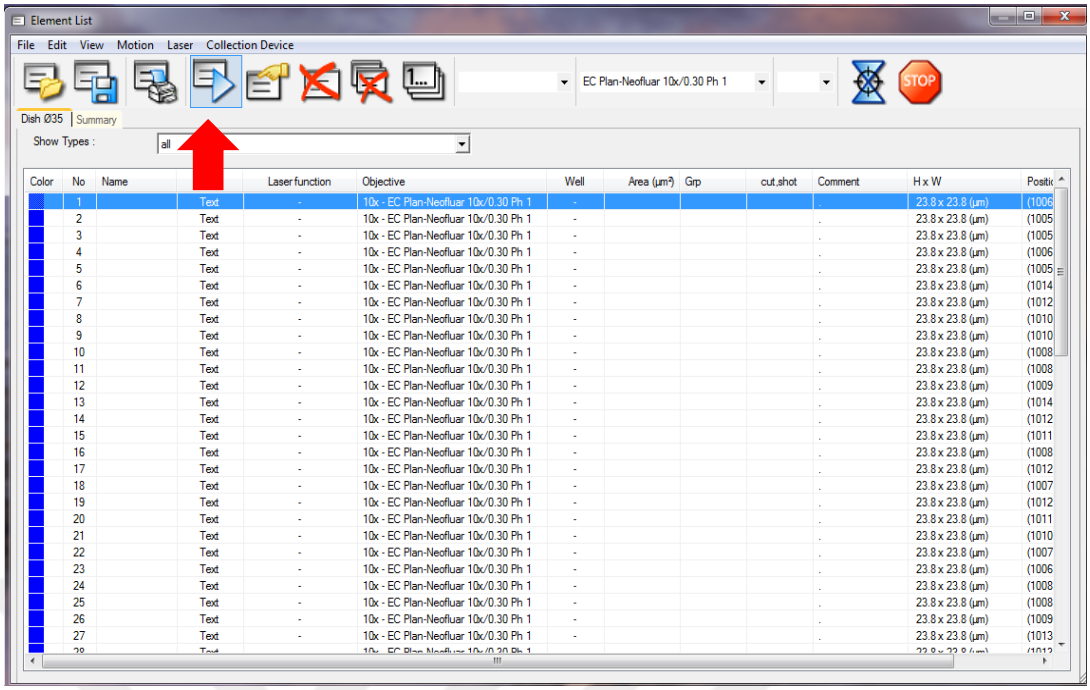
Resim 5.4.2.1. Palm CombySystem Mikroskobu.

PALM RoboSoftware yazılımı kullanılarak aksotomi yapıldı. Aksotomi yapılacak gruplara göre mikroskobun inkübatör sıcaklığı ayarlandı. Daha önce hazırlanan kültür kapları mikroskoba yerleştirildi. Kesim yapılacak olan hücreleri daha sonra tekrar kolaylıkla bulabilmek için kültür kabı saat 12 yönünde kapağıyla beraber işaretlendi ve 10x objektifte aksotomi yapılacak hücreler seçilerek fotoğrafları çekildi (Resim 5.4.2.2). Petri başına en az 65 hücre de aksotomi yapılacak şekilde hücreler

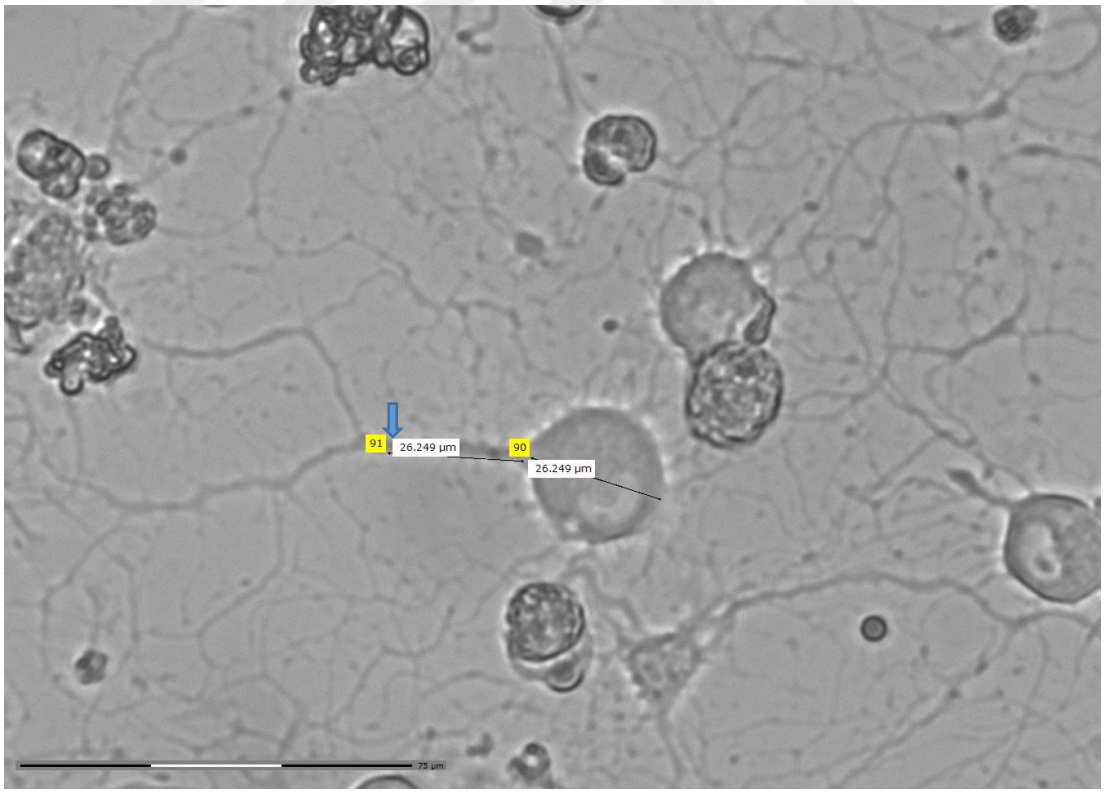
seçildi. Daha sonra daha iyi görmek ve kesebilmek için 40x objektif kullanıldı. Seçilen hücrelerin konumları yazılımın element listesi sekmesine otomatik olarak kayıt edildi (Şekil 5.4.2.1). Kayıt edilen hücrelere teker teker gidilerek aksotomi yapılacak bölgesi seçildi ve kesim işlemi yapıldı. Aksotomi yapılacak olan bölge yaklaşık olarak hücre gövdesinin çapı uzunluğu kadar uzaklıkta olacak şekilde seçildi (Resim 5.4.2.3). Aksotomi işlemi toplamda yaklaşık yarım saat kadar sürdü.



Resim 5.4.2.2. Hücre seçimi ve 10x objektifle çekilen fotoğrafı.



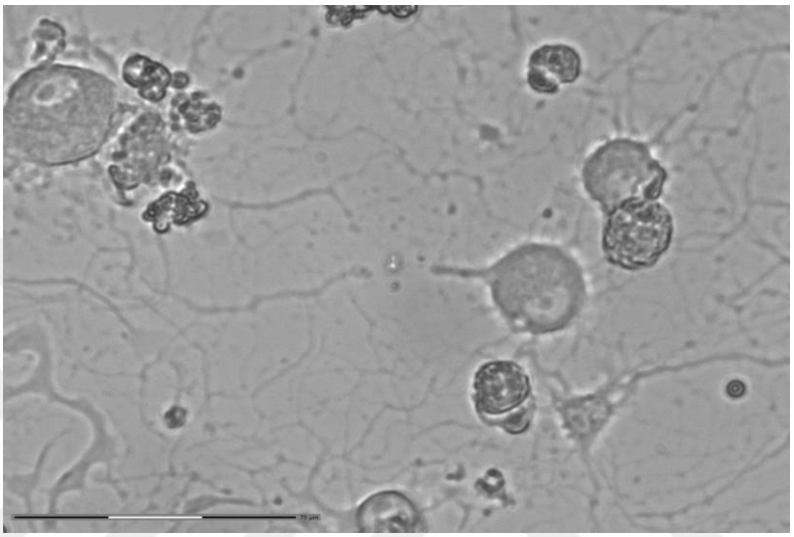
Şekil 5.4.2.1. Element listesi sekmesi. Okla gösterilen yere tıklanarak önceden işaretlenmiş hücrenin konumuna ulaşılır.



Resim 5.4.2.3. Aksotomi yapılacak olan bölgenin mesafesinin ölçülmesi. Ok kesim yerini göstermektedir.

5.5. Aksotomi Sonrası

Aksotomi sonrasında nalokson ve morfin verilen gruplar 2 saat daha deney düzeneğine uygun sıcaklıklarda inkübe edildi yani toplamda 4 sa. morfin ve nalokson inkübasyonu gerçekleştirildi. Sadece aksotomi olan gruplar ise aksotomi yapılan ilk hücreden yaklaşık 1 sa. sonrasına kadar daha inkübe edildi.



Resim 5.5.1. Aksotomi sonrası hücre (40x).

5.6. İmmünositokimya

5.6.1. Solüsyon Hazırlama

5.6.1.1. Tuzlu Fosfat Tamponu (PBS) (1x) Solüsyonu Hazırlanması

PBS, tablet şeklinde satılmaktadır ve kutusunun üstünde 1x PBS hazırlamak için kaç tane tablet kullanılması gerektiği yazmaktadır. 500 ml PBS hazırlamak için 500 ml dH_2O'ya 5 tane tablet eklendi. Manyetik karıştırıcı için kullanılan balıktan içine atıldı ve karıştırıcı üstüne koyuldu. Tabletlerin iyice eriyip çözünmesi beklendi. pH'ın 7.4 olup olmadığı kontrol edildi.

5.6.1.2. Sulandırma ve Bloke Etme Solüsyonlarının Hazırlanması

Eşek ve tavuk serumları için iki ayrı solüsyon hazırlandı. 2 tane 50ml'lik cam otoklav şişeleri üzeri eşek ve tavuk olarak işaretlendi. 40'ar ml solüsyon hazırlamak

için 2 ayrı şişeye 25'er ml hazırlanan PBS eklendi. İçlerine manyetik karıştırma için balık atıldı ve %3 olacak şekilde 1,2'şer gram sığır serum albumin (BSA) tartılıp eklendi. İki şişe de karıştırıcıya konuldu ve çözünmesi beklendi. Daha sonra iki şişeye de 3/1000 olacak şekilde 120'şer mg sodyum azit eklendi ve karışması sağlandı. %1 olacak şekilde tavuk şişesine 400µl tavuk serumu, eşek şişesine de 400µl eşek serumu eklendi ve tekrar manyetik karıştırıcıda karıştırılması sağlandı. Son olarak her şişe PBS ile 40 ml'ye tamamlandı ve tekrar karıştırıldı.

5.6.1.2.1. Tavuk Sulandırma ve Bloke Etme Solüsyonu

40ml'lik hazırlanan solüsyon 20'şer ml olmak üzere iki falkona bölündü. Bir falkon "tavuk sulandırma" diğeri ise "tavuk bloke etme" olarak işaretlendi. Sulandırma solüsyonu içerisine serolojik pipetle %1 olacak şekilde 200µl Tween-20 eklendi. Bloke etme solüsyonu içerisine ise 1/1000 olacak şekilde Triton-x eklendi ve bu solüsyonların vorteks yardımıyla karışması sağlandı.

5.6.1.2.2. Eşek Sulandırma ve Bloke Etme Solüsyonu

40ml'lik hazırlanan solüsyon 20'şer ml olmak üzere iki falkona bölündü. Bir falkon "eşek sulandırma" diğeri ise "eşek bloke etme" olarak işaretlendi. Sulandırma solüsyonu içerisine serolojik pipetle %1 olacak şekilde 200µl Tween-20 eklendi. Bloke etme solüsyonu içerisine ise 1/1000 olacak şekilde Triton-x eklendi ve bu solüsyonların vorteks yardımıyla karışması sağlandı.

5.6.1.3. PFA (%4) Hazırlanması

100 ml PBS'e 4gr PFA eklendi. Isıtıcılı manyetik karıştırıcıda 65˚C' de karışması sağlandı. Bu işlem çok uzun sürdüğü için damla damla 1M NaOH PFA çözünene kadar eklendi. PFA çözündükten sonra 1M HCl ile pH'ının 7.4'e ulaşması sağlandı.

5.6.1.4. %0,2'lik Tween-20'li PBS Hazırlanması

200ml PBS içerisine 400µl Tween-20 eklendi ve karıştırıcıda karışması sağlandı.

5.6.1.5. %0,2'lik Sodyum Azit'li PBS hazırlanması

50ml PBS içerisine 100mg sodyum azit eklendi ve karıştırıcıda karışması sağlandı.

5.6.2. Boyama

5.6.2.1. Fiksasyon

Kültür kaplarından besiyerleri dikkatlice çekildi. Hücreler 2 kere 1'er ml PBS ile yıkandı. Daha sonra 1'er ml %4 PFA eklendi ve oda sıcaklığında 15 dk. bekletildi. PFA çekildi ve ayrı PFA atığına atıldı. Hücreler tekrar 2 kere 1'er ml PBS ile yıkandı.

5.6.2.2. Bloke Etme

Kültür kaplarına, deney gruplarına ve kullanılacak olan ikincil antikora göre bloke etme solüsyonları eklendi. Yani tavuk ikincil antikoru kullanıldığında, tavuk bloke etme solüsyonu; eşek ikincil antikoru kullanıldığında ise eşek bloke etme solüsyonu kullanıldı. Bloke etme solüsyonlarından her kültür kabına 750'şer µl eklendi ve oda sıcaklığında 45 dk. beklenmesi sağlandı. Daha sonra hücreler 2 kere 1'er ml PBS ile yıkandı.

5.6.2.3. Birincil Antikor İlavesi

MOR antikoru (tavşan-poliklonal) 1/200 oranında (1µl antikor + 199µl eşek sulandırma solüsyonu) eşek sulandırma solüsyonu ile sulandırıldı. DOR antikoru (keçi-poliklonal) 1/200 oranında (1µl antikor + 199µl eşek sulandırma solüsyonu) eşek sulandırma solüsyonu ile sulandırıldı. Heteromer (MOR-DOR) (fare-monoklonal) antikoru ise 1/300 oranında (1µl antikor + 299µl tavuk sulandırma solüsyonu) ile sulandırıldı. Sulandırılan antikorlardan deney gruplarına göre 50'şer µl kültür kaplarına eklendi ve gece boyunca +4˚C' de bekletildi.

5.6.2.4. İkincil Antikor İlavesi

Ertesi gün kültür kapları 2 kere 1'er ml PBS ile yıkandı. İkincil antikorlardan eşekte üretilenler eşek sulandırma solüsyonu ile ve tavukta üretilenler tavuk

sulandırma solüsyonu ile 1/100 oranında sulandırıldı. Deney gruplarına ve birincil antikorlara göre; MOR için Alexa Flour 488 Eşek anti- Tavşan ve Alexa Flour 594 Tavuk anti- Tavşan ikincil antikorları, DOR için Alexa Flour 546 Eşek anti- Keçi antikoru ve heteromer için de Alexa Flour 488 Tavuk anti- Fare ve Alexa Flour 594 Tavuk anti- Fare ikincil antikorları kullanıldı. Her kültür kabına 50'şer µl uygun olan ikincil antikorlar eklendi. 3 sa. boyunca oda sıcaklığında ışıktan koruyarak bekletildi.

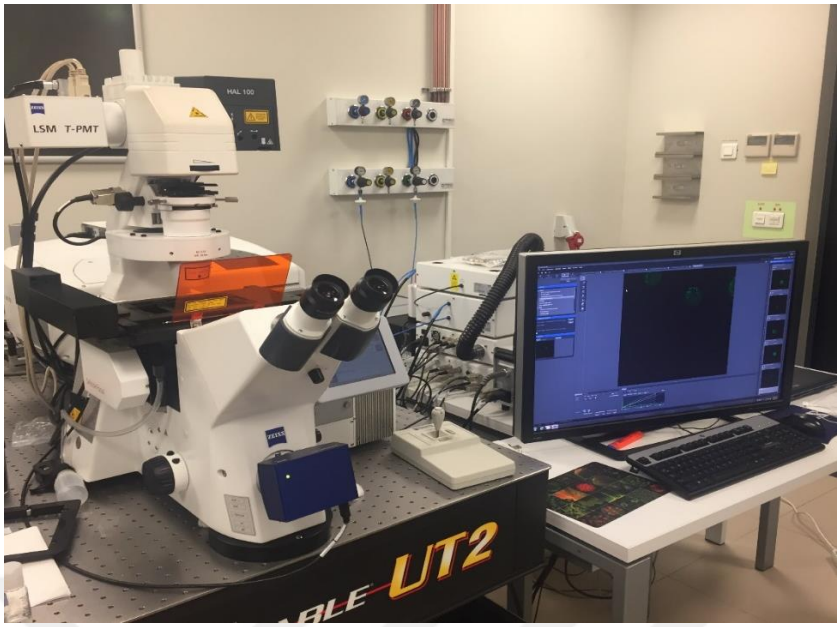
5.6.2.5. Yıkama İşlemi

Her kültür kabı 1ml Tween-20'li PBS (%0,2) ile çalkalayıcı üzerinde 4 dk. ve 4'er kez yıkandı. Daha sonra kültür kapları içerisine 1ml sodyum azit içeren PBS (2/1000) eklendi ve parafilmle kaplanarak +4˚C'de ışıktan koruyarak muhafaza edildi.

5.7. Konfokal Mikroskobu ile Görüntüleme

İmmünositokimya sonrası hücrelerde reseptör immünoreaktivitelerini gösteren floresan ışıma parlaklıklarını ölçmek için Zeiss LSM780 Konfokal Mikroskobu kullanıldı (Resim 5.7.1). Cihazda 405, 458, 488, 514, 561, 594, 633, 1050 nm'lik lazer kaynakları bulunmaktadır. Bu aralıklarda bulunan floresan boya ile boyanan hem canlı hem de cansız örnekler fotoğraflanabilir ya da video kaydı alınabilir. Mikroskopta %5 CO_2 ve ayarlanabilen sıcaklık sağlayan inkübatör sistemi de mevcuttur. 10x, 20x, 40x ve 100x objektifler de bulunmaktadır.

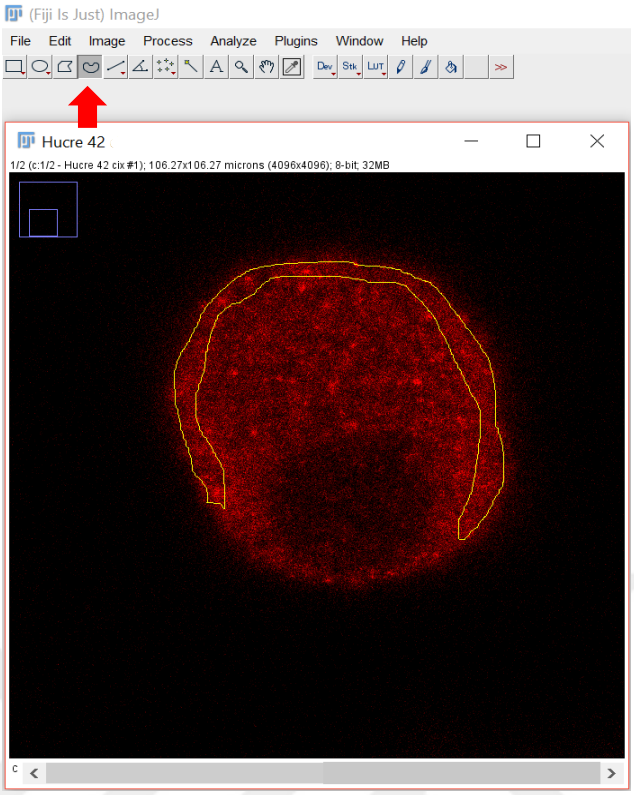
Kültür kapları mikroskoba saat 12 yönünde çizilen yönde yerleştirildi. Palm mikroskobunda 10x'te çekilen görüntü baz alınarak hücrelerin yeri bulundu ve 40x yağlı objektif kullanılarak görüntü alındı. Cihazın lazeri, kullanılan ikincil antikora göre ayarlandı. Lazer gücü 2.0, odak noktası 2.0, "Gain" 750 olacak şekilde 1024 x 1024 piksel boyutunda görüntü alındı. Hücrelerin fotoğrafı çekilmeden önce hücre çekirdekçiğini görecek şekilde hücreye odaklama yapıldı. Çekilen fotoğraflar "czi" formatında kayıt edildi.



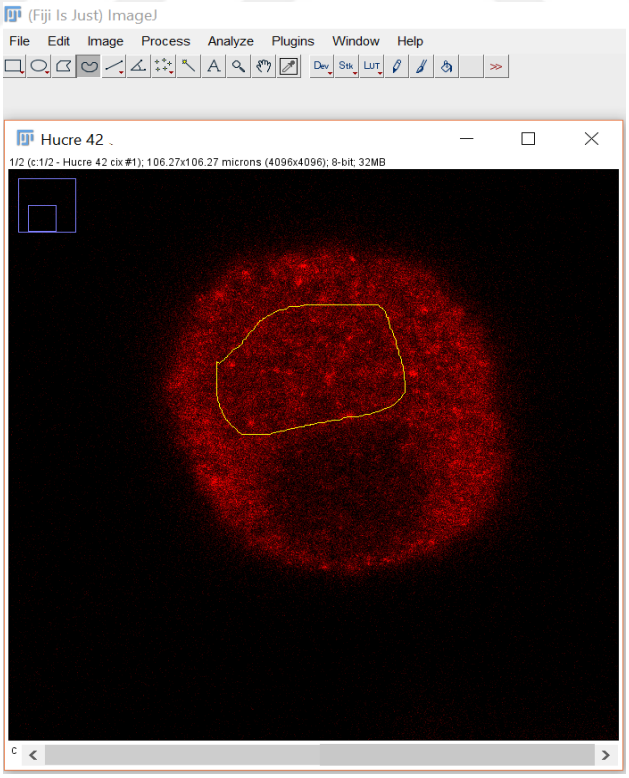
Resim 4.7.1. Zeiss LSM780 Konfokal Mikroskobu.

5.8. Parlaklık Ölçümü ve Analiz

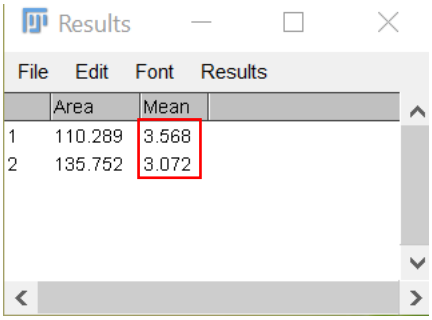
Konfokal mikroskobunda görüntüleri alınan hücrelerin hücre zarındaki ve sitoplazmadaki parlaklık ölçümleri yapıldı. Bu işlem için Fiji İmage J programı kullanıldı. Program açıldıktan sonra "file" (dosya) bölümünden dosya açıldı. Serbest el seçim butonu tıklanarak önce 2-3µm'lik hücre zarı alanı seçildi ve "ctrl+M" kısa yolu kullanılarak parlaklık ölçümü yapıldı (Şekil 5.8.1). Daha sonra sitoplazma alanı seçildi ve tekrar aynı kısa yol kullanılarak parlaklık ölçümü yapıldı (Şekil 5.8.2). Ölçülen parlaklık sonuçları ayrı bir "results" (sonuç) penceresinde, "mean" (ortalama) sekmesi altında listelendi (Şekil 5.8.3). Parlaklık değerleri ayrı bir excel dosyasına yazılıp kaydedildi. Aynı dosya içerisinde hücre zarındaki parlaklık değeri sitoplazmadaki parlaklık değeriyle oranlandı ve kaydedildi.



Şekil 5.8.1. Hücre zarının parlaklık ölçümü. Okla gösterilen yer: Serbest el seçim butonu.



Şekil 5.8.2. Sitoplazma parlaklık ölçümü.



Şekil 5.8.3. Parlaklık ölçüm sonucunun gösterildiği pencere.

5.9. İstatistik

Hazırlanan bütün grupların parlaklık ölçümü yapıldıktan ve hücre zarı parlaklığı ile sitoplazma parlaklığı oranları hesaplandıktan sonra veriler IBM SPSS programına aktarıldı. Analizler tek yönlü ANOVA ve ardından Tukey post-hoc testleriyle yapıldı.

Her grup içinde zar ve sitoplazmadaki sinyal seviyelerinin karşılaştırılması paired-t testi ile yapıldı.

5.10. Kolokalizasyon Analizi

Kullandığımız birincil antikorların özellikle kendi reseptörlerine bağlanıp bağlanmadığını test etmek için iki ayrı AKG kültüründe DOR-HET antikorları ve MOR-HET antikorları kullanılarak immünositokimya yapıldı. Konfokal mikroskobu ile 30'ar hücrenin görüntüsü alındı. Analiz için image j programının analiz kısmındaki kolokalizasyon sekmesinde bulunan kolokalizasyon eşiği (colocalization treshold) programı kullanılarak hücrelerin Rcoloc değeri hesaplandı ve ortalaması alındı.

6. BULGULAR

6.1. Kolokalizasyon Sonuçları

30 hücrede bakılan kolokalizasyon analizi sonuçları tabloda gösterildiği gibidir (Tablo 6.1.1). Rcoloc değerlerinin 1'den küçük olması kolokalizasyonun olmadığı anlamına gelmektedir.

Tablo 6.1.1. Kolokalizasyon analizi sonuçları. Rcoloc <1.

DOR-Heteromer		MOR-Heteromer	
	Rcoloc		Rcoloc
Hucre 1	0,0595	Hücre 1	0,0708
Hucre 2	0,0089	Hücre 2	0,0225
Hucre 3	-0,0614	Hücre 3	0,0453
Hucre 4	-0,1504	Hücre 4	-0,0745
Hucre 5	0,0048	Hücre 5	-0,0219
Hucre 6	0,0634	Hücre 6	0,0771
Hucre 7	-0,0378	Hücre 7	-0,1467
Hucre 8	-0,0046	Hücre 8	0,0041
Hucre 9	-0,118	Hücre 9	0,0248
Hucre 10	-0,0204	Hücre 10	0,0076
Hucre 11	-0,0358	Hücre 11	-0,016
Hucre 12	-0,0973	Hücre 12	0,0071
Hucre 13	0,0007	Hücre 13	-0,0077
Hucre 14	0,1613	Hücre 14	-0,0596
Hucre 15	-0,0063	Hücre 15	-0,0171
Hucre 16	-0,1645	Hücre 16	0,0746
Hucre 17	-0,0394	Hücre 17	-0,02
Hucre 18	0,0201	Hücre 18	0,0734
Hucre 19	-0,0224	Hücre 19	-0,0286
Hucre 20	0,0365	Hücre 20	0,0225
Hucre 21	0,0223	Hücre 21	-0,0465
Hucre 22	-0,0085	Hücre 22	0,0387
Hucre 23	0,0287	Hücre 23	0,0599
Hucre 24	0,0103	Hücre 24	0,2354
Hucre 25	0,0371	Hücre 25	-0,0592
Hucre 26	0,0118	Hücre 26	-0,0097
Hucre 27	0,1882	Hücre 27	-0,0489
Hucre 28	-0,0022	Hücre 28	-0,0213
Hucre 29	0,0316	Hücre 29	0,1173
Hucre 30	0,0139	Hücre 30	0,0321
ortalama	-0,00233	ortalama	0,011183

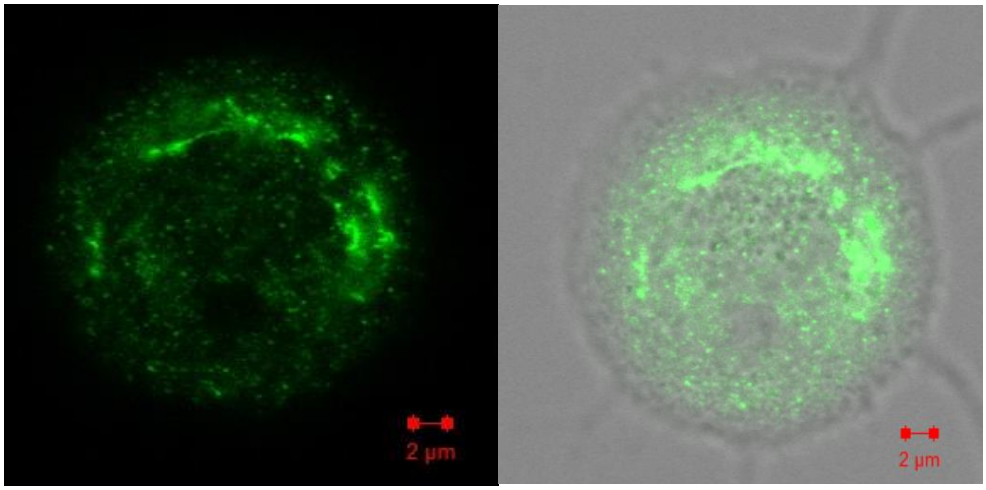
6.2. Hücre Zarı ve Sitoplazmadaki Reseptör Dağılımı

6.2.1. MOR (μ opioid reseptörü) Dağılımı

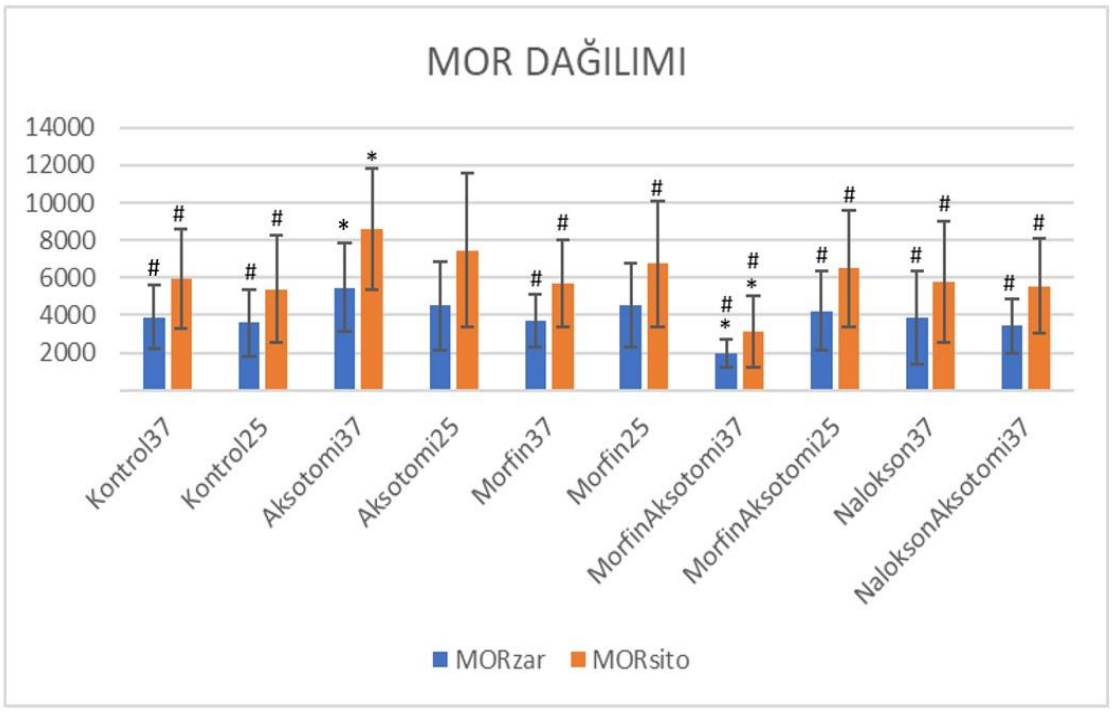
10 farklı gruba göre manipüle edilen hücreler fikse edilip boyandıktan sonra konfokal mikroskobunda görüntüleri alındı ve Image J programıyla parlaklık ölçümleri yapıldı. Hücre zarı parlaklığı ve sitoplazma parlaklığı ayrı ayrı ölçüldü. İstatistik sonuçlarına göre hücre zarında (MORzar) ve sitoplazmadaki (MORsito) reseptör seviyesi ortalaması tablodaki gibidir (Tablo 6.2.1.1). Her grupta reseptör miktarının genel olarak sitoplazmada daha fazla olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 6.2.1.1). Hücre zarı ve sitoplazma arasındaki parlaklık değeri farkının anlamlı olup olmadığı, SPSS programında her grup için yapılan "paired sample t test" ile teyit edilmiştir sonuç olarak her gruptaki değişimin anlamlı olduğu görülmektedir (Tablo 6.2.1.1). Gruplar arasında zardaki ve sitoplazmadaki reseptör dağılımının değişimi grafikte gösterildiği gibidir (Şekil 6.2.1.2). Hücre zarındaki ve sitoplazmadaki değişimlerin anlamlılık değerleri ayrı ayrı tablolarda gösterilmiştir (Tablo 6.2.1.2) (Tablo 6.2.1.3).

Tablo 6.2.1.1. Her hücrede ölçülen parlaklık değerlerinin gruplara göre ortalaması. *MORzar ve MORsito arasındaki fark anlamlı ($p < 0.05$).

Gruplar	MORzar	MORsito	p değeri	Hücre Sayısı
Kontrol37*	3896,5667	5944,7500	0,000	60
Kontrol25*	3575,3500	5383,8000	0,000	60
Aksotomi37*	5465,3571	8564,3286	0,000	70
Aksotomi25*	4506,9000	7468,9857	0,000	70
Morfin37*	3681,0923	5691,7077	0,000	65
Morfin25*	4552,2462	6726,8308	0,000	65
MorfinAksotomi37*	1960,0000	3114,3623	0,000	69
MorfinAksotomi25*	4226,0000	6506,2879	0,000	66
Nalokson37*	3883,5231	5768,5692	0,000	65
NaloksonAksotomi37*	3426,7015	5558,9851	0,000	67



Şekil 6.2.1.1. Hücrelerde MOR dağılımının her gruptaki genel görüntüsü (40x büyütme).



Şekil 6.2.1.2. Hücre zarı ve sitoplazmadaki MOR dağılımı. * Kontrol37'ye göre anlamlı. # Aksotomi37'ye göre anlamlı.

Tablo 6.1.1.2. Hücre zarındaki MOR dağılımının gruplar arasındaki farkının anlamlılık (p) değerleri. Kalın yazılı olanlar anlamlı olanları göstermektedir (p <0.05).

MORzar Anlamlılık (p)	Kontrol37	Kontrol25	Aksotomi37	Aksotomi25	Morfin37	Morfin25	MorfinAksotomi37	MorfinAksotomi25	Nalokson37	NaloksonAksotomi37
Kontrol37		0,9962	**0,0002**	0,7424	0,9998	0,6771	**0,0000**	0,9946	1,0000	0,9379
Kontrol25	0,9962		**0,0000**	0,1639	1,0000	0,1340	**0,0001**	0,6823	0,9968	1,0000
Aksotomi37	**0,0002**	**0,0000**		0,1012	**0,0000**	0,1627	**0,0000**	**0,0081**	**0,0001**	**0,0000**
Aksotomi25	0,7424	0,1639	0,1012		0,2858	1,0000	**0,0000**	0,9978	0,6922	**0,0388**
Morfin37	0,9998	1,0000	**0,0000**	0,2858		0,2388	**0,0000**	0,8443	0,9999	0,9991
Morfin25	0,6771	0,1340	0,1627	1,0000	0,2388		**0,0000**	0,9941	0,6236	**0,0307**
MorfinAksotomi37	**0,0000**	**0,0001**	**0,0000**	**0,0000**	**0,0000**	**0,0000**		**0,0000**	**0,0000**	**0,0005**
MorfinAksotomi25	0,9946	0,6823	**0,0081**	0,9978	0,8443	0,9941	**0,0000**		0,9916	0,3419
Nalokson37	1,0000	0,9968	**0,0001**	0,6922	0,9999	0,6236	**0,0000**	0,9916		0,9406
NaloksonAksotomi37	0,9379	1,0000	**0,0000**	0,0388	0,9991	0,0307	**0,0005**	0,3419	0,9406	

Tablo 3.1.1.3. Sitoplazmadaki MOR dağılımının gruplar arasındaki farkının anlamlılık (p) değerleri. Kalın yazılı olanlar anlamlı olanları göstermektedir (p <0.05).

MORsito Anlamlılık (p)	Kontrol37	Kontrol25	Aksotomi37	Aksotomi25	Morfin37	Morfin25	MorfinAksotomi37	MorfinAksotomi25	Nalokson37	NaloksonAksotomi37
Kontrol37		0,991	**0,000**	0,111	1,000	0,908	**0,000**	0,989	1,000	0,999
Kontrol25	0,991		**0,000**	**0,003**	1,000	0,269	**0,001**	0,529	0,999	1,000
Aksotomi37	**0,000**	**0,000**		0,485	**0,000**	**0,015**	**0,000**	**0,003**	**0,000**	**0,000**
Aksotomi25	0,111	**0,003**	0,485		**0,022**	0,915	**0,000**	0,689	**0,035**	**0,008**
Morfin37	1,000	1,000	**0,000**	**0,022**		0,622	**0,000**	0,869	1,000	1,000
Morfin25	0,908	0,269	**0,015**	0,915	0,622		**0,000**	1,000	0,721	0,432
MorfinAksotomi37	**0,000**	**0,001**	**0,000**	**0,000**	**0,000**	**0,000**		**0,000**	**0,000**	**0,000**
MorfinAksotomi25	0,989	0,529	**0,003**	0,689	0,869	1,000	**0,000**		0,925	0,721
Nalokson37	1,000	0,999	**0,000**	**0,035**	1,000	0,721	**0,000**	0,925		1,000
NaloksonAksotomi37	0,999	1,000	**0,000**	**0,008**	1,000	0,432	**0,000**	0,721	1,000	

Yukarıdaki değerlere göre baktığımızda;

Hücre zarındaki MOR miktarı;

1) Kontrol37 grubuna göre Aksotomi37 grubunda anlamlı olarak daha fazladır.
2) Kontrol37 grubuna göre MorfinAksotomi37 grubunda anlamlı olarak azalmıştır.
3) Aksotomi37 grubuna göre Morfin37, MorfinAksotomi37, Nalokson37 ve NaloksonAksotomi37 grubunda anlamlı olarak daha azdır.
4) Morfin37 grubuna göre MorfinAksotomi37 grubunda anlamlı olarak azalmıştır.

5) MorfinAksotomi37 grubuna göre MorfinAksotomi25 ve NaloksonAksotomi37 grubunda anlamlı olarak daha fazladır.

Sitoplazmadaki MOR miktarı;

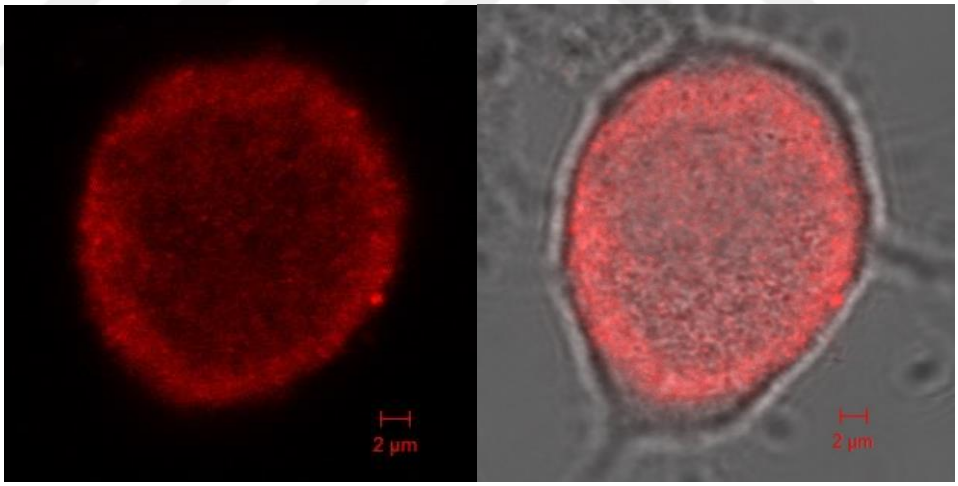
1) Kontrol37 grubuna göre Aksotomi37 grubunda anlamlı olarak daha fazladır.
2) Kontrol37 grubuna göre MorfinAksotomi37 grubunda anlamlı olarak daha azdır.
3) Kontrol25 grubuna göre Aksotomi25 grubunda anlamlı olarak daha fazladır.
4) Aksotomi37 grubuna göre Morfin37, MorfinAksotomi37, Nalokson37 ve NaloksonAksotomi37 grubunda anlamlı olarak daha azdır.
5) Morfin37 grubuna göre MorfinAksotomi37 grubunda anlamlı olarak azalmıştır.
6) MorfinAksotomi37 grubuna göre MorfinAksotomi25 ve NaloksonAksotomi37 grubunda anlamlı olarak daha fazladır.

6.2.2. DOR (δ opioid reseptörü) Dağılımı

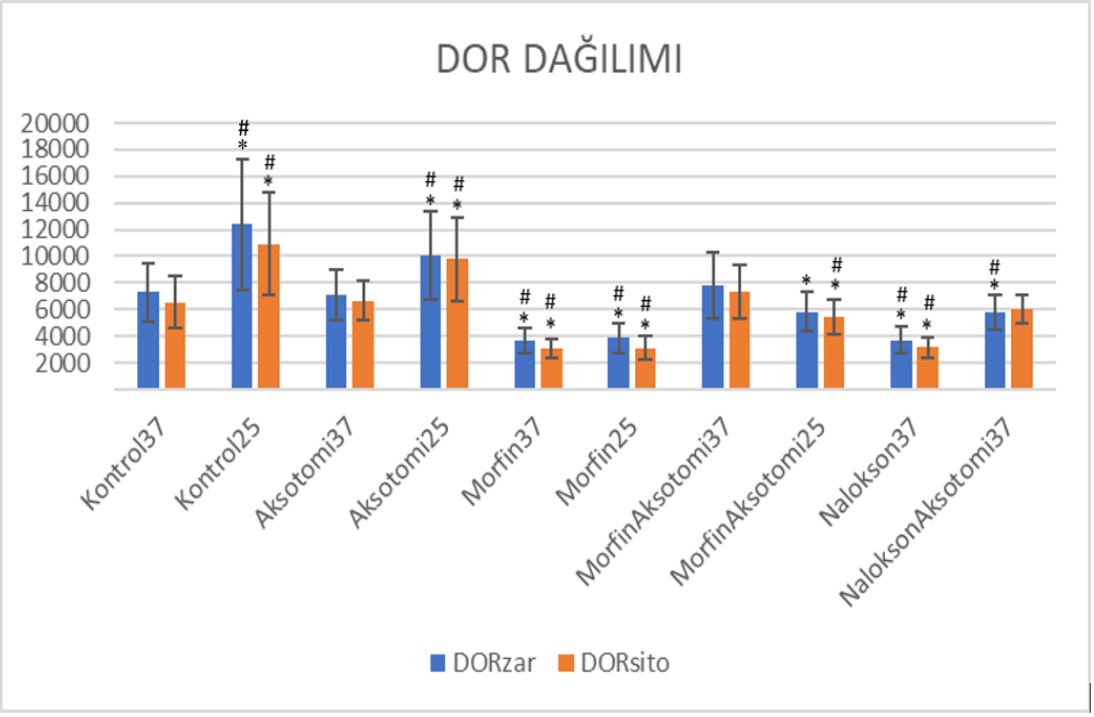
10 farklı gruba göre manipüle edilen hücreler fikse edilip boyandıktan sonra konfokal mikroskobunda görüntüleri alındı ve İmage j'de parlaklık ölçümleri yapıldı. Hücre zarı parlaklığı ve sitoplazma parlaklığı ayrı ayrı ölçüldü. İstatistik sonuçlarına göre hücre zarında (DORzar) ve sitoplazmadaki (DORsito) reseptör seviyesi ortalaması tablodaki gibidir (Tablo 6.2.2.1). NaloksonAksotomi37 grubu hariç diğer gruplarda reseptör miktarının genel olarak hücre zarında daha fazla olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 6.2.2.1). Hücre zarı ve sitoplazma arasındaki parlaklık değeri farkının anlamlı olup olmadığı, SPSS programında her grup için yapılan "paired sample t test" ile teyit edilmiştir sonuç olarak Aksotomi25 grubu hariç diğer gruplardaki değişimin anlamlı olduğu görülmektedir (Tablo 6.2.2.1). Gruplar arasında zardaki ve sitoplazmadaki reseptör dağılımının değişimi grafikte gösterildiği gibidir (Şekil 6.2.2.2). Hücre zarındaki ve sitoplazmadaki değişimlerin anlamlılık değerleri ayrı ayrı tablolarda gösterilmiştir (Tablo 6.2.2.2) (Tablo 6.2.2.3).

Tablo 6.2.2.1. Her hücrede ölçülen parlaklık değerlerinin gruplara göre ortalaması. *DORzar ve DORsito arasındaki fark anlamlı ($p < 0.05$).

Gruplar	DORzar	DORsito	p değeri	Hücre Sayısı
Kontrol37*	7309,0667	6556,983	0,000	60
Kontrol25*	12382,1	10937,58	0,000	59
Aksotomi37*	7083,2899	6680	0,012	69
Aksotomi25	10060,83	9770,657	0,298	70
Morfin37*	3635,3077	3076,862	0,000	65
Morfin25*	3850,5538	3129,354	0,000	65
MorfinAksotomi37*	7800,4286	7296,129	0,003	70
MorfinAksotomi25*	5851,2174	5415,725	0,001	69
Nalokson37*	3691,4615	3144,585	0,000	65
NaloksonAksotomi37*	5795,0857	6066,557	0,010	70



Şekil 6.2.2.1. Hücrelerde DOR dağılımının gruplardaki genel görüntüsü.



Şekil 6.2.2.2. Hücre zarı ve sitoplazmadaki DOR dağılımı. * Kontrol37'ye göre anlamlı. # Aksotomi37'ye göre anlamlı.

Tablo 6.2.2.2. Hücre zarındaki DOR dağılımının gruplar arasındaki farkının anlamlılık (p) değerleri. Kalın yazılı olanlar anlamlı olanları göstermektedir ($p < 0.05$).

DORzar Anlamlılık (p)	Kontrol37	Kontrol25	Aksotomi37	Aksotomi25	Morfin37	Morfin25	MorfinAksotomi37	MorfinAksotomi25	Nalokson37	NaloksonAksotomi37
Kontrol37		**0,000**	1,000	**0,000**	**0,000**	**0,000**	0,974	**0,017**	**0,000**	**0,010**
Kontrol25	**0,000**		**0,000**	**0,000**	**0,000**	**0,000**	**0,000**	**0,000**	**0,000**	**0,000**
Aksotomi37	1,000	**0,000**		**0,000**	**0,000**	**0,000**	0,734	0,065	**0,000**	**0,042**
Aksotomi25	**0,000**	**0,000**	**0,000**		**0,000**	**0,000**	**0,000**	**0,000**	**0,000**	**0,000**
Morfin37	**0,000**	**0,000**	**0,000**	**0,000**		1,000	**0,000**	**0,000**	1,000	**0,000**
Morfin25	**0,000**	**0,000**	**0,000**	**0,000**	1,000		**0,000**	**0,000**	1,000	**0,000**
MorfinAksotomi37	0,974	**0,000**	0,734	**0,000**	**0,000**	**0,000**		**0,000**	**0,000**	**0,000**
MorfinAksotomi25	**0,017**	**0,000**	0,065	**0,000**	**0,000**	**0,000**	**0,000**		**0,000**	1,000
Nalokson37	**0,000**	**0,000**	**0,000**	**0,000**	1,000	1,000	**0,000**	**0,000**		**0,000**
NaloksonAksotomi37	**0,010**	**0,000**	**0,042**	**0,000**	**0,000**	**0,000**	**0,000**	1,000	**0,000**	

Tablo 6.2.2.3. Sitoplazmadaki DOR dağılımının gruplar arasındaki farkının anlamlılık (p) değerleri. Kalın yazılı olanlar anlamlı olanları göstermektedir (p <0.05).

DORsito Anlamlılık (p)	Kontrol37	Kontrol25	Aksotomi37	Aksotomi25	Morfin37	Morfin25	MorfinAksotomi37	MorfinAksotomi25	Nalokson37	NaloksonAksotomi37
Kontrol37		**0,000**	1,000	**0,000**	**0,000**	**0,000**	0,494	**0,033**	**0,000**	0,919
Kontrol25	**0,000**		**0,000**	**0,027**	**0,000**	**0,000**	**0,000**	**0,000**	**0,000**	**0,000**
Aksotomi37	1,000	**0,000**		**0,000**	**0,000**	**0,000**	0,698	**0,006**	**0,000**	0,703
Aksotomi25	**0,000**	**0,027**	**0,000**		**0,000**	**0,000**	**0,000**	**0,000**	**0,000**	**0,000**
Morfin37	**0,000**	**0,000**	**0,000**	**0,000**		1,000	**0,000**	**0,000**	1,000	**0,000**
Morfin25	**0,000**	**0,000**	**0,000**	**0,000**	1,000		**0,000**	**0,000**	1,000	**0,000**
MorfinAksotomi37	0,494	**0,000**	0,698	**0,000**	**0,000**	**0,000**		**0,000**	**0,000**	**0,008**
MorfinAksotomi25	**0,033**	**0,000**	**0,006**	**0,000**	**0,000**	**0,000**	**0,000**		**0,000**	0,626
Nalokson37	**0,000**	**0,000**	**0,000**	**0,000**	1,000	1,000	**0,000**	**0,000**		**0,000**
NaloksonAksotomi37	0,919	**0,000**	0,703	**0,000**	**0,000**	**0,000**	**0,008**	0,626	**0,000**	

Yukarıdaki değerlere göre baktığımızda;

Hücre zarındaki DOR miktarı;

1) Kontrol37 grubuna göre Kontrol25 grubunda anlamlı olarak daha fazladır.
2) Kontrol37 grubuna göre Morfin37, Nalokson37 ve NaloksonAksotomi37 gruplarında anlamlı olarak daha azdır.
3) Kontrol25 grubuna göre Aksotomi25, Morfin25 ve MorfinAksotomi25 gruplarında anlamlı olarak daha azdır.
4) Aksotomi37 grubuna göre Aksotomi25 grubunda anlamlı olarak daha fazladır.
5) Aksotomi37 grubuna göre NaloksonAksotomi37 grubunda anlamlı olarak daha azdır.
6) Aksotomi25 grubuna göre MorfinAksotomi25 grubunda anlamlı olarak daha azdır.
7) Morfin37 grubuna göre MorfinAksotomi37 grubunda anlamlı olarak daha fazladır.
8) Morfin25 grubuna göre MorfinAksotomi25 grubunda anlamlı olarak daha fazladır.
9) MorfinAksotomi37 grubuna göre MorfinAksotomi25 ve NaloksonAksotomi37 gruplarında anlamlı olarak daha azdır.
10) Nalokson37 grubuna göre NaloksonAksotomi37 grubunda anlamlı olarak daha fazladır.

Sitoplazmadaki DOR miktarı;

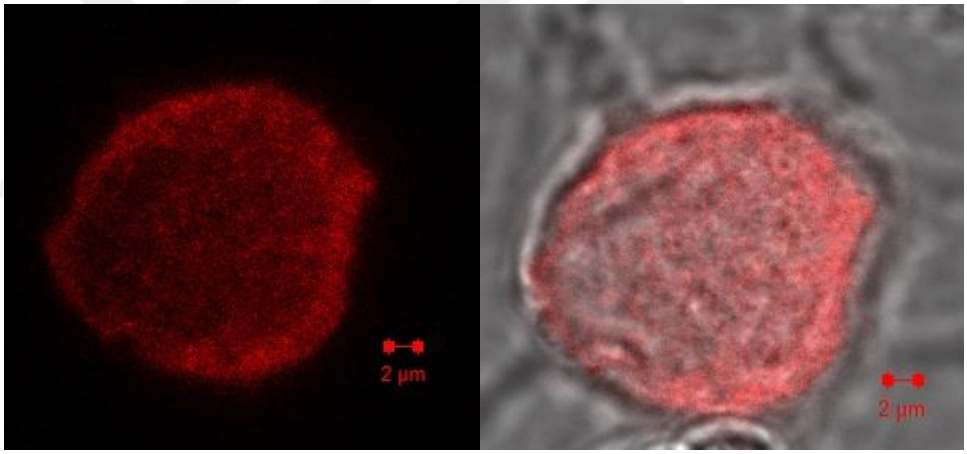
1) Kontrol37 grubuna göre Kontrol25 grubunda anlamlı olarak daha fazladır.
2) Kontrol37 grubuna göre Morfin37 ve Nalokson37 gruplarında anlamlı olarak daha azdır.
3) Kontrol25 grubuna göre Aksotomi25, Morfin25 ve MorfinAksotomi25 gruplarında anlamlı olarak daha azdır.
4) Aksotomi37 grubuna göre Aksotomi25 grubunda anlamlı olarak daha fazladır.
5) Aksotomi25 grubuna göre MorfinAksotomi25 grubunda anlamlı olarak daha azdır.
6) Morfin37 grubuna göre MorfinAksotomi37 grubunda anlamlı olarak daha fazladır.
7) Morfin25 grubuna göre MorfinAksotomi25 grubunda anlamlı olarak daha fazladır.
8) MorfinAksotomi37 grubuna göre MorfinAksotomi25 ve NaloksonAksotomi37 gruplarında anlamlı olarak daha azdır.
9) Nalokson37 grubuna göre NaloksonAksotomi37 grubunda anlamlı olarak daha fazladır.

6.2.3. HET (μ-δ heteromer opioid reseptörü) Dağılımı

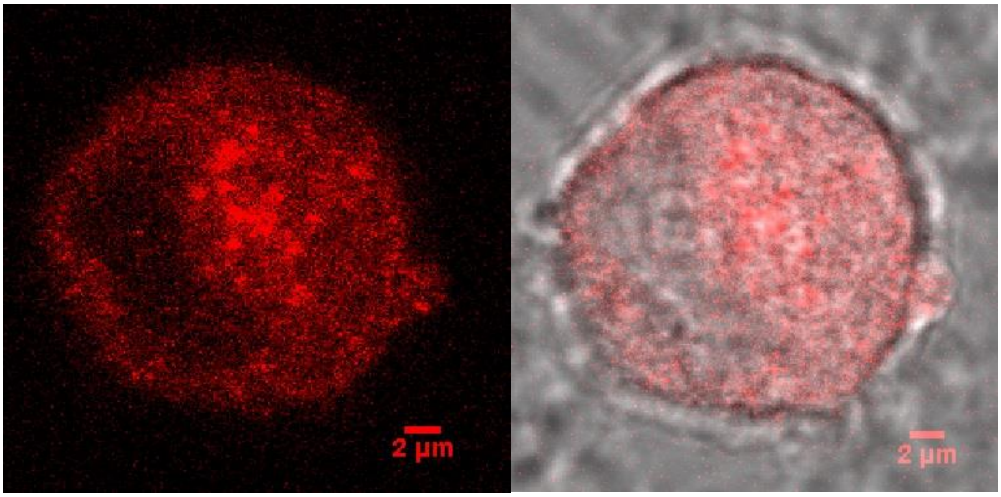
10 farklı gruba göre manipüle edilen hücreler fikse edilip boyandıktan sonra konfokal mikroskobunda görüntüleri alındı ve İmage j'de parlaklık ölçümleri yapıldı. Hücre zarı parlaklığı ve sitoplazma parlaklığı ayrı ayrı ölçüldü. İstatistik sonuçlarına göre hücre zarında (HETzar) ve sitoplazmadaki (HETsito) reseptör seviyesi ortalaması tablodaki gibidir (Tablo 6.2.3.1). Hücre zarı ve sitoplazma arasındaki parlaklık değeri farkının anlamlı olup olmadığı, SPSS programında her grup için yapılan "paired sample t test" ile teyit edilmiştir sonuç olarak Kontrol37 ve Kontrol25 gruplarında reseptör seviyesinin anlamlı olarak hücre zarında daha fazla olduğu görülürken NaloksonAksotomi37 grubunda ise reseptör miktarı sitoplazmada anlamlı olarak daha fazladır. (Şekil 6.2.3.1 ve 6.2.3.2) (Tablo 6.2.3.1). Gruplar arasında zardaki ve sitoplazmadaki reseptör dağılımının değişimi grafikte gösterildiği gibidir (Şekil 6.2.3.3). Hücre zarındaki ve sitoplazmadaki değişimlerin anlamlılık değerleri ayrı ayrı tablolarda gösterilmiştir (Tablo 6.2.3.2) (Tablo 6.2.3.3).

Tablo 6.2.3.1. Her hücrede ölçülen parlaklık değerlerinin gruplara göre ortalaması. *HETzar ve HETsito arasındaki fark anlamlı ($p < 0.05$).

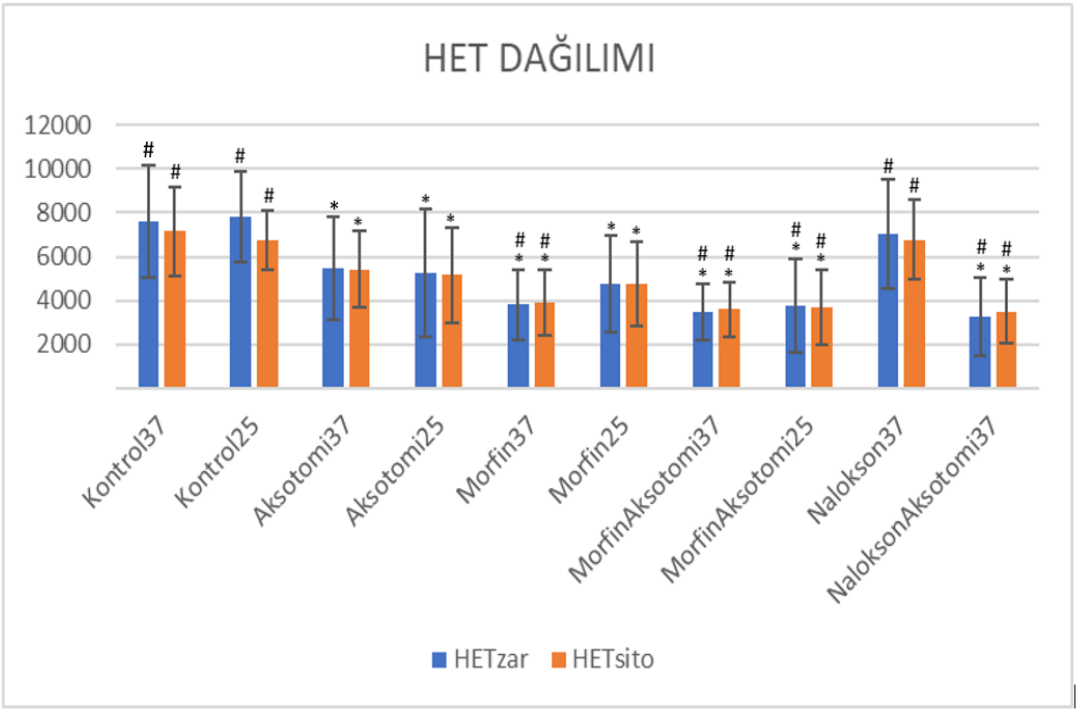
Gruplar	HETzar	HETsito	p değeri	Hücre Sayısı
Kontrol37*	7616,6500	7139,8167	0,014	60
Kontrol25*	7809,6500	6769,8000	0,000	60
Aksotomi37	5484,0781	5417,2344	0,648	64
Aksotomi25	5266,5000	5161,1970	0,445	66
Morfin37	3820,2031	3927,8125	0,320	64
Morfin25	4749,3906	4757,1719	0,931	64
MorfinAksotomi37	3470,1970	3585,9394	0,217	66
MorfinAksotomi25	3773,3939	3671,7424	0,248	66
Nalokson37	7063,5231	6774,5231	0,050	65
NaloksonAksotomi37*	3263,6667	3507,9420	0,004	69



Şekil 6.2.3.1. Hücrelerde HET dağılımının Kontrol37 ve Kontrol25 gruplarındaki genel görüntüsü.



Şekil 6.2.3.2. Hücrelerde HET dağılımının NaloksonAksotomi37 grubundaki genel görüntüsü.



Şekil 6.2.3.3. Hücre zarı ve sitoplazmadaki HET dağılımı. *Kontrol37'ye göre anlamlı. #Aksotomi37'ye göre anlamlı.

Tablo 6.2.3.2. Hücre zarındaki HET dağılımının gruplar arasındaki farkının anlamlılık (p) değerleri. Kalın yazılı olanlar anlamlı olanları göstermektedir (p <0.05).

HETzar Anlamlılık (p)	Kontrol37	Kontrol25	Aksotomi37	Aksotomi25	Morfin37	Morfin25	MorfinAksotomi37	MorfinAksotomi25	Nalokson37	NaloksonAksotomi37
Kontrol37		1,000	**0,000**	**0,000**	**0,000**	**0,000**	**0,000**	**0,000**	0,921	**0,000**
Kontrol25	1,000		**0,000**	**0,000**	**0,000**	**0,000**	**0,000**	**0,000**	0,658	**0,000**
Aksotomi37	**0,000**	**0,000**		1,000	**0,001**	0,662	**0,000**	**0,000**	**0,002**	**0,000**
Aksotomi25	**0,000**	**0,000**	1,000		**0,006**	0,940	**0,000**	**0,004**	**0,000**	**0,000**
Morfin37	**0,000**	**0,000**	**0,001**	**0,006**		0,317	0,996	1,000	**0,000**	0,902
Morfin25	**0,000**	**0,000**	0,662	0,940	0,317		**0,029**	0,240	**0,000**	**0,004**
MorfinAksotomi37	**0,000**	**0,000**	**0,000**	**0,000**	0,996	**0,029**		0,999	**0,000**	1,000
MorfinAksotomi25	**0,000**	**0,000**	**0,000**	**0,004**	1,000	0,240	0,999		**0,000**	0,938
Nalokson37	0,921	0,658	**0,002**	**0,000**	**0,000**	**0,000**	**0,000**	**0,000**		**0,000**
NaloksonAksotomi37	**0,000**	**0,000**	**0,000**	**0,000**	0,902	**0,004**	1,000	0,938	**0,000**	

Tablo 6.2.3.3. Sitoplazmadaki HET dağılımının gruplar arasındaki farkının anlamlılık (p) değerleri. Kalın yazılı olanlar anlamlı olanları göstermektedir (p <0.05).

HETsito Anlamlılık (p)	Kontrol37	Kontrol25	Aksotomi37	Aksotomi25	Morfin37	Morfin25	MorfinAksotomi37	MorfinAksotomi25	Nalokson37	NaloksonAksotomi37
Kontrol37		0,975	**0,000**	**0,000**	**0,000**	**0,000**	**0,000**	**0,000**	0,974	**0,000**
Kontrol25	0,975		**0,001**	**0,000**	**0,000**	**0,000**	**0,000**	**0,000**	1,000	**0,000**
Aksotomi37	**0,000**	**0,001**		0,998	**0,000**	0,472	**0,000**	**0,000**	**0,000**	**0,000**
Aksotomi25	**0,000**	**0,000**	0,998		**0,002**	0,943	**0,000**	**0,000**	**0,000**	**0,000**
Morfin37	**0,000**	**0,000**	**0,000**	**0,002**		0,161	0,981	0,998	**0,000**	0,923
Morfin25	**0,000**	**0,000**	0,472	0,943	0,161		**0,004**	**0,012**	**0,000**	**0,001**
MorfinAksotomi37	**0,000**	**0,000**	**0,000**	**0,000**	0,981	**0,004**		1,000	**0,000**	1,000
MorfinAksotomi25	**0,000**	**0,000**	**0,000**	**0,000**	0,998	**0,012**	1,000		**0,000**	1,000
Nalokson37	0,974	1,000	**0,000**	**0,000**	**0,000**	**0,000**	**0,000**	**0,000**		**0,000**
NaloksonAksotomi37	**0,000**	**0,000**	**0,000**	**0,000**	0,923	**0,001**	1,000	1,000	**0,000**	

Yukarıdaki değerlere göre baktığımızda;

Hücre zarındaki HET miktarı;

1) Kontrol37 grubuna göre Aksotomi37, Morfin37, MorfinAksotomi37 ve NaloksonAksotomi37 gruplarında anlamlı olarak daha azdır.
2) Kontrol25 grubuna göre Aksotomi25, Morfin25 ve MorfinAksotomi25 gruplarında anlamlı olarak daha azdır.
3) Aksotomi37 grubuna göre MorfinAksotomi37 ve NaloksonAksotomi37 gruplarında anlamlı olarak daha azdır.
4) Aksotomi25 grubuna göre MorfinAksotomi25 grubunda anlamlı olarak daha azdır.
5) Nalokson37 grubuna göre NaloksonAksotomi37 grubunda anlamlı olarak daha azdır.

Sitoplazmadaki HET miktarı;

1) Kontrol37 grubuna göre Aksotomi37, Morfin37, MorfinAksotomi37 ve NaloksonAksotomi37 gruplarında anlamlı olarak daha azdır.
2) Kontrol25 grubuna göre Aksotomi25, Morfin25 ve MorfinAksotomi25 gruplarında anlamlı olarak daha azdır.
3) Aksotomi37 grubuna göre MorfinAksotomi37 ve NaloksonAksotomi37 gruplarında anlamlı olarak daha azdır.
4) Aksotomi25 grubuna göre MorfinAksotomi25 grubunda anlamlı olarak daha azdır.
5) Morfin25 grubuna göre MorfinAksotomi25 grubunda anlamlı olarak daha azdır.
6) Nalokson37 grubuna göre NaloksonAksotomi37 grubunda anlamlı olarak daha azdır.

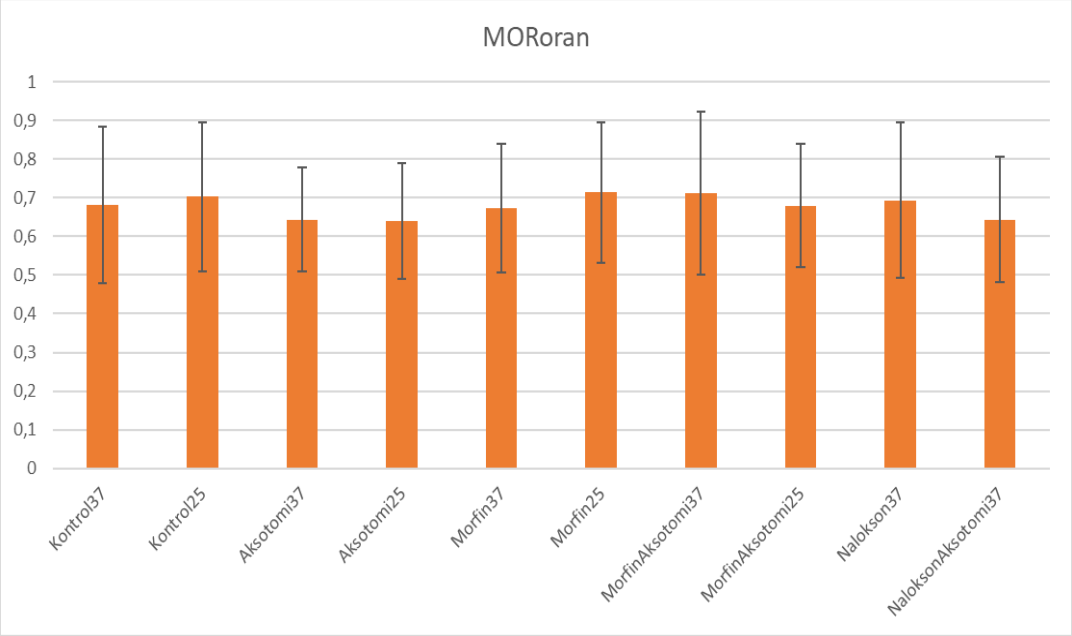
6.3. Reseptör Dağılımının Hücre Zarı/Sitoplazma Oranı Bakımından Değerlendirilmesi

6.3.1. MORoran Dağılımı

Hücre zarı ve sitoplazmadaki parlaklık değerleri ayrı ayrı ölçüldükten sonra değerlerin zar/sitoplazma oranı (MORoran) ortalaması alındı. Değerler SPSS programında ANOVA-Tukey istatistik testine tabi tutuldu. Her gruptaki MORoran değerleri, standart sapma değerleri ve hücre sayısı tabloda gösterildiği gibidir (Tablo 6.3.1.1). Oran değerlerine göre reseptörlerin her grupta sitoplazmada daha yoğun olduğu görülmektedir. Gruplara göre MORoran dağılımı grafikte gösterildiği gibidir (Şekil 6.3.1.1). Oranların gruplar arasındaki farkının anlamlılık değerleri tabloda gösterilmiştir (Tablo 6.3.1.2). Anlamlılık değerleri sonuçları gruplar arasındaki farkın anlamlı olmadığını göstermektedir.

Tablo 6.3.1.1. MORoran değerleri, hücre sayısı ve standart sapma değerleri.

Gruplar	MORoran	Hücre Sayısı	Standart Sapma
Kontrol37	0,6815	60	0,20134
Kontrol25	0,7027	60	0,19377
Aksotomi37	0,6430	70	0,13444
Aksotomi25	0,6401	70	0,15082
Morfin37	0,6734	65	0,16552
Morfin25	0,7136	65	0,18156
MorfinAksotomi37	0,7129	69	0,21108
MorfinAksotomi25	0,6792	66	0,15966
Nalokson37	0,6937	65	0,20147
NaloksonAksotomi37	0,6429	67	0,16243



Şekil 6.3.1.1. Gruplara göre MORoran dağılımı.

Tablo 6.2.3.3. MORoran dağılımının gruplar arasındaki farkının anlamlılık (p) değerleri. Gruplar arasındaki fark anlamlı değildir (p> 0.05).

MORoran Anlamlılık (p)	Kontrol37	Kontrol25	Aksotomi37	Aksotomi25	Morfin37	Morfin25	MorfinAksotomi37	MorfinAksotomi25	Nalokson37	NaloksonAksotomi37
Kontrol37		1,000	0,966	0,946	1,000	0,992	0,992	1,000	1,000	0,968
Kontrol25	1,000		0,658	0,592	0,996	1,000	1,000	0,999	1,000	0,670
Aksotomi37	0,966	0,658		1,000	0,993	0,382	0,374	0,974	0,817	1,000
Aksotomi25	0,946	0,592	1,000		0,986	0,322	0,314	0,956	0,762	1,000
Morfin37	1,000	0,996	0,993	0,986		0,955	0,956	1,000	1,000	0,993
Morfin25	0,992	1,000	0,382	0,322	0,955		1,000	0,984	1,000	0,396
MorfinAksotomi37	0,992	1,000	0,374	0,314	0,956	1,000		0,984	1,000	0,389
MorfinAksotomi25	1,000	0,999	0,974	0,956	1,000	0,984	0,984		1,000	0,975
Nalokson37	1,000	1,000	0,817	0,762	1,000	1,000	1,000	1,000		0,825
NaloksonAksotomi37	0,968	0,670	1,000	1,000	0,993	0,396	0,389	0,975	0,825	

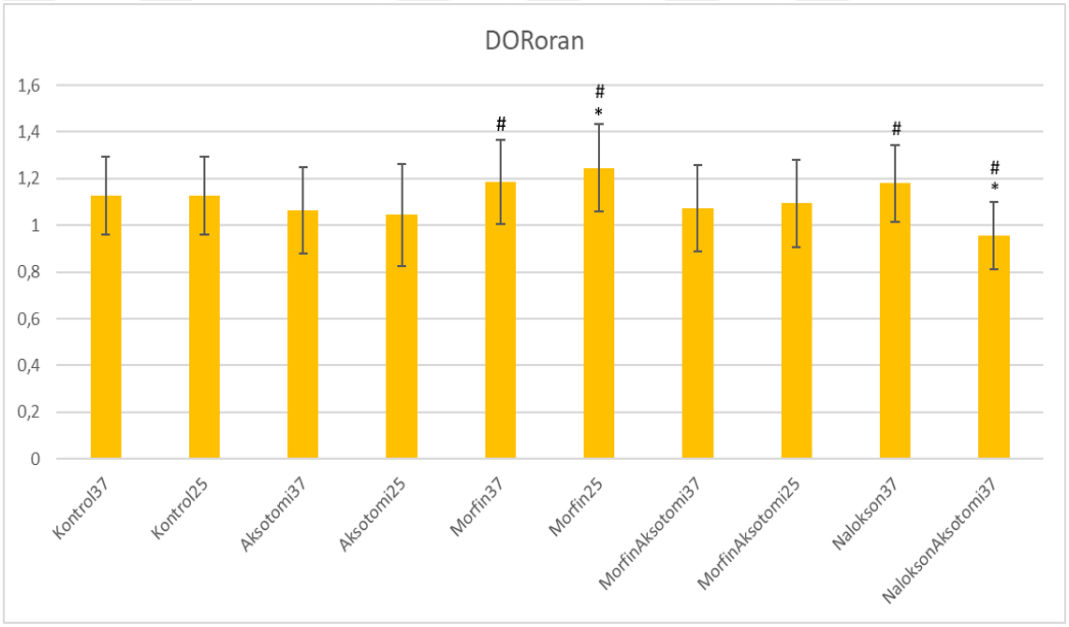
Yukarıdaki değerlere göre baktığımızda; gruplar arasındaki zar/sitoplazma reseptör miktarı oranı farkı anlamlı değildir.

6.3.2. DORoran Dağılımı

Hücre zarı ve sitoplazmadaki parlaklık değerleri ayrı ayrı ölçüldükten sonra değerlerin zar/sitoplazma oranı (DORoran) ortalaması alındı. Değerler SPSS programında ANOVA-Tukey istatistik testine tabi tutuldu. Her gruptaki DORoran değerleri, standart sapma değerleri ve hücre sayısı tabloda gösterildiği gibidir (Tablo 6.3.2.1). Oran değerlerine göre reseptörlerin NaloksonAksotomi37 grubu hariç hücre zarında daha yoğun olduğu görülmektedir. Gruplara göre DORoran dağılımı grafikte gösterildiği gibidir (Şekil 6.3.2.1). Oranların gruplar arasındaki farkının anlamlılık değerleri tabloda gösterilmiştir (Tablo 6.3.2.2).

Tablo 6.3.2.1. DORoran değerleri, hücre sayısı ve standart sapma değerleri.

Gruplar	DORoran	Hücre Sayısı	Standart Sapma
Kontrol37	1,1277	60	0,16608
Kontrol25	1,1269	59	0,16757
Aksotomi37	1,0637	69	0,18687
Aksotomi25	1,0446	70	0,21850
Morfin37	1,1857	65	0,18168
Morfin25	1,2451	65	0,18778
MorfinAksotomi37	1,0712	70	0,18490
MorfinAksotomi25	1,0937	69	0,18590
Nalokson37	1,1792	65	0,16560
NaloksonAksotomi37	0,9556	70	0,14270



Şekil 6.3.2.1. Gruplara göre DORoran dağılımı. * Kontrol37'ye göre anlamlı. # Aksotomi37'ye göre anlamlı.

Tablo 6.3.2.2. DORoran dağılımının gruplar arasındaki farkının anlamlılık (p) değerleri. Kalın yazılı olanlar anlamlı olanları göstermektedir ($p < 0.05$).

DORoran Anlamlılık (p)	Kontrol37	Kontrol25	Aksotomi37	Aksotomi25	Morfin37	Morfin25	MorfinAksotomi37	MorfinAksotomi25	Nalokson37	NaloksonAksotomi37
Kontrol37		1,000	0,592	0,210	0,735	**0,011**	0,746	0,987	0,849	**0,000**
Kontrol25	1,000		0,615	0,227	0,725	**0,011**	0,766	0,990	0,841	**0,000**
Aksotomi37	0,592	0,615		1,000	**0,004**	**0,000**	1,000	0,993	**0,009**	**0,016**
Aksotomi25	0,210	0,227	1,000		**0,000**	**0,000**	0,997	0,846	**0,001**	0,101
Morfin37	0,735	0,725	**0,004**	**0,000**		0,685	**0,009**	0,093	1,000	**0,000**
Morfin25	**0,011**	**0,011**	**0,000**	**0,000**	0,685		**0,000**	**0,000**	0,540	**0,000**
MorfinAksotomi37	0,746	0,766	1,000	0,997	**0,009**	**0,000**		0,999	**0,019**	**0,006**
MorfinAksotomi25	0,987	0,990	0,993	0,846	0,093	**0,000**	0,999		0,158	**0,000**
Nalokson37	0,849	0,841	**0,009**	**0,001**	1,000	0,540	**0,019**	0,158		**0,000**
NaloksonAksotomi37	**0,000**	**0,000**	**0,016**	0,101	**0,000**	**0,000**	**0,006**	**0,000**	**0,000**	

Yukarıdaki değerlere göre baktığımızda;

1) Kontrol37 grubuna göre NaloksonAksotomi37 grubunda zar/sitoplazma oranı anlamlı olarak daha azdır.
2) Kontrol25 grubuna göre Morfin25 grubunda zar/sitoplazma oranı anlamlı olarak daha fazladır.
3) Aksotomi37 grubuna göre NaloksonAksotomi37 grubunda zar/sitoplazma oranı anlamlı olarak daha azdır.
4) Morfin37 grubuna göre MorfinAksotomi37 grubunda zar/sitoplazma oranı anlamlı olarak daha azdır.
5) Morfin25 grubuna göre MorfinAksotomi25 grubunda zar/sitoplazma oranı anlamlı olarak daha azdır.
6) MorfinAksotomi37 grubuna göre NaloksonAksotomi37 grubunda zar/sitoplazma oranı anlamlı olarak daha azdır.
7) Nalokson37 grubuna göre NaloksonAksotomi37 grubunda zar/sitoplazma oranı anlamlı olarak daha azdır.

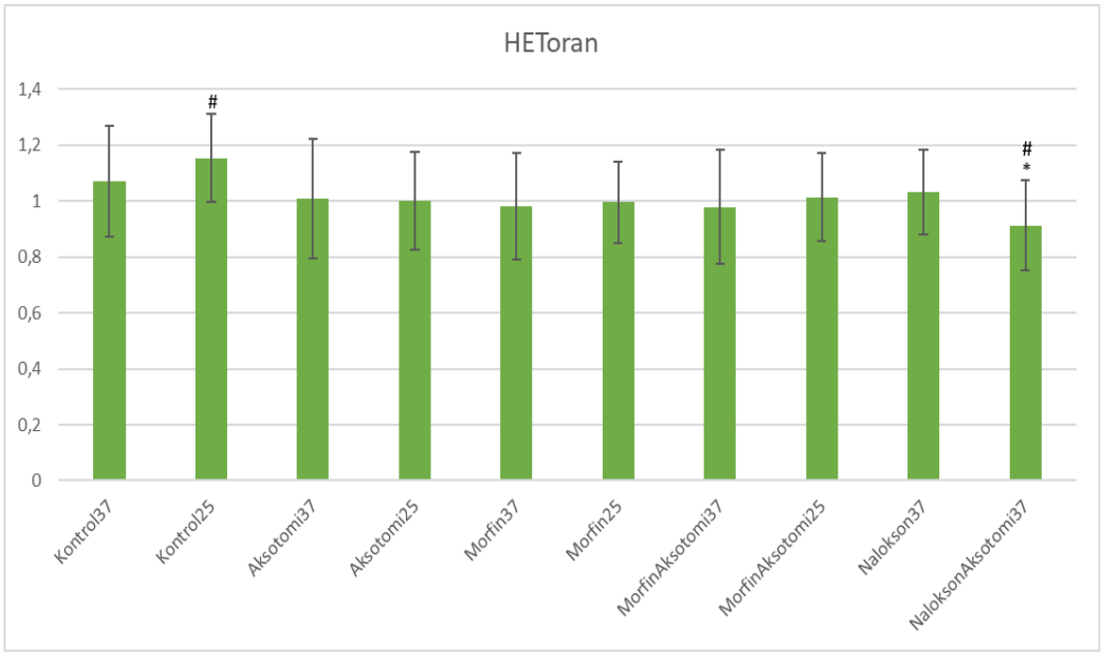
6.3.3. HEToran Dağılımı

Hücre zarı ve sitoplazmadaki parlaklık değerleri ayrı ayrı ölçüldükten sonra değerlerin zar/sitoplazma oranı (HEToran) ortalaması alındı. Değerler SPSS programında ANOVA-Tukey istatistik testine tabi tutuldu. Her gruptaki HEToran değerleri, standart sapma değerleri ve hücre sayısı tabloda gösterildiği gibidir (Tablo

6.3.3.1). Oran değerlerine göre reseptörlerin çoğunluklar hücre zarında yoğun olduğu görülmektedir. Gruplara göre HEToran dağılımı grafikte gösterildiği gibidir (Şekil 6.3.3.1). Oranların gruplar arasındaki farkının anlamlılık değerleri tabloda gösterilmiştir (Tablo 6.3.3.2).

Tablo 6.3.3.1. HEToran değerleri, hücre sayısı ve standart sapma değerleri.

Gruplar	HEToran	Hücre Sayısı	Standart Sapma
Kontrol37	1,0691	60	0,19779
Kontrol25	1,1532	60	0,15738
Aksotomi37	1,0096	64	0,21367
Aksotomi25	1,0004	66	0,17582
Morfin37	0,9816	64	0,19024
Morfin25	0,9950	64	0,14465
MorfinAksotomi37	0,9778	66	0,20343
MorfinAksotomi25	1,0130	66	0,15787
Nalokson37	1,0319	65	0,15136
NaloksonAksotomi37	0,9120	69	0,16138



Şekil 6.3.3.1. Gruplara göre HEToran dağılımı. * Kontrol37'ye göre anlamlı. # Aksotomi37'ye göre anlamlı.

Tablo 6.3.3.2. HEToran dağılımının gruplar arasındaki farkının anlamlılık (p) değerleri. Kalın yazılı olanlar anlamlı olanları göstermektedir (p <0.05).

HEToran Anlamlılık (p)	Kontrol37	Kontrol25	Aksotomi37	Aksotomi25	Morfin37	Morfin25	MorfinAksotomi37	MorfinAksotomi25	Nalokson37	NaloksonAksotomi37
Kontrol37		0,217	0,686	0,472	0,154	0,369	0,109	0,747	0,975	**0,000**
Kontrol25	0,217		**0,000**	**0,000**	**0,000**	**0,000**	**0,000**	**0,000**	**0,005**	**0,000**
Aksotomi37	0,686	**0,000**		1,000	0,997	1,000	0,991	1,000	0,999	**0,049**
Aksotomi25	0,472	**0,000**	1,000		1,000	1,000	0,999	1,000	0,991	0,106
Morfin37	0,154	**0,000**	0,997	1,000		1,000	1,000	0,991	0,840	0,411
Morfin25	0,369	**0,000**	1,000	1,000	1,000		1,000	1,000	0,975	0,173
MorfinAksotomi37	0,109	**0,000**	0,991	0,999	1,000	1,000		0,980	0,766	0,484
MorfinAksotomi25	0,747	**0,000**	1,000	1,000	0,991	1,000	0,980		1,000	**0,032**
Nalokson37	0,975	**0,005**	0,999	0,991	0,840	0,975	0,766	1,000		**0,004**
NaloksonAksotomi37	**0,000**	**0,000**	**0,049**	0,106	0,411	0,173	0,484	**0,032**	**0,004**	

Yukarıdaki değerlere göre baktığımızda;

1) Kontrol37 grubuna göre NaloksonAksotomi37 grubunda zar/sitoplazma oranı anlamlı olarak daha azdır.
2) Kontrol25 grubuna göre Aksotomi25, Morfin25 ve MorfinAksotomi25 gruplarında zar/sitoplazma oranı anlamlı olarak daha azdır.
3) Aksotomi37 grubuna göre NaloksonAksotomi37 grubunda zar/sitoplazma oranı anlamlı olarak daha azdır.
4) Nalokson37 grubuna göre NaloksonAksotomi37 grubunda zar/sitoplazma oranı anlamlı olarak daha azdır.

7. TARTIŞMA

Opioid aktivitesinin düzenlenmesinde reseptör hareketi oldukça önemlidir. Sitoplazmada üretilen opioid reseptörleri ekzositozla hücre zarına taşınırken, ligandla aktif hale getirilen hücre zarındaki reseptörler de hücre zarından sitoplazmaya endositozla geçebilmektedir (16). Opioidlere karşı oluşan bağımlılık ve tolerans reseptörlerin dinamiğine bağlı regülasyonu ile ilişkilidir. Agoniste maruz bırakıldıktan sonra hücre içerisine endositozla alınan reseptörlerin duyarsızlaştırıldığı ve bu duyarsızlaşmanın da tolerans oluşumunun önüne geçtiği düşünülmektedir (75). Reseptör regülasyonu sırasında hücre içinde takip eden yolaklar değişikliğe uğradığı gibi reseptörlerin sitoplazma-zar hareketi ve reseptör seviyesi de değişikliğe uğramaktadır. Bu gerçekleşen değişiklikler konusunda literatürde belirsizlikler mevcuttur. Klonlama ve füzyon teknikleriyle GFP (green flourescent protein) gibi yeşil floresan protein ile birleştirilen reseptörlerin fizyolojik aktivite göstermediği ve sıcaklığın reseptör hareketini etkilediği söylenmektedir (20). Ayrıca MOR ve DOR reseptörlerinin heteromer bir yapı oluşturabileceği (19) ve bu yapının DOR2 diye adlandırılan δ-opioid reseptörünün alt tipi olabileceği düşünülmektedir. Bu yapının dinamiği hakkında da çok az şey bilinmektedir. Bu tezin kapsamında sıcaklıktan etkilendiği bilinen MOR, DOR ve MOR-DOR heteromer reseptörlerinin trafiğinin model agonist olan morfin uygulamasından nasıl etkilendiği, dahası reseptör dinamiğinde radikal değişiklikler yapabileceği muhtemel olan akson hasarının ne gibi etkileri olduğu araştırılmıştır.

7.1. Kolokalizasyon analizleri kullanılan antikorların özgünlüğünü doğrulamıştır.

Kullanılan birincil antikorların özellikle kendi reseptörlerine bağlanıp bağlanmadıklarını anlamak ve yanlış sinyaller almadığımızı doğrulamak için HET antikoruyla birlikte ayrı ayrı MOR ve DOR immünositokimya uygulaması yapıldı. Parlaklık ve kolokalizasyon analizleri özgül antikorların HET yapısındaki MOR ve DOR birimlerine bağlanmadığını, dolayısıyla çalışma için seçilen üç antikorun reseptör dinamiklerini analiz etmede kullanılabileceğini gösterdi.

7.2. Mu Opioid Reseptör (MOR) Dinamikleri

Genel olarak hücre zarı ve sitoplazmadaki reseptör dağılımına bakıldığında (Şekil 6.2.1.2) fizyolojik sıcaklıkta (37˚C) aksotominin hem hücre zarında hem de sitoplazmada reseptör miktarını arttırdığı görüldü. Yapılan bir çalışmada, siyatik sinir hasarından sonra duyu nöronlarında MOR ifadesinin arttığından bahsedilmektedir (89). Bu artışın nöropatik ağrının düzenlenmesinde önemli bir rolü olduğu düşünülmektedir.

Sadece morfine maruz bırakıldığında reseptör seviyesinin her iki bölgede de kontrol seviyelerinde kaldığı görüldü. Zar/sitoplazma oranında da post hoc Tukey testine göre gruplar arasında anlamlı bir fark görülmemiştir (Şekil 6.3.1.1). Bu sonuç, ligand bağlanması ile opioid reseptör trafiğinin indüklendiğine dair raporlarla uyumlu değildir (16, 75). Öte yandan bir araştırmada birçok veriden yola çıkarak reseptörün dinamiğinin çok hızlı olduğu, reseptörün aktifleşip endositozla içeri alındıktan yaklaşık 10 dakika sonra tekrar hücre zarına ekzositoz ile geri döndüğü bildirilmiştir (20). Hücrelerin tespiti için tercih edilen sürelerin olası bir değişikliğin gözlenmesi için uygun olmaması mümkündür. Ancak morfinin omurilik hücrelerinde MOR trafiğine bir etkisi olmadığına dair raporlar da bulunmaktadır (21).

Aksonal hasar başlı başına hücre içerisindeki birçok mekanizmayı harekete geçirebilirken, morfin varlığında verilen hasarın daha farklı sonuçlar doğurabileceği düşünüldü. Morfin varlığında yapılan aksotomi MOR seviyesinde dramatik bir azalmaya sebebiyet vermiştir. Bu durumu, aksotomi ile birçok yolağın aktifleşmesi ve morfin etkisiyle mu opioid reseptörünün aktivasyonuyla aktifleşen farklı yolakların birbiriyle olan uyumu ile açıklayabiliriz. Örneğin, bir çalışmada optik sinire verilen hasar sonrasında ERK-1’ in arttığı gözlemlenmiştir (90). Diğer bir çalışmada ise morfinin ERK-1 proteinini aktif hale getirdiği ve bu aktifleşmenin ise morfin toleransı oluşturduğu rapor edilmiştir (20). ERK-1 proteininin iki taraflı aktifleşmesi reseptör seviyesinin azalmasına sebebiyet vermiş olabilir. Ancak elbette bu olası mekanizmalardan sadece birisi olabilir.

Antagonist olarak Nalokson kullandığımız ve Nalokson varlığında aksotomi yaptığımız gruplarda reseptör seviyesi kontrol grubu civarlarında seyrederek bir

değişikliğe uğramamıştır. Naloksonun MOR için etkili bir antagonist olduğu ve reseptör aktifleşmesini ve alt yolakların aktivasyonunu engelleyerek reseptör seviyesinde bir değişikliğe uğratmadığı söylenebilir.

25˚C kontrol grubunda reseptör seviyesinde, 37˚C kontrol grubuna göre bir değişiklik gözlemlenmemiştir. Düşük sıcaklığın reseptör dinamiğini durdurduğu söylenebilir. 37˚C'de kontrol grubuna göre aksotomi grubunda her iki bölgede de reseptör seviyesinde artış görülürken, 25˚C'de ise aksotomideki bu artış sadece sitoplazmada görülmektedir. Aksotomi sebebiyle ifadesi artan reseptörler düşük sıcaklıktan dolayı hücre zarına taşınamıyor olabilir. Fizyolojik sıcaklıklarda morfin varlığında aksotomi yapıldığında hücrelerde reseptör miktarı azalırken, 25˚C sıcaklıkta morfin varlığında aksotomi grubunda reseptör seviyesinde kontrol grubuna göre bir değişiklik görülmemiştir. Bu sonuca göre düşük sıcaklığın reseptör yıkımını engelleyici bir rol üstlendiği ve reseptör dinamiğini etkilediği söylenebilir.

Tablo 7.2.1. MOR dinamiğindeki değişimin tablosu. "=" anlamlı bir değişiklik olmadığı, "+" artış olduğu, "-" azalma olduğu anlamlarına gelmektedir. Parantez içindekiler sadece o bölgede değişiklik olduğunu ifade etmektedir.

MOR DİNAMİĞİNDEKİ DEĞİŞİKLİKLER										
Göre	Kontrol37	Kontrol25	Aksotomi37	Aksotomi25	Morfin37	Morfin25	MorfinAksotomi37	MorfinAksotomi 25	Nalokson37	NaloksonAksotomi 37
Kontrol37		=	+	=	-	=	=	=	=	=
Kontrol25	=		+	+ (sito)	=	=	-	=	=	=
Aksotomi37	-	-		=	-	- (sito)	-	-	-	-
Aksotomi25	=	- (sito)	=		- (sito)	=	-	=	- (sito)	-
Morfin37	=	=	+	+ (sito)		=	-	=	=	=
Morfin25	=	=	+ (sito)	=	=		-	=	=	- (zar)
MorfinAksotomi37	+	+	+	+	+	+		+	+	+
MorfinAksotomi25	=	=	+	=	=	=	-		=	=
Nalokson37	=	=	+	+ (sito)	=	=	-	=		=
NaloksonAksotomi 37	=	=	+	+ (sito)	=	=	-	=	=	

7.3. Delta Opioid Reseptör (DOR) Dinamikleri

Hücre zarı ve sitoplazmadaki DOR miktarı (Şekil 6.2.2.2) 25˚C kontrol grubunda hem hücre zarında hem de sitoplazmada 37˚C kontrol grubuna göre daha fazla bulundu. Delta reseptörlerinin aktivasyondan sonra MOR gibi tekrar hücre zarına dönmesinden ziyade yıkım yolağına girdiği düşünülmektedir (91). 25˚C sıcaklıkta

bozulma için gereken enzimatik aktivitenin daha yavaş olacağı düşünülürse bozulma hızının da yavaşlaması muhtemeldir. Dolayısıyla 25˚C'de reseptör miktarının daha fazla olması beklenilen bir durumdur.

Hem 37˚C hem de 25˚C kontrol gruplarına göre hücreler morfine maruz bırakıldıklarında DOR seviyesinde düşüş görülmektedir. Bu azalma hücre zarında ve sitoplazmada gerçekleşmiştir. Yapılan bir çalışmada, morfine maruz bırakılan nükleus akumbens nöronlarında DOR seviyesinin azaldığı gösterilmiştir (92). Bu çalışmada AKG nöronlarında gözlenenin benzer bir durum olması mümkündür.

Fizyolojik sıcaklıklarda morfine maruz bırakıp aksotomi yaptığımız grupta reseptör seviyesinin kontrol grubundaki seviyede dengelendiği görülmüştür. Morfin verdiğimizde reseptör seviyesinde bir azalma görürken aksotominin eklenmesiyle reseptör miktarı artmıştır. 25 ˚C'de ise morfin varlığında aksotomi, DOR miktarını kontrol seviyelerine çıkaramamaktadır. Aradaki bu farkın sıcaklık düşüşünün birçok enzimatik aktiviteyi yavaşlatmasına bağlı olduğu düşünülebilir.

Genel olarak bakıldığında ise 37 ˚C'de, kontrol grubu hücreleri ile aksotomi yapılan gruptaki hücreler arasında reseptör seviyesinde bir değişiklik görülmezken; 25 ˚C'de, kontrol grubuna göre aksotomi grubu hücrelerinde reseptör seviyesinde bir azalma görülmektedir. Ayrıca, 37 ˚C'de, aksotomi yapılan grup ile morfin uygulayıp aksotomi yapılan gruplar arasında hücrelerin reseptör seviyesinde bir fark görülmezken; 25 ˚C'de, aksotomi yapılan grup ile morfin uygulayıp aksotomi yapılan gruplar arasında hücrelerin reseptör seviyesinde bir azalma görülüyor. Son olarak, 37 ˚C'de morfin uygulanan hücre grubuna göre morfin uygulanıp aksotomi yapılan gruptaki hücrelerde reseptör seviyesinde bir artış görülürken; aynı grupların 25˚C sıcaklıklarında, morfin uygulanıp aksotomi yapılan hücre gruplarında reseptör seviyesindeki artışın daha az olduğu görüldü. Bütün bu farkların, sıcaklığın reseptör dinamiğini azalttığı için oluştuğu söylenebilir.

Yapılan bazı çalışmalarda DOR'un daha çok sitoplazmada bulunduğundan bahsedilse de (93), bizim sonuçlarımıza göre reseptör seviyesi hücre zarında sitoplazmadan daha fazladır (Şekil 6.3.2.1). Tukey testine göre değerlendirdiğimizde, 37 ˚C'de kontrol grubuna göre nalokson varlığında aksotomi yapılan gruptaki

hücrelerde reseptörlerin daha çok sitoplazmada yoğunlaştığını görüyoruz. Fizyolojik sıcaklıklarda hücre zarındaki reseptör seviyesi Morfin verdiğimizde anlamlı olarak artmasa da 25˚C'de anlamlı olarak arttığını görüyoruz. Bu durumu, dinamiği fazla olan DOR'un sıcaklık düşünce bozulmaya uğrayamadığı için anlamlı bir artış gördüğümüz şeklinde yorumlayabiliriz.

Tablo 7.3.1. DOR dinamiğindeki değişimin tablosu. "=" anlamlı bir değişiklik olmadığı, "+" artış olduğu, "-" azalma olduğu anlamlarına gelmektedir. Parantez içindekiler sadece o bölgede değişiklik olduğunu ifade etmektedir.

DOR DİNAMİĞİNDEKİ DEĞİŞİKLİKLER										
Göre	Kontrol37	Kontrol25	Aksotomi37	Aksotomi25	Morfin37	Morfin25	MorfinAksotomi37	MorfinAksotomi25	Naloxson37	NaloksonAksotomi37
Kontrol37		+	=	+	-	-	=	-	-	- (zar)
Kontrol25	-		-	-	-	-	-	-	-	-
Aksotomi37	=	+		+	-	-	=	=	-	- (zar)
Aksotomi25	-	+	-		-	-	-	-	-	-
Morfin37	+	+	+	+		=	+	+	=	+
Morfin25	+	+	+	+	=		+	+	=	+
MorfinAksotomi37	=	+	=	+	-	-		-	-	-
MorfinAksotomi25	+	+	+ (sito)	+	-	-	+		-	=
Naloxson37	+	+	+	+	=	=	+	+		+
NaloksonAksotomi37	+ (zar)	+	+ (zar)	+	-	-	+	=	-	

7.4. MOR-DOR Heteromer Reseptör (HET) Dinamikleri

Her gruptaki reseptör miktarı kendi içinde 37 ˚C ve 25 ˚C olarak karşılaştırıldığında, sıcaklık farkının reseptör dinamiği üzerinde bir etkisi olmadığı görüldü. Yani 37 ˚C'de kontrol grubu ile 25 ˚C'deki kontrol grubunda hücrelerdeki reseptör miktarı aynı seviyede kaldı. Aynı durum aksotomi, morfin ve morfin varlığında aksotomi yaptığımız gruplardaki hücrelerde de gözlendi. Bu durumda heterodimer yapının oluşmasının, sıcaklık farkından bağımsız bir şekilde gerçekleştiği söylenebilir.

Fizyolojik sıcaklıklarda yapılan aksotomi HET reseptör seviyesinin hem hücre zarında hem de sitoplazmada azalmasına neden oldu (Şekil 6.2.3.3). Bunun heterodimerleşmenin azalmasıyla gerçekleştiği düşünülebilir. MOR reseptöründeki aksotomiye bağlı artış da heteromer yapının ayrışmasından kaynaklı olabilir.

Hem fizyolojik sıcaklıklarda hem de 25˚C'de kontrol gruplarına göre morfin uygulandığında ve morfin varlığında aksotomi yapıldığında reseptör seviyesinin her iki bölgede de azaldığı bulundu. Bu durumda heterodimer yapının bozulduğu söylenebilir. Ya da hücrelerdeki MOR'un, 37 ˚C'de morfin uygulanıp aksotomi yapılan gruptaki azalmasını ve DOR'un miktarının da 25˚C'de morfin uygulanıp aksotomi yapılan gruptaki hücrelerde azaldığını göz önüne alırsak, HET'in azalan reseptör seviyesinden ötürü oluşamadığını da söyleyebiliriz. Literatürde AKG nöronlarının kronik morfine maruz bırakılmasının, reseptör seviyesinde artışa neden olduğu, akut etkide de bir değişiklik olmadığı söylenmektedir (94). Bu çalışmadaki sonucun literatürdeki ile uyuşmadığı görülmektedir.

25˚C sıcaklıkta morfin verilen gruba göre morfin verip aksotomi yapılan gruptaki hücrelerde HET seviyesi düştü. Fakat bu azalma 37˚C'de görülmedi. Bunun sebebinin, düşük sıcaklığın heterodimer yapı oluşturmasını güçleştirmesi olduğu düşünülebilir.

Aksotomi yapılan gruplara göre hem 37˚C'de hem de 25˚C'de morfin varlığında aksotomi yapılan grup hücrelerinde azalma gerçekleşti. Yine aynı şekilde hücrelerdeki MOR miktarının 37˚C'de morfin varlığında aksotomi yapılan grupta azalması ve DOR'un da 25˚C'de morfin varlığında aksotomi yapılan grupta azalması göz önüne alındığında, HET'in azalan reseptör seviyesinden ötürü oluşamadığı sonucuna varılabilir.

Nalokson'a maruz bırakılan grupta HET seviyesi kontrol seviyelerinde iken Nalokson varlığında hücrelere verilen hasar sonrası HET miktarının azaldığı tespit edildi. Nalokson ve nalokson varlığında aksotomi MOR dağılımına etki etmezken, Naloksonun DOR seviyesini düşürdüğünü, nalokson varlığında uygulanan aksotominin ise arttırdığı gözlendi. Yani DOR'un HET'e göre tam tersi tepki verdiği görülüyor. Bu durumu heteromer yapının artması DOR'un tek başına bulunma olasılığını azaltırken, heteromer yapının bozulması ise DOR seviyesinin artmasına sebep olabileceği yönünde tartışmak mümkündür. Bu tartışmayı destekleyebilecek bir çalışmada da heteromer reseptörün oluşması için gereken MOR ve DOR reseptörlerin *de novo* olarak üretilmediği, hücrede bulunan reseptörlerin kullanıldığı savunulmaktadır (95).

Zar/sitoplazma reseptör oranına bakıldığında 25˚C'de kontrol grubunda reseptör çoğunlukla hücre zarında bulunurken diğer 25˚C'deki gruplarda daha çok sitoplazmaya bir yönelim olduğu söylenebilir. 37 ˚C'deki kontrol grubu hücrelerinde heterodimer yapının daha çok hücre zarında bulunduğu ve 37 ˚C'de nalokson uygulanıp aksotomi yapılan grup hariç diğer manipülasyonların reseptör hareketinde bir değişiklik oluşturmamış olduğu görüldü. 37 ˚C'de nalokson varlığında aksotomi yapılan gruptaki hücrelerde ise reseptörlerin çoğunlukla sitoplazmada bulunduğundan bahsedilebilir. 37 ˚C'de aksotomi ve nalokson uygulanan gruplarda HET çoğunlukla zarda bulunurken, Nalokson varlığında aksotominin hücre içerisine girişine sebep olduğu da görülmektedir. Heteromer oluşumunun tam olarak nerede gerçekleştiği halen tartışmalara yol açsa da bazı çalışmalara göre reseptör oluşumu sadece hücre zarında gerçekleşmektedir (87). Fakat araştırmamız sonucunda nalokson varlığında aksotomi uyguladığımızda, reseptörler hücre içerisinde de görüldü (Şekil 6.2.3.2).

MOR-DOR heteromer yapının dinamiği ile ilgili literatürde çok fazla çalışma bulunmamaktadır. Yapılan çalışmalarda da farklı sonuçlarla karşılaşılmaktadır. Yukarıda değerlendirdiğimiz sonuçların literatüre katkıda bulunacağına inanmaktayız.

Tablo 7.4.1. HET dinamiğindeki değişimin tablosu. "=" anlamlı bir değişiklik olmadığı, "+" artış olduğu, "-" azalma olduğu anlamlarına gelmektedir. Parantez içindekiler sadece o bölgede değişiklik olduğunu ifade etmektedir.

HET DİNAMİĞİNDEKİ DEĞİŞİKLİKLER										
Göre	Kontrol37	Kontrol25	Aksotomi37	Aksotomi25	Morfin37	Morfin25	MorfinAksotomi37	MorfinAksotomi25	Nalokson37	NaloksonAksotomi37
Kontrol37		=	-	-	-	-	-	-	=	-
Kontrol25	=		-	-	-	-	-	-	=	-
Aksotomi37	+	+		=	-	=	-	-	+	-
Aksotomi25	+	+	=		-	=	-	-	+	-
Morfin37	+	+	+	+		=	=	=	+	=
Morfin25	+	+	=	=	=		-	- (sito)	+	-
MorfinAksotomi37	+	+	+	+	=	+		=	+	=
MorfinAksotomi25	+	+	+	+		+ (sito)	=		+	=
Nalokson37	=	=	-	-	-	-	-	-		-
NaloksonAksotomi37	+	+	+	+	=	+	=	=	+	

7.5. Travma Sonrası Meydana Gelen Opioid Reseptör Dağılım Değişikliklerinin Olası Etkileri

Travma sonrası AKG nöronlarında artan MOR miktarı morfin varlığında hasar verildiğinde ise baskılanmıştır. Sadece morfin varlığında MOR seviyesinde bir değişiklik olmazken, hasar ile artan MOR'un morfin tarafından daha etkili bir biçimde azaltıldığı görülmektedir. Aynı durumlarda aksotomi sonrası ve morfin varlığında hasar sonrası DOR miktarında bir değişiklik gözlenmemektedir. MOR'un daha çok mekanik, kimyasal ve termal ağrılar gibi akut ağrılarda etkili olduğu; DOR'un ise nöropatik ağrı ve hiperaljezi gibi kronik durumlarda etkisini gösterdiği yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (96). Bu duruma göre bakıldığında hasar sonrası akut olarak MOR'un daha aktif olduğu, daha uzun süreli etkilerde ise DOR'un devreye gireceği söylenebilir. Ayrıca morfin varlığında hasar verilen nöronlardaki MOR miktarının azalmasına bakıldığında reseptör duyarsızlaşmasının ya da opioid toleransının oluşmaya başladığı söylenebilir.

Aksotomi sonrası HET'in dimerleşmesinin sona erdiği ve bundan ötürü hücredeki MOR miktarının arttığı ve bozulmaya yatkın olan fazla DOR'un da yıkıma uğradığı söylenebilir. Morfin varlığında verilen hasarın da MOR seviyesini azalttığı göz önüne alındığında yine heterodimerleşmenin daha az olacağı düşünülebilir.

Genel olarak bu üç farklı reseptör dinamiğine bakıldığında, hasar sonrası farklı hareketler sergileseler de hepsinin birbiriyle bağlantısı olduğu, bu yüzden de analjezik etki oluşturmak istenirken reseptörlerin birbirinden bağımsız düşünülemeyeceği söylenebilir.

8. SONUÇ

Bu tez çalışmasında AKG nöronlarında MOR, DOR ve HET reseptör miktar ve dağılımının agonist ve antagonist etkisinde ve/veya aksonal hasar sonrası farklı sıcaklıklarda nasıl değiştiği immünositokimya ve görüntü analiz yöntemleriyle araştırılmıştır. Sonuç olarak bu üç reseptör miktar ve dağılımının birbirinden farklı dinamikler gösterdiği bulunmuştur. HET'in dinamiğinin kısmen de olsa MOR ve DOR dinamikleri ile açıklanabileceği gözlendi. Ayrıca travma ile birlikte düşünüldüğünde, DOR'un dinamiğinin daha çok etkilendiği ve daha önemli olduğu, öte yandan hem MOR'un hem de HET'in daha az değişiklik gösterdiği tespit edildi.

Opioidlerle ilgili literatürdeki birçok çalışma ya nöron dışı hücre hatlarıyla ya klonlama tekniğiyle reseptörler GFP gibi floresan proteinler ile birleştirilerek, ya da sıcaklık gibi uygun fizyolojik koşullar göz önünde bulundurulmayarak gerçekleştirilmiştir (20). Bu teknik eksiklik ve farklılıklardan dolayı farklı çalışmalar reseptörlerin dinamiği ile ilgili farklı sonuçlar ortaya koymuştur (21, 97, 98). Bu tez çalışmasında primer duyu nöronlarının kullanılması, sıcaklık farkının oluşturabileceği etkinin göz önüne alınması, reseptör dinamiklerinin aksotomi gibi güçlü bir modelle değişime zorlanması ve immünositokimya gibi daha az müdaheleci bir analiz yönteminin tercih edilmesi, sonuçların in vivo fizyolojik durumu yansıtma gücünü arttırmıştır.

Opioid sisteminin daha iyi anlaşılması özellikle ağrı farmakolojisinde mevcut ilaçların daha etkin kullanılması, tolerans ve bağımlılık sorunlarının çözülmesi ve daha etkin ve uygun yeni ajanların geliştirilmesi açısından son derece önemlidir. Bu tez çalışması kapsamında elde edilen sınırlı bulguların daha ileri ve kapsamlı araştırmalara öncü olacağı beklenmektedir.

9. KAYNAKLAR

1. Krames ES. The dorsal root ganglion in chronic pain and as a target for neuromodulation: a review. Neuromodulation: Technology at the Neural Interface. 2015;18(1):24-32.

2. Gelderd JB, Chopin SF. The vertebral level of origin of spinal nerves in the rat. The Anatomical Record. 1977;188(1):45-7.

3. Hasegawa T, An HS, Haughton VM, editors. Imaging anatomy of the lateral lumbar spinal canal. Seminars in Ultrasound, CT and MRI; 1993: Elsevier.

4. Taxi J, Eugène D. Effects of axotomy, deafferentation, and reinnervation on sympathetic ganglionic synapses: a comparative study. International review of cytology. 1995;159:195-263.

5. Burnett MG, Zager EL. Pathophysiology of peripheral nerve injury: a brief review. Neurosurgical focus. 2004;16(5):1-7.

6. Offermanns S. Encyclopedia of Molecular Pharmacology: Springer Science & Business Media; 2008.

7. Wikler A. Sites and mechanisms of action of morphine and related drugs in the central nervous system. J Pharmacol Exp Ther. 1950:100:435–506.

8. Snyder SH, Matthysse S. Opiate receptor mechanisms. Cambridge: MIT Press; 1975.

9. Snyder SH. The Opiate Receptors: Humana Press; 2011.

10. Trescot AM, Datta S, Lee M, Hansen H. Opioid pharmacology. Pain physician. 2008;11(2 Suppl):S133-53.

11. Bowen W, Hellewell S, Kelemen M, Huey R, Stewart D. Affinity labeling of delta-opiate receptors using [D-Ala2, Leu5, Cys6] enkephalin. Covalent attachment via thiol-disulfide exchange. Journal of Biological Chemistry. 1987;262(28):13434-9.

12. Portoghese PS, Sultana M, Takemori A. Naltrindole 5'-isothiocyanate: a nonequilibrium, highly selective δ opioid receptor antagonist. Journal of medicinal chemistry. 1990;33(6):1547-8.

13. Mika J, Obara I, Przewlocka B. The role of nociceptin and dynorphin in chronic pain: Implications of neuro–glial interaction. Neuropeptides. 2011;45(4):247-61.

14. Childers SR, Snyder SH. Guanine nucleotides differentiate agonist and antagonist interactions with opiate receptors. Life sciences. 1978;23(7):759-61.

15. Rusin K, Giovannucci D, Stuenkel E, Moises H. κ-opioid receptor activation modulates Ca2+ currents and secretion in isolated neuroendocrine nerve terminals. Journal of Neuroscience. 1997;17(17):6565-74.

16. Waldhoer M, Bartlett SE, Whistler JL. Opioid receptors. Annual review of biochemistry. 2004;73(1):953-90.

17. Whistler JL, Chuang H-h, Chu P, Jan LY, von Zastrow M. Functional dissociation of μ opioid receptor signaling and endocytosis: implications for the biology of opiate tolerance and addiction. Neuron. 1999;23(4):737-46.

18. Rios C, Jordan B, Gomes I, Devi L. G-protein-coupled receptor dimerization: modulation of receptor function. Pharmacology & therapeutics. 2001;92(2):71-87.

19. Gomes I, Jordan B, Gupta A, Trapaidze N, Nagy V, Devi L. Heterodimerization of μ and δ opioid receptors: a role in opiate synergy. The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience. 2000;20(22):RC110.

20. Williams JT, Ingram SL, Henderson G, Chavkin C, von Zastrow M, Schulz S, et al. Regulation of μ-opioid receptors: Desensitization, phosphorylation, internalization, and tolerance. Pharmacological reviews. 2013;65(1):223-54.

21. Trafton J, Basbaum A. [d-Ala2, N-MePhe4, Gly-ol5] enkephalin-induced internalization of the μ opioid receptor in the spinal cord of morphine tolerant rats. Neuroscience. 2004;125(3):541-3.

22. Kishi M, Tanabe J, Schmelzer JD, Low PA. Morphometry of dorsal root ganglion in chronic experimental diabetic neuropathy. Diabetes. 2002;51(3):819-24.

23. Devor M. Unexplained peculiarities of the dorsal root ganglion. Pain. 1999;82:S27-S35.

24. Watson C, Kirkcaldie M, Paxinos G. The brain: an introduction to functional neuroanatomy: Academic Press; 2010.

25. Aldskogius H, Elfvin L-G, Forsman CA. Primary sensory afferents in the inferior mesenteric ganglion and related nerves of the guinea pig: an experimental study with anterogradely transported wheat germ agglutinin-horseradish peroxidase conjugate. Journal of the autonomic nervous system. 1986;15(2):179-90.

26. Hogan Q. Labat lecture: the primary sensory neuron: where it is, what it does, and why it matters. Regional anesthesia and pain medicine. 2010;35(3):306.

27. Gemes G, Koopmeiners A, Rigaud M, Lirk P, Sapunar D, Bangaru ML, et al. Failure of action potential propagation in sensory neurons: mechanisms and loss of afferent filtering in C-type units after painful nerve injury. The Journal of physiology. 2013;591(4):1111-31.

28. Richardson PM, Miao T, Wu D, Zhang Y, Yeh J, Bo X. Responses of the nerve cell body to axotomy. Neurosurgery. 2009;65(4):A74-A9.

29. Deshmukh M, Johnson EM. Programmed cell death in neurons: focus on the pathway of nerve growth factor deprivation-induced death of sympathetic neurons. Molecular Pharmacology. 1997;51(6):897-906.

30. Nissl F. Ueber die veränderungen der ganglienzellen am facialiskern des kaninchens nach ausreissung der nerven. allg Z Psychiat. 1892;48:197-8.

31. Harkonen M. Carboxylic esterases oxidative enzymes and catecholamines in superior cervical ganglion of rat and effect of pre-and post-ganglionic nerve division. Acta physiologica scandinavica. 1964:9-&.

32. Jessell T, Tsunoo A, Kanazawa I, Otsuka M. Substance P: depletion in the dorsal horn of rat spinal cord after section of the peripheral processes of primary sensory neurons. Brain research. 1979;168(2):247-59.

33. Rotter A, Birdsall N, Burgen A, Field P, Raisman G. Axotomy causes loss of muscarinic receptors and loss of synaptic contacts in the hypoglossal nucleus. 1977.

34. Senba E, Simmons DM, Wada E, Wada K, Swanson LW. RNA levels of neuronal nicotinic acetylcholine receptor subunits are differentially regulated in axotomized facial motoneurons: an in situ hybridization study. Molecular Brain Research. 1990;8(4):349-53.

35. Biguet NF, Rittenhouse A, Mallet J, Zigmond RE. Preganglionic nerve stimulation increases mRNA levels for tyrosine hydroxylase in the rat superior cervical ganglion. Neuroscience letters. 1989;104(1):189-94.

36. Hoffman PN. Expression of GAP-43, a rapidly transported growth-associated protein, and class II beta tubulin, a slowly transported cytoskeletal protein, are coordinated in regenerating neurons. Journal of Neuroscience. 1989;9(3):893-7.

37. Mohney RP, Siegel RE, Zigmond RE. Galanin and vasoactive intestinal peptide messenger RNAs increase following axotomy of adult sympathetic neurons. Journal of neurobiology. 1994;25(2):108-18.

38. Sun Y, Rao MS, Zigmond RE, Landis SC. Regulation of vasoactive intestinal peptide expression in sympathetic neurons in culture and after axotomy: the role of cholinergic differentiation factor/leukemia inhibitory factor. Developmental Neurobiology. 1994;25(4):415-30.

39. Zigmond RE, Hyatt-Sachs H, Mohney R, Schreiber R, Shadiack A, Sun Y, et al. Changes in neuropeptide phenotype after axotomy of adult peripheral neurons and

the role of leukemia inhibitory factor. Perspectives on developmental neurobiology. 1995;4(1):75-90.

40. Stahl N, Yancopoulos GD. The tripartite CNTF receptor complex: activation and signaling involves components shared with other cytokines. Journal of neurobiology. 1994;25(11):1454-66.

41. Segal RA, Greenberg ME. Intracellular signaling pathways activated by neuropathic factors. Annual review of neuroscience. 1996;19(1):463-89.

42. Waldhoer M, Bartlett, S. E., Whistler, J. L. OPIOID RECEPTORS. Annu Rev Biochem. 2004:73:953–90.

43. Pert CB, Snyder SH. Opiate receptor: demonstration in nervous tissue. Science. 1973:179:1011–4.

44. Lewis JW, Bentley KW, Cowan A. Narcotic analgesics and antagonists. Ann Rev Pharmacol. 1971:11:241–70.

45. J H, TW S, HW K, al e. Identification of two related pentapeptides from the brain with potent opiate agonist activity. Nature. 1975:258:577–9.

46. Cox BM, Gentleman S, Su TP, al e. Further characterization of morphine-like peptides (endorphins) from pituitary. Brain Res. 1976:115:285–96.

47. Goldstein A, Fischli W, al e. Porcine pituitary dynorphin: complete amino acid sequence of the biologically active heptadecapeptide. Proc Natl Acad Sci. 1981:78:7219–23.

48. Benarroch EE. Endogenous opioid systems Current concepts and clinical correlations. Neurology. 2012;79(8):807-14.

49. Nandhu M, Naijil G, Smijin S, Jayanarayanan S, Paulose C. Opioid system functional regulation in neurological disease management. Journal of neuroscience research. 2010;88(15):3215-21.

50. Maldonado R, editor The endogenous opioid system and drug addiction. Annales pharmaceutiques francaises; 2010: NIH Public Access.

51. Le Merrer J, Becker JA, Befort K, Kieffer BL. Reward processing by the opioid system in the brain. Physiological reviews. 2009;89(4):1379-412.

52. Beckett AH, Casy AF. Synthetic analgesics: sterochemical considerations. J Pharm Pharmacol. 1954:6:986–1001.

53. Goldstein A, Lowney LI, Pal BK. Stereospecific and nonspecific interactions of the morphine congener levorphanol in subcellular fractions of mouse brain. Proc Natl Acad Sci. 1971:68:1742–7.

54. Terenius L. Stereospecific interaction between narcotic analgesics and a synaptic plasma membrane fraction of rat cerebral cortex. Acta Pharmacol Toxicol. 1973:32:317–20.

55. Simon EJ, Hiller JM, Edelman I. Stereospecific binding of the potent narcotic analgesic [3H]etorphine to rat-brain homogenate. Proc Natl Acad Sci. 1973:70:1947–9.

56. Martin WR. Opioid antagonists. Pharmacol Rev 1967:19:463–521

57. Martin WR, al e. The effects of morphine and nalorphine– like drugs in the nondependent and morphine-dependent chronic spinal dog. J Pharmacol Exp Ther. 1976:197:517–32.

58. Khazan N, al e. Sigma opioid receptor; SKF-10,047 update. Neuropeptides. 1985:339–40.

59. Lord JAH, Waterfield AA, Hughes J, al e. Endogenous opioid peptides: multiple agonists and receptors. . Nature 1977:267:495–9.

60. Mollereau C, al e. ORL-1, a novel member of the opioid. FEBS Lett 1994:341:33–38.

61. Pan Y-X, al e. Cloning, expression and classification of a K3-related opioid receptor using antisense oligodeoxynucleotides. Reg Peptides 1994:54:217–8.

62. Bunzow JR, al e. Molecular cloning and tissue distribution of a putative member of the rat opioid receptor gene family that is not a m, d, or K opioid receptor type. FEBS Lett. 1994:347:284–8.

63. Meunier JC, Mollereau C, Toll L, al e. Isolation and structure of the endogenous agonist of the opioid receptor like ORL1 receptor. Nature 1995:377:532–5.

64. Reinscheid RK, Nothacker H-P, Bourson A, Ardati A, Henningsen RA, Bunzow JR, et al. Orphanin FQ: a neuropeptide that activates an opioidlike G protein-coupled receptor. Science. 1995;270(5237):792-5.

65. Smith MT, Muralidharan A. Pain pharmacology and the pharmacological management of pain. Pain: A Textbook for Therapists. 2013:159.

66. Dietis N, Rowbotham D, Lambert D. Opioid receptor subtypes: fact or artifact? British journal of anaesthesia. 2011:aer115.

67. Ragnauth A, Moroz M, Bodnar RJ. Multiple opioid receptors mediate feeding elicited by mu and delta opioid receptor subtype agonists in the nucleus accumbens shell in rats. Brain research. 2000;876(1):76-87.

68. Ahlbeck K. Opioids: a two-faced Janus. Current medical research and opinion. 2011;27(2):439-48.

69. Barchfeld CC, Medzihradsky F. Receptor-mediated stimulation of brain GTPase by opiates in normal and dependent rats. Biochemical and biophysical research communications. 1984;121(2):641-8.

70. Torrecilla M, Quillinan N, Williams JT, Wickman K. Pre-and postsynaptic regulation of locus coeruleus neurons after chronic morphine treatment: a study of GIRK-knockout mice. European Journal of Neuroscience. 2008;28(3):618-24.

71. Al-Hasani R, Bruchas MR. Molecular mechanisms of opioid receptor-dependent signaling and behavior. The Journal of the American Society of Anesthesiologists. 2011;115(6):1363-81.

72. Ferguson SS. Evolving concepts in G protein-coupled receptor endocytosis: the role in receptor desensitization and signaling. Pharmacological reviews. 2001;53(1):1-24.

73. Harrison RS, Ruiz-Gómez G, Hill TA, Chow SY, Shepherd NE, Lohman R-J, et al. Novel helix-constrained nociceptin derivatives are potent agonists and antagonists of ERK phosphorylation and thermal analgesia in mice. Journal of medicinal chemistry. 2010;53(23):8400-8.

74. Nestler EJ. Under siege: the brain on opiates. Neuron. 1996;16(5):897-900.

75. He L, Fong J, von Zastrow M, Whistler JL. Regulation of opioid receptor trafficking and morphine tolerance by receptor oligomerization. Cell. 2002;108(2):271-82.

76. Bohn LM, Gainetdinov RR, Lin F-T, Lefkowitz RJ, Caron MG. μ-Opioid receptor desensitization by β-arrestin-2 determines morphine tolerance but not dependence. Nature. 2000;408(6813):720-3.

77. Prinster SC, Hague C, Hall RA. Heterodimerization of g protein-coupled receptors: specificity and functional significance. Pharmacological Reviews. 2005;57(3):289-98.

78. Jordan BA, Devi LA. G-protein-coupled receptor heterodimerization modulates receptor function. Nature. 1999;399(6737):697-700.

79. Cvejic S, Devi LA. Dimerization of the δ opioid receptor: implication for a role in receptor internalization. Journal of Biological Chemistry. 1997;272(43):26959-64.

80. Waldhoer M, Fong J, Jones RM, Lunzer MM, Sharma SK, Kostenis E, et al. A heterodimer-selective agonist shows in vivo relevance of G protein-coupled

receptor dimers. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2005;102(25):9050-5.

81. Pan Y-X, Bolan E, Pasternak GW. Dimerization of morphine and orphanin FQ/nociceptin receptors: generation of a novel opioid receptor subtype. Biochemical and biophysical research communications. 2002;297(3):659-63.

82. Wang D, Sun X, Bohn LM, Sadee W. Opioid receptor homo-and heterodimerization in living cells by quantitative bioluminescence resonance energy transfer. Molecular pharmacology. 2005;67(6):2173-84.

83. George SR, Fan T, Xie Z, Tse R, Tam V, Varghese G, et al. Oligomerization of μ-and δ-opioid receptors generation of novel functional properties. Journal of Biological Chemistry. 2000;275(34):26128-35.

84. Snook LA, Milligan G, Kieffer BL, Massotte D. μ-δ opioid receptor functional interaction: insight using receptor-G protein fusions. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics. 2006;318(2):683-90.

85. Walwyn W, John S, Maga M, Evans CJ, Hales TG. δ Receptors are required for full inhibitory coupling of μ receptors to voltage-dependent Ca2+ channels in dorsal root ganglion neurons. Molecular pharmacology. 2009;76(1):134-43.

86. Rozenfeld R, Devi LA. Receptor heterodimerization leads to a switch in signaling: β-arrestin2-mediated ERK activation by μ-δ opioid receptor heterodimers. The FASEB Journal. 2007;21(10):2455-65.

87. Law P-Y, Erickson-Herbrandson LJ, Zha QQ, Solberg J, Chu J, Sarre A, et al. Heterodimerization of μ-and δ-opioid receptors occurs at the cell surface only and requires receptor-G protein interactions. Journal of Biological Chemistry. 2005;280(12):11152-64.

88. Hasbi A, Nguyen T, Fan T, Cheng R, Rashid A, Alijaniaram M, et al. Trafficking of Preassembled Opioid μ− δ Heterooligomer− Gz Signaling Complexes to the Plasma Membrane: Coregulation by Agonists. Biochemistry. 2007;46(45):12997-3009.

89. Truong W, Cheng C, Xu QG, Li XQ, Zochodne DW. μ Opioid receptors and analgesia at the site of a peripheral nerve injury. Annals of neurology. 2003;53(3):366-75.

90. Lukas TJ, Wang AL, Yuan M, Neufeld AH. Early cellular signaling responses to axonal injury. Cell Communication and Signaling. 2009;7(1):5.

91. Chaturvedi K, Bandari P, Chinen N, Howells RD. Proteasome involvement in agonist-induced down-regulation of μ and δ opioid receptors. Journal of Biological Chemistry. 2001;276(15):12345-55.

92. Turchan J, Przewłocka B, Toth G, Lasoń W, Borsodi A, Przewłocki R. The effect of repeated administration of morphine, cocaine and ethanol on mu and delta opioid receptor density in the nucleus accumbens and striatum of the rat. Neuroscience. 1999;91(3):971-7.

93. Zhang X, Bao L, Arvidsson U, Elde R, Hökfelt T. Localization and regulation of the delta-opioid receptor in dorsal root ganglia and spinal cord of the rat and monkey: evidence for association with the membrane of large dense-core vesicles. Neuroscience. 1997;82(4):1225-42.

94. Ong EW, Cahill CM. Molecular perspectives for mu/delta opioid receptor heteromers as distinct, functional receptors. Cells. 2014;3(1):152-79.

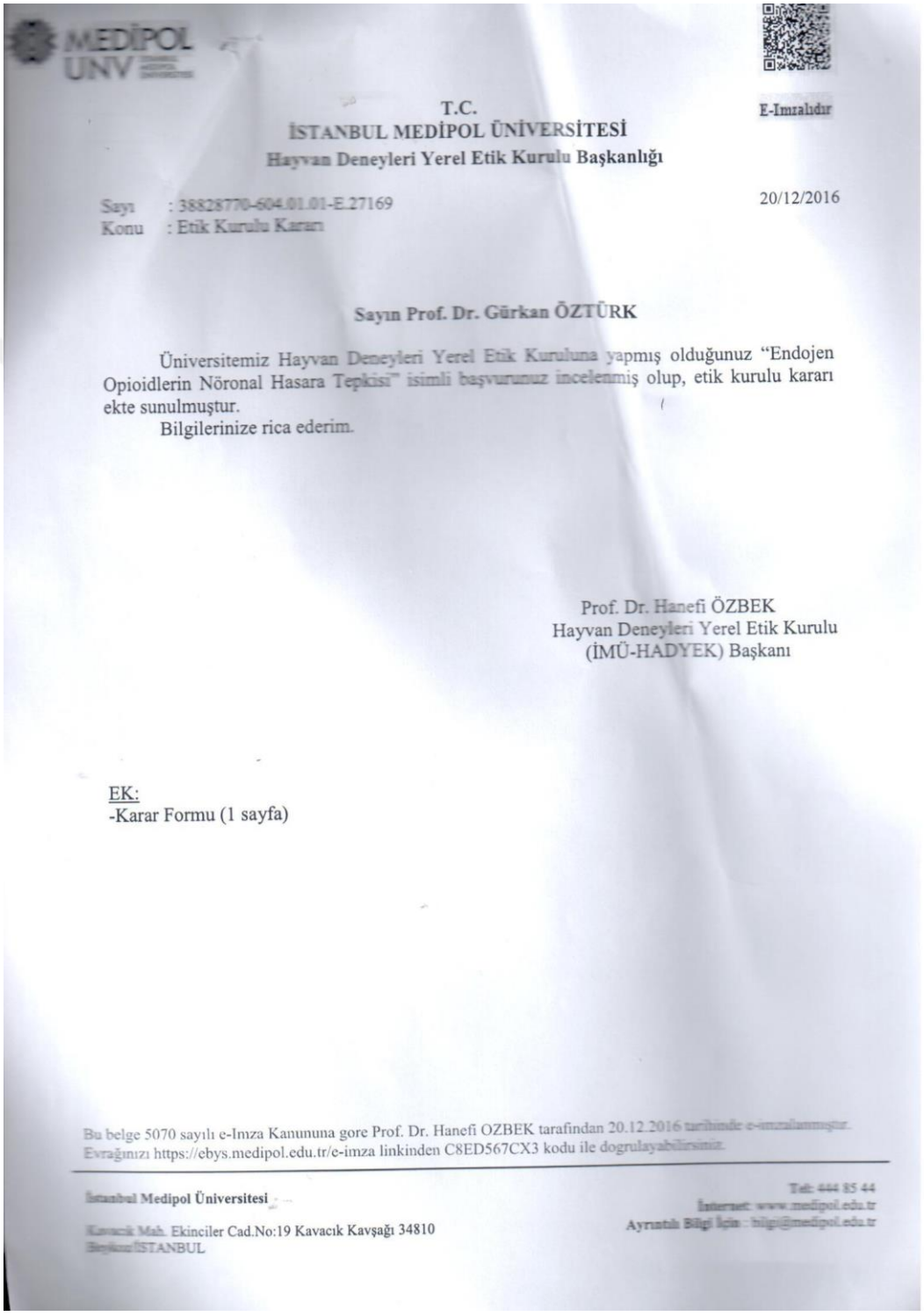
95. Morinville A, Cahill CM, Kieffer B, Collier B, Beaudet A. Mu-opioid receptor knockout prevents changes in delta-opioid receptor trafficking induced by chronic inflammatory pain. Pain. 2004;109(3):266-73.

96. Gavériaux-Ruff C, Karchewski LA, Hever X, Matifas A, Kieffer BL. Inflammatory pain is enhanced in delta opioid receptor-knockout mice. European Journal of Neuroscience. 2008;27(10):2558-67.

97. Haberstock-Debic H, Wein M, Barrot M, Colago EE, Rahman Z, Neve RL, et al. Morphine acutely regulates opioid receptor trafficking selectively in dendrites of nucleus accumbens neurons. Journal of Neuroscience. 2003;23(10):4324-32.

98. Yu Y, Zhang L, Yin X, Sun H, Uhl GR, Wang JB. μ Opioid receptor phosphorylation, desensitization, and ligand efficacy. Journal of Biological Chemistry. 1997;272(46):28869-74.

10. ETİK KURUL ONAYI



MEDİPOL UNV

T.C.
İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanlığı

E-Imzalıdır

Sayı : 38828770-604.01.01-E.27169
Konu : Etik Kurulu Kararı

20/12/2016

Sayın Prof. Dr. Gürkan ÖZTÜRK

Üniversitemiz Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kuruluna yapmış olduğunuz "Endojen Opioidlerin Nöronal Hasara Tepkisi" isimli başvurunuz incelenmiş olup, etik kurulu kararı ekte sunulmuştur.

Bilgilerinize rica ederim.

Prof. Dr. Hanefi ÖZBEK
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu
(İMÜ-HADYEK) Başkanı

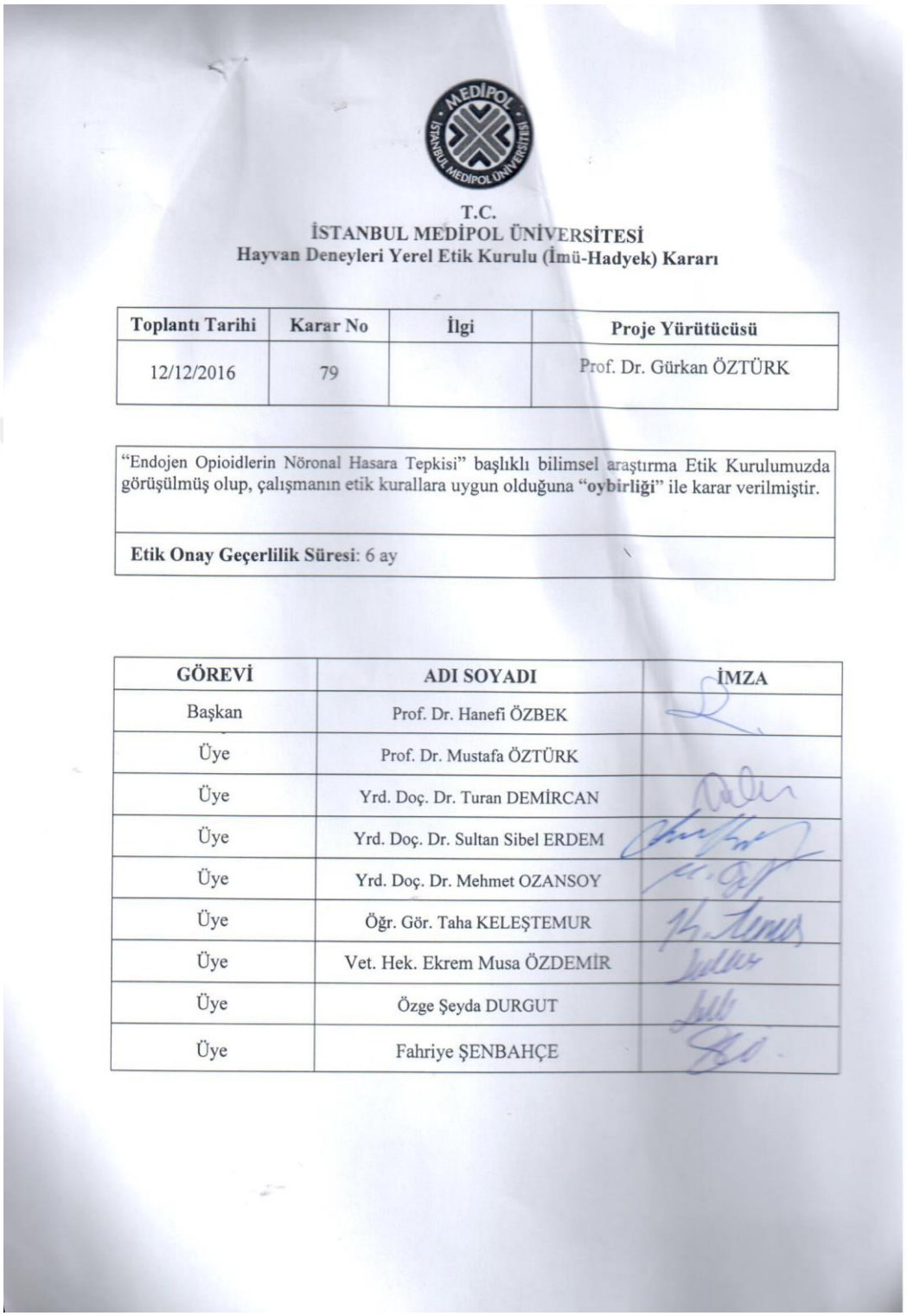
EK:
-Karar Formu (1 sayfa)

Bu belge 5070 sayılı e-Imza Kanununa gore Prof. Dr. Hanefi OZBEK tarafından 20.12.2016 tarihinde e-imzalanmıştır.
Evrağınızı https://ebys.medipol.edu.tr/e-imza linkinden C8ED567CX3 kodu ile dogrulayabilirsiniz.

İstanbul Medipol Üniversitesi
Kavacık Mah. Ekinciler Cad.No:19 Kavacık Kavşağı 34810
Beykoz/İSTANBUL

Tel: 444 85 44
İnternet: www.medipol.edu.tr
Ayrıntılı Bilgi İçin : bilgi@medipol.edu.tr

ETİK KURUL ONAYI (DEVAM)



T.C.
İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu (İmü-Hadyek) Kararı

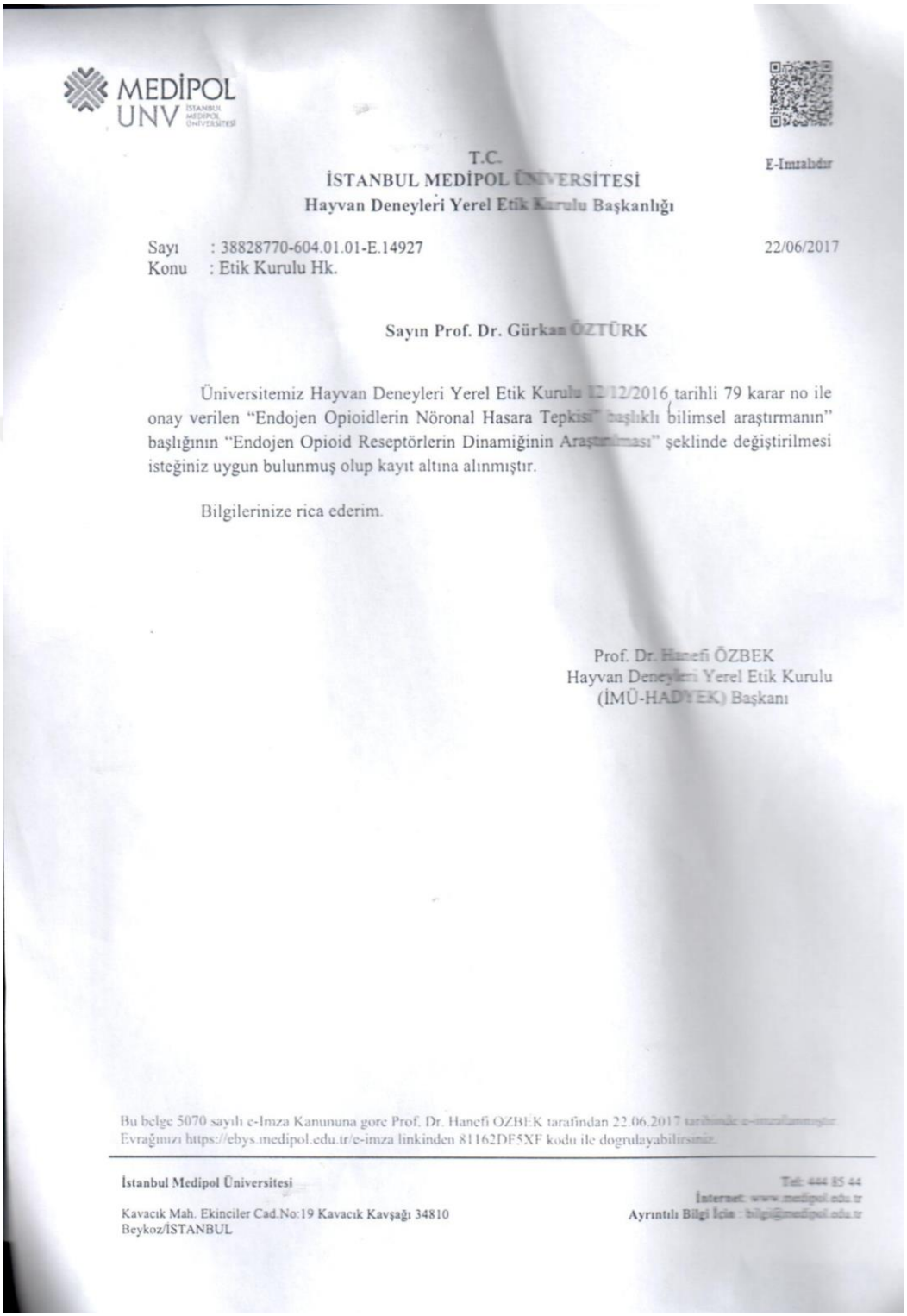
Toplantı Tarihi	Karar No	İlgi	Proje Yürütücüsü
12/12/2016	79		Prof. Dr. Gürkan ÖZTÜRK

"Endojen Opioidlerin Nöronal Hasara Tepkisi" başlıklı bilimsel araştırma Etik Kurulumuzda görüşülmüş olup, çalışmanın etik kurallara uygun olduğuna "**oybirliği**" ile karar verilmiştir.

Etik Onay Geçerlilik Süresi: 6 ay

GÖREVİ	ADI SOYADI	İMZA
Başkan	Prof. Dr. Hanefi ÖZBEK	
Üye	Prof. Dr. Mustafa ÖZTÜRK	
Üye	Yrd. Doç. Dr. Turan DEMİRCAN	
Üye	Yrd. Doç. Dr. Sultan Sibel ERDEM	
Üye	Yrd. Doç. Dr. Mehmet OZANSOY	
Üye	Öğr. Gör. Taha KELEŞTEMUR	
Üye	Vet. Hek. Ekrem Musa ÖZDEMİR	
Üye	Özge Şeyda DURGUT	
Üye	Fahriye ŞENBAHÇE	

ETİK KURUL ONAYI (DEVAM)



MEDİPOL UNV İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ

T.C.
İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanlığı

E-İmzalıdır

Sayı : 38828770-604.01.01-E.14927
Konu : Etik Kurulu Hk.

22/06/2017

Sayın Prof. Dr. Gürkan ÖZTÜRK

Üniversitemiz Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu 12/12/2016 tarihli 79 karar no ile onay verilen "Endojen Opioidlerin Nöronal Hasara Tepkisi" başlıklı bilimsel araştırmanın" başlığının "Endojen Opioid Reseptörlerin Dinamiğinin Araştırılması" şeklinde değiştirilmesi isteğiniz uygun bulunmuş olup kayıt altına alınmıştır.

Bilgilerinize rica ederim.

Prof. Dr. Hanefi ÖZBEK
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu
(İMÜ-HADYEK) Başkanı

Bu belge 5070 sayılı e-Imza Kanununa gore Prof. Dr. Hanefi OZBEK tarafından 22.06.2017 tarihinde e-imzalanmıştır.
Evrağınızı https://ebys.medipol.edu.tr/e-imza linkinden 81162DF5XF kodu ile dogrulayabilirsiniz.

İstanbul Medipol Üniversitesi
Kavacık Mah. Ekinciler Cad.No:19 Kavacık Kavşağı 34810
Beykoz/İSTANBUL

Tel: 444 85 44
İnternet: www.medipol.edu.tr
Ayrıntılı Bilgi İçin : bilgi@medipol.edu.tr

11. ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Gülsena	**Soyadı**	Baydaş
Doğum Yeri	Malatya	**Doğum Tarihi**	08.06.1990
Uyruğu	T.C.	**TC Kimlik No**	20198452214
E-mail	gulsena.gunduz@gmail.com	**Tel**	531-253-62-00

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	**Mezuniyet Yılı**
Doktora/Uzmanlık		
Yüksek Lisans		
Lisans	İhsan Doğramacı Bilkent Üniversitesi/Fen Fakültesi/Moleküler Biyoloji Ve Genetik	2015
Lise	Özel Turgut Özal Lisesi (Y.D.A)	2007

İş Deneyimi

Görevi	**Kurum**	**Süre (Yıl – Yıl)**
Biyolog	Medipol Üniversitesi - REMER	2015 – 2016
Araştırma Görevlisi	Medipol Üniversitesi- Fizyoloji Anabilim Dalı	2016-

Yabancı Dilleri	**Okuduğunu Anlama**	**Konuşma**	**Yazma**
İngilizce	Çok İyi	İyi	İyi
İspanyolca	Başlangıç	Başlangıç	Başlangıç
İtalyanca	Başlangıç	Başlangıç	Başlangıç

	Sayısal	Eşit ağırlık	Sözel
ALES Puanı	77,74	76,67	63,21
YDS Puanı	68,75		

Bilgisayar Bilgisi

Program	**Kullanma Becerisi**
Microsoft Office Programları	Çok iyi
Java, MatLab, SPSS	İyi

Sertifikalar

İstanbul Medipol Üniversitesi	Deney Hayvanları Kullanım Sertifikası	2015