

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

Tez Yöneticisi
Prof. Dr. Ç. Hakan KARADAĞ

**FARELERDE KRONİK WIN 55,212-2 KULLANIMININ
BAĞLAMSAL KORKU KOŞULLANMA TESTİNDE
OLUŞTURDUĞU DEĞİŞİKLİK ÜZERİNE NOSİSEPTİN
RESEPTÖR ANTAGONİSTİ JTC-801'İN ETKİSİ**

(Yüksek Lisans Tezi)

Sinem YILMAZ

EDİRNE –2018

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

Tez Yöneticisi
Prof. Dr. Ç. Hakan KARADAĞ

**FARELERDE KRONİK WIN 55,212-2 KULLANIMININ
BAĞLAMSAL KORKU KOŞULLANMA TESTİNDE
OLUŞTURDUĞU DEĞİŞİKLİK ÜZERİNE NOSİSEPTİN
RESEPTÖR ANTAGONİSTİ JTC-801'İN ETKİSİ**

(Yüksek Lisans Tezi)

Sinem YILMAZ

Destekleyen Kurum: TÜBAP 2016/69

Tez no:

EDİRNE –2018

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimimde ve tez çalışmalarımnda değerli katkıları olan danışman hocalarım Prof. Dr. Ç. Hakan KARADAĞ ve Dr Öğr. Üyesi Ruhan Deniz TOPUZ'a; ayrıca Prof. Dr. Ahmet ULUGÖL'e, Prof. Dr. Dikmen DÖKMECİ'ye, Doç. Dr. Özgür GÜNDÜZ'e ve bu çalışmada benden yardımlarını esirgemeyen Öğr. Gör. Kübra DUVAN AYDEMİR'e, Zeynep ÇETİN'e, Gökberk YILDIRIM'a daima beni destekleyen aileme ve desteklerinden dolayı TÜBAP'a teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

GİRİŞ VE AMAÇ	1
GENEL BİLGİLER	2
ÖĞRENME VE BELLEK	2
KORKU KOŞULLANMA	5
KANNABİNOİDLER	9
OPIOİDLER	13
KANNABİNOİD VE OPIOİD SİSTEMLER ARASINDAKİ İLİŞKİ	16
GEREÇ VE YÖNTEMLER	19
BULGULAR	26
TARTIŞMA	32
SONUÇLAR	39
ÖZET	40
SUMMARY	41
KAYNAKLAR	43
ŞEKİLLER LİSTESİ	55
ÖZGEÇMİŞ	56
EKLER	

SİMGE VE KISALTMALAR

AEA	: Anandamid
2-AG	: 2-araşidonil gliserol
BLA	: Bazolateral amigdala
CB₁	: Kannabinoid Reseptörü-1
CB₂	: Kannabinoid Reseptörü-2
CA	: <i>Cornu Ammonis</i>
cAMP	: Siklik adenzin monofosfat
CE	: Amigdala'nın santral nükleusu
GABA	: Gama aminobütirik asit
Gi	: İnhibitör G protein
GPR	: G protein kenetli reseptör
i.p.	: İntraperitoneal
LA	: Amigdala'nın lateral nükleusu
NAc	: Nükleus akkübens
N/OFQ	: Nosiseptin/orfanin FQ
NOP	: Nosiseptin/orfanin FQ reseptörü
SF	: Serum fizyolojik
Δ⁹-THC	: Δ ⁹ -tetrahidrokannabinol

GİRİŞ VE AMAÇ

Kannabis bitkisinin (Hint keneviri) medikal kullanımı çok eski yıllara dayanmaktadır. Ağrı, iştah kontrolü, motor fonksiyon ve immün yanıtın düzenlenmesi gibi pek çok fizyolojik süreçte rol oynayan kannabinoidlerin psikoaktif yan etkileri medikal kullanımlarını kısıtlamaktadır. Kannabinoidlerin istenmeyen yan etkilerinden biri de bilişsel fonksiyonlarda bozukluk oluşturmalarıdır (1,2).

Nosiseptin/orfanin FQ reseptörü (NOP) ve endojen ligandı opioid ailesinin en son keşfedilen üyeleridir. NOP klasik opioid reseptörlerle yaygın yapısal benzerlik göstermesine rağmen, selektif opioid agonist ve antagonistlerine düşük afinite göstermektedir (3).

Opioidler ve kannabinoidler benzer farmakolojik etki profiline sahiptirler. Her iki reseptör de inhibitör G proteinleri (Gi) ile kenetlidir ve benzer sinyal transdüksiyon özelliklerine sahiptir. Presinaptik uçta yerleşim gösteren her iki reseptör tipinin aktivasyonu sonucunda adenilat siklaz inhibe olur, voltaj kapılı kalsiyum kanalları bloke edilir ve potasyum kanalları aktive olur. Bu etkilerin sonucunda sinaptik aralığa nörotransmitter salıverilmesinin inhibe edilmesinin yanında postsinaptik uçta da hiperpolarizasyon oluşur ve hücrel inhibisyon meydana gelir (4-6).

Opioid ve kannabinoidlerin benzer özelliklerine dayanarak, bu iki ilaç grubunu inceleyen pek çok çalışma yapılmıştır. Yapılan çalışmalar opioid ve kannabinoid reseptörlerinin öğrenme ve bellek süreçlerinde rol oynayan hipokampus, amigdala ve korteks gibi beyin bölgelerinde ortak lokalizasyona sahip olduklarını göstermiştir (7,8).

Bu bilgilerden yola çıkarak biz de çalışmamızda, kannabinoid reseptör agonisti WIN 55,212-2'nin kronik kullanımının bağlamsal korku koşullanma testinde oluşturduğu değişiklik üzerine nosiseptin reseptör antagonisti JTC-801'in etkisini değerlendirmeyi amaçladık.

GENEL BİLGİLER

ÖĞRENME ve BELLEK

Tanım

Öğrenme, çevresel bir uyarana bağlı olarak davranışsal cevap değişikliği edinilmesi olarak tanımlanmaktadır (9). Çevresel uyaranların değerlendirilerek, merkezi sinir sisteminin bu uyaranlara karşı verdiği en güçlü ve en uygun davranışların geliştirilmesi sürecidir (10). Uyaranlara karşı verilen cevap değil; bu cevaptaki değişiklik olduğu karıştırılmamalıdır (9). Bellek ise, öğrenilmiş bilgi deposu olarak düşünülebilir (9). Belleği, geçmişte yaşanmış olayları, öğrenilmiş bilgileri ve bunların geçmişle olan bağlantısını bilinçli olarak zihinde tutma ve geri çağırma becerisi olarak da tanımlamak mümkündür (2). Kısaca bellek, bilgiyi depolama ve yeniden kullanabilme yeteneğidir (11).

Bellek Tipleri

Öğrenme ve bellek çeşitli alt bileşenleri kapsayan kognitif fonksiyonlardır. Bu alt bileşenler belleğin edinilme mekanizması, içeriği ya da zamansal boyutlarına göre farklı şekillerde yapılandırılabilir (12). Ayrıca beyinde birbirinden farklı anatomik yapılar çeşitli bellek tiplerinin oluşmasında görev almaktadır (1).

Tüm bellek tipleri uzun ya da kısa süreli olabilmektedir. Örneğin tek bir tekrarla öğrenilen bir bilgi birkaç dakika bellekte kalabilirken, aynı bilginin tekrarlandığı zaman saatlerden günlere kadar değişen periyotlarda saklanması mümkün olabilir (1).

Kısa süreli bellek: Bilişselliğin ana ögesi olan bu bellek tipi, bilginin çok kısa bir süreliğine (saniyeler) sürdürülmesi olarak tanımlanmaktadır (12). Belleğin en hızlı ve erken

basamaklarından biri olup, geçici duyusal ve algısal uyaranların işlenmesiyle ilgilidir. Kısa süreli bellek hem henüz öğrenilmiş bilginin hem de uzun süreli bellekten henüz geri çağırılmış bilginin işlenmesini sağlamaktadır.

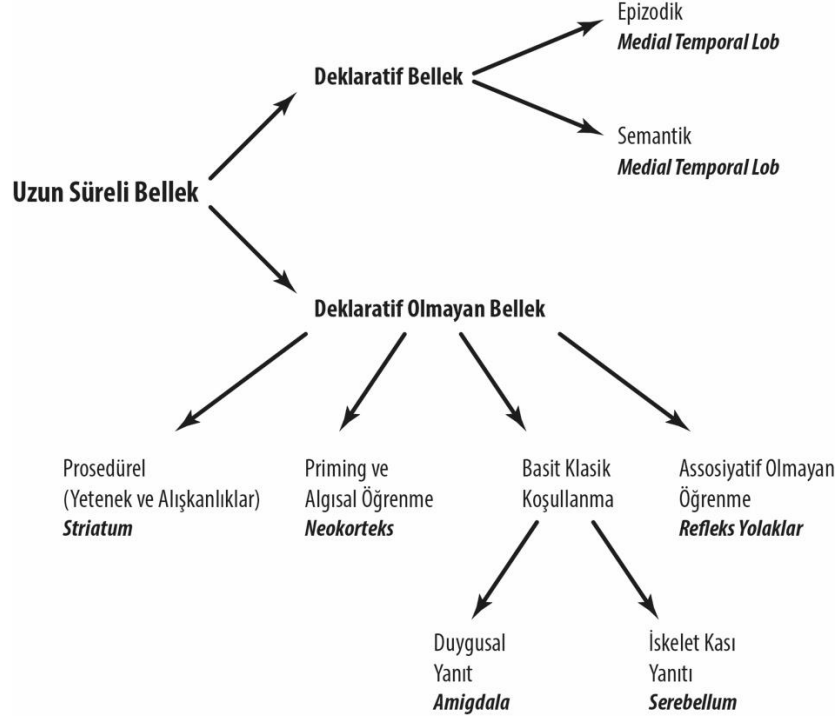
Kısa süreli bellek birbirinden farklı fonksiyonlara sahip olan duyusal bellek, kısa dönem depolama ve işler bellek olarak adlandırılan üç temel bileşenden oluşmaktadır (9).

Kısa süreli belleğin ilk aşaması taze edinilmiş bilgiden (örneğin henüz karşılaştığımız bir kişinin yüzü) oluşmaktadır. Duyusal girdi (dokunma, koklama, duyma, hissetme, görme) kısa süreli belleğin ilk aşamasını geçerek bellekteki yolculuğuna başlamaktadır. Bu ilk aşama, yani duyusal bilgi deposunun geçici basamağı, duyusal bellek ya da duyusal kayıt olarak adlandırılmaktadır (9). Kısa dönem depolama ise bilginin işlenmesi ve bilince ulaşmasından sonra kısa süreli sistemde bekletilmesini içermektedir (9,13). Bilginin işlenmesi süreci yeni bir duyusal girdinin işlenmesi ya da daha önceden depolanmış belleğin geri çağırma sırasındaki işlenmesi olabilir. Dolayısıyla kısa dönem depolama hem yeni hem de eski bilgi üzerinde çalışmaktadır (1).

Herhangi bir bilgiyi, kısa dönem depolamada o bilgiyle ilgili hiçbir şey yapmadan tutmak mümkündür. Bununla birlikte eğer bilgi bir şekilde işlenirse, işler bellekte tutulmakta olduğu söylenir (9). İşler bellek, bilginin kullanılırken kısa süreliğine tutulduğu bellek sistemi olarak tanımlanmaktadır (9,13). İşler bellek sınırlı miktarda bilginin sınırlı bir süre için (saniyeler) aktif olarak sürdürülme kapasitesidir (14,15). Prefrontal korteks bu bellek tipine hizmet eden beyindeki en önemli anatomik yapıdır (9).

Uzun süreli bellek: Uzun süreli bellek edinilen belleğin sabit hale gelmesi, zaman geçtikçe güçlenmesi ve etkileşimlere dirençli hale gelmesi olarak tanımlanmaktadır. (12,16) Başarılı bir uzun dönem depolama, sırasıyla bilginin kodlanması, kısa dönem depolanması, kısa süreli bellekten uzun süreli belleğe aktarılması ve bilginin geri çağırılıp kullanılması gibi aşamaları içermektedir (12).

Uzun süreli bellek deklaratif (bildirimsel, eksplisit) ve deklaratif olmayan (bildirimsel-olmayan, implisit) tip olmak üzere ikiye ayrılmaktadır (15). Deklaratif bellek bir şeyi bilmek; deklaratif olmayan bellek ise bir şeyin nasıl yapıldığını bilmek yani yöntemsel bilgi olarak tanımlanmaktadır (13). 1982 yılında Squire deklaratif belleği epizodik (geçmişteki bir olayı hatırlama) ve semantik (genel bilgi) olarak kategorize etmiştir (17). 1992 yılında ise Squire deklaratif olmayan belleğe, klasik koşullanma, alışkanlıklar ve *priming* gibi farklı alt başlıklar getirmiştir (Şekil 1) (15,18). Deklaratif ve deklaratif olmayan bellek arasındaki ayırım farklı nöral yapılarla olan ilişkilerinden kaynaklanmaktadır (12,19).



Şekil 1. Uzun süreli bellek sınıflandırılması ve ilgili beyin yapıları (15)

Deklaratif bellek: Belirli olayların hızla öğrenilmesine ve hatırlanan bilgilerin karşılaştırılmasına olanak sağlamaktadır (15). Bilinçli olarak hatırlama durumunu ifade etmektedir (20). Hipokampus ve parahipokampal girusun çoğunluğunu oluşturan medial temporal lobdaki entorinal, peririnal ve parahipokampal korteksler deklaratif bellekle ilgili işleymen sorumlu en önemli yapılardır (13,15). Semantik ve epizodik bellek olmak üzere iki farklı tipi bulunmaktadır. Semantik bellek öğrenme ile ilgilidir; genel gerçekler ve kelime bilgisinden oluşmaktadır. Bağlamdan ve kişisel alakadan bağımsızdır. Herhangi bir ülkenin başkentini bilmek örnek olarak verilebilir. Epizodik bellek ise deneyimleme ile ilgilidir; yaşamın kesitlerinden, otobiyografik olaylardan oluşmaktadır. Bağlamsaldır ve zaman, mekân gibi spesifik bilgilerden oluşmaktadır. Geçmişteki tatil deneyimini hatırlamak örnek olarak verilebilir (12).

Deklaratif olmayan bellek: Bilinç gerektirmeden yapılan becerilerin tamamı olarak ifade edilmektedir. Hatırlamaktan ziyade performans olarak tanımlanmaktadır (15). Bu bellek tipinde kişi belleği kullandığının farkında değildir (20). Bisiklete binmek, bir müzik aleti çalmak örnek olarak verilebilir. Serebellum, neokorteks, striatum ve limbik yapılar bu bellek tipiyle ilişkilendirilmektedir (12). Başlangıçta sadece motor ve algısal beceriler için bu ifade

kullanılmış olsa da ilerleyen zamanlarda yapılan çalışmalarda pek çok alt bileşenden oluştuğu gösterilmiştir (15).

Priming (hazırlama, başlatma) deklaratif olmayan belleğin son zamanlarda çalışılan bileşenlerinden biridir. Daha önce aynı ya da ilgili uyararla karşılaşmış olmanın, bir uyarının tanınması ve sınıflandırılmasında gelişme ya da değişiklik sağlaması olarak tanımlanmaktadır. (21).

KORKU KOŞULLANMA

Tanım

Korku, gerçek tehdit durumları ya da potansiyel tehdit olması beklenen durumlar ile tetiklenen hem asosiyatif (bağlantılı) hem de asosiyatif-olmayan (bağlantılı-olmayan) bileşenlerden oluşan bilinçli bir eylem olarak tanımlanmaktadır (22-25).

Anksiyete ve stres korku ile ilişkili durumlardır. Bunları hafifletmek için kullanılan ilaçların prelinik çalışmaları korku koşullanma deneylerinde test edilmektedir. Korku, anksiyeteyi getirir ve strese sebep olur; fakat bu ikisinden de farklıdır. Korku belleğini oluşturan temel iki faktör tehdit ve ona karşı verilen reaksiyon olarak sıralanabilir (23).

Kemirgenlerde yapılan deneylerde korku ve anksiyetenin beyinde motivasyonel savunma mekanizması ile ilgili alanda savunma davranışını ve duyuşal sistemlere geri bildirim yapmayı organize ettiği gösterilmiştir. Bu sistem organizmanın hayatta kalmasını sağlayacak şekilde uyarlanmıştır (22).

Stres, korkunun öğrenilmesini, bazolateral amigdalanın eşlik ettiği bir süreçle artırmaktadır; bu süreçte hipokampal plastisite ve dendritik büyümenin modüle edildiği gösterilmiştir. Tekrarlanan stres beyinde β -adrenoreseptörlerin aracılık ettiği bir mekanizma ile korkunun öğrenilmesini sağlamaktadır. Kronik korku maruziyeti akut korku öğrenimini artırır ve bu durum anksiyete bozukluklarının artmasıyla korelasyon göstermektedir (23).

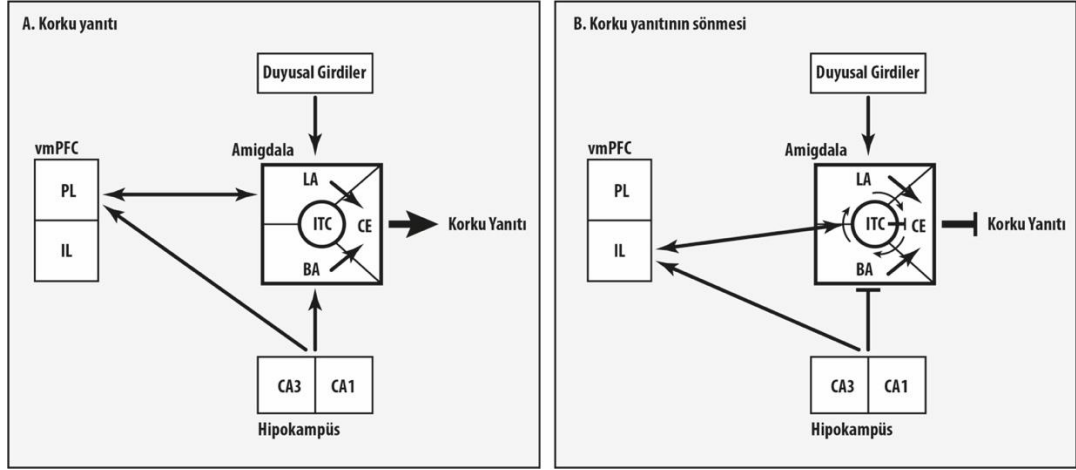
Sürekliliği ile karakterize olan korku belleği travmatik olaylar sonucunda hızla oluşmakta ve organizmanın hayatı boyunca sağlamlığını korumaktadır (26). Korku daha güçlü, daha detaylı ve daha uzun süreli bellek oluşumuna olanak sağlamaktadır (23).

Korku öğrenme ve bellek çalışmalarında Pavlov'un korku koşullanma modeli kullanılmaktadır. Bu modelde başlangıçta tehdit oluşturmayan ses ya da çevresel ipuçları gibi duyuşal uyarılar (koşullandırıcı uyarı), kendisine eşlik eden caydırıcı bir uyarı ile birlikte verildiğinde doğal olarak savunma cevabı oluşturmaktadır. Bu uyarıların tekrarlanması sonucunda da koşullandırıcı uyarı ile ilişkili sabit bir korku belleği oluşmaktadır. Daha sonra

koşullandırıcı uyarının tek başına uygulanması, daha önce koşullandırıcı ve caydırıcı uyarının birlikte uygulanmasıyla oluşan bellek sayesinde organizmanın savunma davranışı göstermesini tetiklemektedir. Kemirgenlerde bu savunma davranışı donma (hareketsiz kalma) şeklinde olmaktadır. Koşullanmanın ses ile sağlandığı ipuçlu ve çevresel emarelerle sağlandığı bağlamsal korku koşullanma olmak üzere iki tip test bulunmaktadır. İpuçlu korku koşullanma bazolateral amigdala ile, bağlamsal korku koşullanma ise hipokampus ile ilişkilendirilmektedir (26-28).

Korku koşullanmada beyindeki farklı bölgelerin görev almasına karşın, amigdala işitsel korku koşullanmada ana kontrol merkezi olarak görev yapmaktadır (29). Korku koşullanması için koşullu ve koşulsuz uyarının amigdalada çakışması gerekmektedir (30). Korku öğrenme ile ilgili birincil ara yüzü bazolateral amigdala (BLA) ikincil ara yüzü de santral nükleus (CE) oluşturmaktadır (31). Prelimbik korteksten ve talamik çekirdeklerden gelen duyuşal girdiler amigdalanın lateral nükleusunda (LA) özellikle dorsal subnükleusta eşzamanlı olarak çakışmakta ve lateral nükleusta sinaptik plastisiteye yol açmaktadır (29-31). Aynı zamanda santral nükleus ve işitsel talamusta da sinaptik plastisite meydana gelmektedir. LA, CE ile doğrudan ya da dolaylı olarak bağlantılar kurmaktadır (30). Duyuşal bilgi BLA tarafından entegre edildikten sonra CE'ye iletilir. CE amigdalanın ikinci arayüzü olarak görev yapar ve korku yanıtlarını çeşitli projeksiyonlarla dağıtır; otonomik yanıtları oluşturması için hipotalamik ve beyin sapı çekirdeklerine giden projeksiyonlar bunlar arasında sayılabilir. BLA ve CE arasındaki etkileşimlere BLA'ya bitişik bulunan GABAerjik ara nöron kümeleri (interkalat hücreleri) (ITC) aracılık etmektedir (31). Santral nükleus, ventromedial prefrontal korteksin infralimbik ve prelimbik yapıları ile bağlantılar kurmaktadır. Prelimbik bağlantılar korku öğrenmenin kazanımı ve konsolidasyonunda; infralimbik bağlantılar da korku öğrenmenin yok olmasında görev yapmaktadır (Şekil 2) (23,32,33).

Korku belleğinin kodlanmasında görev yapan bir diğer önemli yapı da hipokampüstür. Hipokampüste CA1 piramidal hücrelerinin apikal dendritlerine bilgi CA3 aksonlarının Schaffer kollateralleri ile aktarılmaktadır. CA3 hücreleri de dentat girusun granül hücreleri tarafından aktive edilmektedir (23). Hipokampus ve amigdala arasındaki iletişim ventroangular yolak ve entorinal korteks aracılığıyla sağlanmaktadır (23). Korku edinimi sırasında hipokampüsten (özellikle CA1 bölgesinden) gelen projeksiyonlar BLA'ya çevre hakkında bağlamsal bilgi sağlamaktadır. Hipokampus ve BLA arasındaki bağlamsal bilgi entegrasyonu CE aktivitesinin ve ondan sonraki yanıtların oluşturulmasında majör etkiye sahiptir (31).



BA, amigdalanın bazal nükleusu; CE, amigdalanın santral nükleusu; ITC, IL, infralimbik korteks; amigdalanın interkalat hücreleri; LA, amigdalanın lateral nükleusu; PL, prelimbik korteks; vmPFC, ventromedial prefrontal korteks.

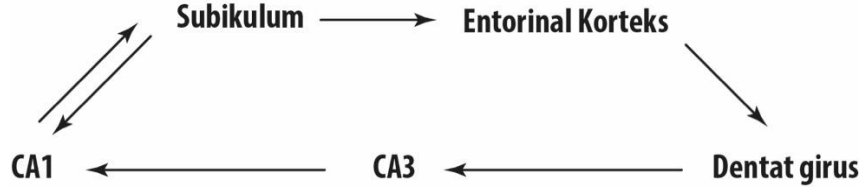
Şekil 2. Korku yanıtının oluşması (A) ve sönmesinde (B) rol oynayan yapıların basitleştirilmiş şeması (31).

Hipotalamus korkuya verilen sempatik cevabın yönetilmesini sağlamaktadır (23). CE doğrudan ya da dolaylı yollarla hipotalamik paraventriküler nükleusun ve lateral hipotalamusun aktivitesini düzenlemektedir (30,34). Bu yolla korkuya verilen fizyolojik cevabın oluşmasında kilit rol oynayan nöropeptidlerin (adrenokortikotropik hormon, vazopressin, oksitosin gibi) sentez ve salıverilmeleri ile otonomik cevabın (hipertansiyon piki, midriyazis) düzenlenmesini sağlamaktadır (23,34,35). Korku cevabında motor aktivitenin oluşturulmasından (donma) orta beyindeki periakvaduktal gri alan sorumludur (23,30,35).

Amigdala

Memelilerde korku koşullanma devresinin temel nöroanatomik yapısını amigdala oluşturmaktadır. Amigdala Yunanca badem anlamına gelmektedir. Medial temporal lobda yer alan bu yapının şekli bademe benzemektedir. Korku koşullanmanın yanı sıra insanlarda genel olarak duygusal davranışların yönetilmesinden de sorumludur. Temporal lob hasarı olan hastalarda korku koşullanmalı bellek oluşumunda eksiklik olduğu tespit edilmiştir (36).

Amigdala, görsel, somatosensör ve işitsel korteksler ile duygusal bilgiyi işleyen talamik nükleustan gelen bilgiyi almaktadır. Alınan bilgiler santral sinir sisteminin hipotalamik ve subkortikal alanlarına yönlendirilmektedir. Bu yapılar da korkunun vasküler, motor ve hormonal yanıtlarının gösterilmesini sağlamaktadır (36).



Şekil 3. Trisinaptik devre

Amigdala, lateral nükleus (LA), bazolateral nükleus (BLA) ve santral nükleus (CE) olmak üzere üç alt birimden oluşmaktadır (36). CE de lateral (CEl), medial (CEm), kapsüler (CEc) ve orta (*intermediate*) (CEi) olarak dört kısma ayrılmaktadır (34). LA, CE ile direk etkileşim kurarken; BLA ile CE arasındaki iletişim ITC'ler ile sağlanmaktadır (34). Duyusal bilgiler amigdalaya LA alanından giriş yaptıktan sonra işlenmekte ve gerekli cevabın oluşturulması için ilgili alanlara yönlendirilmek üzere CE alanından çıkış yapmaktadır (34,36).

Hipokampüs

Eski adı *Cornu Ammonis* (CA) olan hipokampüs Yunanca deniz atı anlamına gelmektedir. Anatomik yapısının deniz atına benzemesi sebebiyle bu şekilde isimlendirilmiştir (37). Hipokampüs CA1, CA2, CA3 ve CA4 olmak üzere dört alandan oluşmaktadır. CA1 ve CA3 yapıcı en büyük alanlardır. CA alanlarının temel nöronları hücre gövdelerinin yapısı sebebiyle piramidal nöronlar olarak adlandırılmaktadır. Bu nöronlar hipokampal formasyondaki CA alanlarının %90'ını oluşturmaktadır (37). Hipokampüste bahsi geçen dört alan dışında bulunan bir diğer yapı da dentat girus'tur (DG). Bu fonksiyonel yapı bilginin işlenmesi ve belleğin oluşmasında önemli rol oynamaktadır (37).

Hipokampüse bilginin temel giriş noktaları dentat girus ve CA3 nöronları; temel çıkış noktası da CA1 nöronlarıdır (38). Çıkış nöronları, glutamaterjik aksonlara sahiptir (37). Bilgi dorsal CA1'den subikulum ve entorinal kortekse; ventral CA1'den de medial prefrontal korteks, nükleus akkübens (NAc) ve amigdalaya aktarılmaktadır (38).

Dentat girus, CA3 ve CA1 arasındaki iletişim trisinaptik devre ile sağlanmaktadır (Şekil 3) (39,40). Bilgi entorinal korteksten medial ve lateral yolaklarla DG'ye oradan da *mossy* lifleri ile CA3 alanına gelmektedir. CA3'ten de Schaffer kollateralleri ile CA1 alanına oradan da subikuluma ve tekrar entorinal kortekse dönmektedir (40).

Hipokampüs ve prefrontal korteks karşılıklı olarak iletişim halinde bulunmaktadır. Prefrontal korteks duyusal, motor ve limbik entegrasyon sisteminin bir parçasıdır. Bilgi prefrontal korteksten entorinal, peririnal ve parahipokampal kortekslere geçtikten sonra

hipokampüse aktarılmaktadır. Daha sonra hipokampus tekrar entorinal ve peririnal korteksler aracılığıyla ya da doğrudan prefrontal kortekse geri bildirim sağlamaktadır. Bu döngü bilişsel fonksiyonların gerçekleşmesinde önemli rol oynamaktadır.

Hipokampus serotonerjik, dopaminerjik, kolinerjik ve noradrenerjik nöronlardan bilgi almasının yanı sıra yapısında da *reelin*, BDNF (*brain derived neurotrophic factor*), NGF (*nerve growth factor*) gibi peptid nöromodülatörler ile GABAerjik internöronlar bulundurmaktadır (37).

KANNABİNOİDLER

Kannabis Bitkisi

Kannabis bitkisi (Hint keneviri) *Cannabaceae* familyasına ait, çeşitli yüksekliklerde yaşayabilen, çoğunlukla ılıman ve tropikal iklimlerde yetişen bir bitkidir (1). Bitkinin yiyecek ve tekstil lifi kaynağı olarak kullanımı beş bin yıl öncesine dayanırken; medikal kullanımına dair ilk kayıtlara ise MÖ iki binli yıllarda rastlanmaktadır (41,42). Tekstilde kullanılmak amacıyla Orta Asya ve Mısır'da tarımı yapılan bitki daha sonra Avrupa ve Kuzey Amerika'da da yetiştirilmeye başlanmış; ancak daha sonra Amerika'da çeşitli yasalarla bitkinin tarımı yasaklanmıştır (42).

İçeriğinde beş yüzden fazla kimyasal bileşen bulunan bitkiden günümüze kadar en az 104 tane kannabinoid izole edilmiştir. Bitki tarafından üretilen ve 21. karbon atomunda oksijen içeren aromatik hidrokarbon yapısındaki bileşiklerin tamamına kannabinoid ismi verilirken şimdilerde bu terim doğal ve sentetik bileşenlerin tamamı için kullanılmakta olup, bitkiden izole edilen yapılar için fitokannabinoid ismi kullanılmaktadır (1,4,42).

Fitokannabinoidler

Kannabis bitkisi yapısında çok fazla sayıda kannabinoid içermektedir (43,44). Bu bileşenler etkilerini hücre membranında bulunan kannabinoid reseptörlerine bağlanarak göstermektedir (43). Bunlardan bitkinin reçine ve çiçeklerinin temel psikoaktif bileşeni olan Δ^9 -tetrahidrokannabinol'ün (Δ^9 -THC) yapısı 1964 yılında Gaoni ve Mechoulam tarafından aydınlatılmıştır (45). Bitki toplamda on bir farklı yapıda kannabinoid içermektedir (Tablo 1) (1,42).

Tablo 1. Kannabis bitkisinin içeriğindeki bileşiklerin sınıflandırılması (1,42)

Kimyasal Sınıf	Bileşik Sayısı
Δ^9 -tetrahidrokannabinol (Δ^9 -THC)	18
Δ^8 - tetrahidrokannabinol (Δ^8 -THC)	2
Kannabigerol (CBG)	17
Kannabikromen (CBC)	8
Kannabidiol (CBD)	8
Kannabinodial (CBND)	2
Kannabielsoin (CBE)	5
Kannabisiklol (CBL)	3
Kannabinol (CBN)	10
Kannabitriol (CBT)	9
Sınıflandırılmayanlar	22
<i>Toplam kannabinoid</i>	<i>104</i>
<i>Toplam kannabinoid olmayan bileşikler</i>	<i>441</i>
Toplam bileşik sayısı	545

Kannabis bitkisi ağrı, glokom, bulantı, depresyon ve nevrالجinin tedavisinde kullanılmıştır (42). Son yıllarda da antioksidan, nöroprotektif ve antiinflamatuvar etkilerinden dolayı bitkiye olan ilgi artmakla birlikte psikotropik etkilerinin olması kullanımını kısıtlamaktadır (46). Ayrıca fitokannabinoidlerin multipl skleroz tedavisi ile HIV/AIDS semptomlarının yönetilmesinde de terapötik değeri olduğu kanıtlanmıştır (42,47,48).

Endojen Kannabinoid Sistem

Endokannabinoid sistem iki klasik kannabinoid reseptörü, bu reseptörlerin çeşitli ligandları (endokannabinoidler), bu ligandların sentez ve metabolizmasından sorumlu enzimler ile taşınması ve geri alınmasından sorumlu yapılardan oluşmaktadır (2,49-51).

Kannabinoid reseptörlerinin keşfinin ardından bu reseptörleri aktive eden endojen ligandları bulmayı hedefleyen çalışmaların sonucunda 1992 yılında ilk endojen ligand **N-araşidonil etanolamin (anandamid, AEA)** ve 1995 yılında da diğer bir endojen ligand **2-araşidonil gliserol (2-AG)** rapor edilmiştir (52,53). Her iki yapı da araşidonik asit türevlerinden oluşmaktadır (43,44). 2-araşidonil-gliseril ester (noladin, 2-AGE), O-araşidonil etanolamin (virodamin, OAE) ve N-araşidonil dopamin (NADA) araşidonik asit türevi diğer endojen ligandlardır (4).

Endojen kannabinoidler membran fosfolipidlerinin hidroliziyle oluşmaktadırlar (43,44,54). Anandamid; N-araşidonil fosfotidil etanolaminden (NAPE) NAPE fosfolipaz D enzimi aracılığıyla sentez edilmektedir (44,54). 2-AG de fosfolipaz C ve diaçil gliserol lipaz

alfa ve beta enzimleri aracılığıyla membran fosfolipidlerinden üretilmektedir (44). Postsinaptik hücrede sentezlenmelerinin hemen ardından pasif difüzyon aracılığıyla ekstraselüler aralığa salıverilmekte ve retrograd mesajcı olarak görev yapmaktadırlar (44,54,55). Endokannabinoidler veziküllerde depolanmazlar ve kısa yarılanma ömrüne sahiptirler (54,55). Yağ asidi amid hidrolaz enzimi postsinaptik nöronda AEA'nın metabolizmasından sorumluyken; monoasitgliserol lipaz enzimi de presinaptik nöronda 2-AG'yi metabolize etmektedir (2,54,56)

Endokannabinoidler ve reseptörleri iştah kontrolü, ağrının algılanması, motor fonksiyon ve immün yanıtın düzenlenmesi gibi pek çok fizyolojik sürecin kontrolünden sorumludurlar (2,44).

Kannabinoid Reseptörleri

Kannabis bitkisinin temel psikoaktif bileşeni olan Δ^9 -THC'nin sentetik analoglarının geliştirilmesi, kannabinoid reseptörlerinin karakterizasyonu ve klonlanmasında büyük rol oynamıştır (4). İki temel kannabinoid reseptöründen CB₁ 1990 yılında klonlanırken; CB₂ de 1993 yılında klonlanmıştır (57,58). Bunlara ek olarak GPR55, GPR18, GPR119, GPR3, GPR6, GPR12 gibi G protein kenetli reseptörler ile GPR'lerin dışında TRPV₁ (*transient receptor potential vanilloid 1*), TRPV₂, PPAR (peroksizom proliferatörü ile aktive edilen reseptör) ve ligand kapılı iyon kanalları (sodyum, potasyum, kalsiyum kanalları) gibi reseptör çeşitleri kannabinoidlerin etkilerine aracılık etmektedir (51,59).

Kannabinoid reseptörleri, G-protein kenetli reseptör ailesi üyesidirler (4,44,60,61). Her iki reseptör de inhibitör G protein (Gi) ile kenetlidir (4,44,61). Reseptörlerin aktive olması adenilat siklazı inhibe ederek ikincil mesajcı cAMP'nin oluşumunu azaltırken; mitojenle aktive olan protein kinaz yolağını da modüle etmektedir. CB₁ reseptörü aynı zamanda presinaptik nöronda N ve P/Q tipi kalsiyum kanallarını inhibe ederek nörotransmitter salıverilmesini; postsinaptik nöronda da potasyum kanallarını aktive ederek dışarı potasyum atılımını sağlayarak hücrel hiperpolarizasyon sebep olmakta ve nöronal uyarılabilirliği azaltmaktadır (4,44,60). Kannabinoid reseptörlerinin aracılık ettiği sinyal iletim mekanizmaları Tablo 2'de gösterilmiştir. CB₁ reseptörü çoğunlukla presinaptik nöron terminalinde bulunmaktadır. Glutamat, GABA, asetilkolin, noradrenalin, dopamin, serotonin, kolesistokinin gibi inhibitör ve eksitatör nörotransmitter salıverilmesini modüle etmektedir (62).

Tablo 2. Kannabinoid reseptörlerinin sinyal iletim mekanizmaları

Sinyal iletim mekanizması	Reseptör
Gi protein aktivasyonu	CB ₁ /CB ₂
Adenilat siklaz inhibisyonu	CB ₁ /CB ₂
Kalsiyum kanal blokajı	CB ₁
Potasyum kanal aktivasyonu	CB ₁
MAPK aktivasyonu	CB ₁ /CB ₂

MAPK: Mitojenle aktive olan protein kinaz.

Kannabinoid reseptörleri hem santral sinir sisteminde hem de periferde dağılım göstermektedir (43). CB₁ reseptörü santral sinir sisteminde prefrontal korteks, amigdala, NAc, striatum, hipotalamus ve serebellumda yoğun olarak bulunmaktadır (63,64). Dolayısıyla motor kontrol, ağrı süreçleri, bilişsel süreçler, duygusal cevaplar, motivasyonel davranışlar ve homeostazis ile ilgili pek çok fizyolojik fonksiyonun işleyişinde rol oynamaktadır. CB₂ reseptörü de periferde dalak, kalp, akciğer, prostat, uterus, pankreas, testis ve santral sinir sistemindeki mikroglyalar da dahil olmak üzere immün sistem hücrelerinde dağılım göstermektedir (4,60). Santral sinir sisteminde yoğun dağılım gösteren CB₁ reseptörünün aktive olmasıyla istenmeyen psikoaktif etkiler meydana gelirken; CB₂ reseptörü bu etkilere aracılık etmemektedir (65,66).

CB₁ ve CB₂ reseptör agonistleri: Fitokannabinoidler (Δ^9 -THC, kannabidiol, tetrahidrokannabivarin, kannabidivarin); endokannabinoidler (AEA, 2-AG, 2-AGE, OAE, NADA) ve sentetik analoglar (nabilon, BAY 38-7271, Org 28611, AZD 1940, N-hekzil- Δ^{6a} -THC, 1,2-dimetil-heptil-THC, levonantradol, nabitan, HU-210, AM2201) (61).

Farmakolojik ajan olarak kullanılan kannabinoid agonistleri: WIN 55,212-2, CP-55,940, AM1241, AM1710, metanadamid (61).

WIN 55,212-2: Aminoalkilindol türevi kannabinoidlerin prototipidir. CB₁ reseptörüne olan afinitesi CB₂ reseptörüne oranla daha fazladır. Düşük dozlarında lokomotor aktiviteyi artırırken; yüksek dozlarda doza bağımlı olarak lokomotor aktiviteyi baskılamaktadır. WIN 55,212-2 yüksek dozlarda güçlü antinosiseptif etkinliğe sahiptir ve vücut sıcaklığında azalmaya sebep olur. Farelerde yapılan deneylerde katalepsiye artırdığı gözlemlenmiştir (67).

CB₂ reseptör agonistleri: GW-842,166X, S-444,823, S-777469, [¹¹C]-NE40 (61).

CB₁ reseptör antagonistleri: Rimonabant, surinabant, otenabant, taranabant, ibipinabant, drinabant, [¹²³I]-AM281, [¹¹C]-OMAR, [¹¹C]-SD-5024, [¹⁸F]-MK-9470 (61).

OPIOİDLER

Tanım

Opioid, santral ve periferel sinir sistemi ile gastrointestinal sistemde yaygın dağılım gösteren opioid reseptörlere bağlanan endojen ve ekzojen ligandların tamamına verilen addır (5). Opioid agonistlerinin prototipi olan morfin, 1803 yılında Alman eczacı Friedrich Wilhelm Adam Sertürner tarafından ham opiyumdan izole edilmiştir. Opiyum, haşhaş bitkisinin (*Papaver somniferum* ve *P. album*) tohumunun kapsüllerinin çizilmesiyle elde edilir ve çok sayıda alkaloid içermektedir (68). Opioidler binlerce yıldır ağrının tedavisinde kullanılmaktadır (69). Güçlü analjezik etkilerinin yanı sıra, bulantı, kusma, kabızlık, tolerans gelişmesi ve bağımlılık gibi pek çok istenmeyen etkileri de bulunmaktadır (70).

Opioid Reseptörleri

1973 yılında radyoaktif işaretli ligand yöntemi ile santral sinir sisteminde spesifik opiyum bağlanma bölgelerinin (reseptör) varlığı gösterilmiştir. Bu reseptörlerin varlığı, insan vücudunda bu reseptörleri hedef alan bazı endojen opioid bileşenlerin olduğunu düşündürmüştür (71,72). 1975 yılında kobayların beyin kesitlerinde iki adet pentapeptidin (met-enkefalin ve lö-enkefalin) varlığı saptanmıştır. Aynı çalışmada bu peptid yapılı bileşenlerin kobayların ince barsağında asetilkolin salıverilmesini inhibe ettiği gösterilmiştir (73). Günümüze kadar da belirgin anatomik dağılım ve karakterizasyon gösteren üç endojen opioid ailesi tanımlanmıştır. Bunlar endorfinler, enkefalinler (met-enkefalin, lö-enkefalin) ve dinorfinler (dinorfin A, dinorfin B) olarak isimlendirilmiştir (74,75).

Opioidler etkilerini, hücre-yüzey reseptörlerinden en fazla bulunan G-protein kenetli reseptör ailesine üye spesifik reseptörler aracılığıyla göstermektedir (6,70). Bu reseptörler, ağrılı uyarana karşı üretilen ve opioid benzeri farmakolojik etkilere sahip endojen opioid peptidler, yarı-sentetik ve sentetik opioid ligandlar tarafından uyarılmaktadır (68-70).

Opioid reseptörleri Gi protein ile kenetli reseptörlerdir (5,76). Endojen ya da ekzojen ligandlarla reseptör aktivasyonu sonucunda adenilat siklaz inhibe olmakta, cAMP oluşumu ve gen transkripsiyon proteinlerinin sentezi ve/veya gen transkripsiyonu inhibe olmaktadır (5,69). Yine reseptör aktivasyonu sonucunda presinaptik uçta voltaj kapılı kalsiyum kanalları kapanır ve hücre içine kalsiyum girişi azaltılarak sinaptik aralığa nörotransmitter salıverilmesi inhibe edilmektedir (6). Postsinaptik uçta da potasyum kanalları açılarak hücre dışına potasyum çıkışının artması sonucunda hiperpolarizasyon oluşmakta ve hücrenin uyarılabilirliği azalmaktadır (6,68).

Opioid reseptörleri santral ve periferik sinir sisteminde ağrının düzenlenmesine aracılık eden yollar ile gastrointestinal ve ürogenital motilitenin düzenlenmesinden sorumlu enterik sinir sisteminde dağılım göstermektedir (6,75,77).

Opioid reseptörler ve endojen opioid peptidlerden oluşan opioid sistem ödül ve motivasyonda önemli bir rol oynamakta, duygusal yanıtları ve bilişsel fonksiyonları düzenlemektedir. Bu sistem aynı zamanda nosisepsiyonu, nöroendokrin fizyolojiyi ve otonomik fonksiyonları da düzenlemektedir (78,79).

Mü (μ), delta (δ), kappa (κ) ve nosiseptin/orfanin FQ reseptörü (NOP) olarak adlandırılan ve yaygın yapısal homoloji gösteren dört opioid reseptör alt tipi bulunmaktadır (5,6,80). Bunlardan nosiseptin/orfanin FQ reseptörü daha sonra ayrıntılı olarak anlatılacaktır.

Mü (μ) reseptörü: Beyin sapı ve talamusta yaygın dağılım göstermektedir. Supraspinal analjezi, solunum depresyonu, öfori, sedasyon, gastrointestinal motilitenin azalması ve fiziksel bağımlılık gibi etkilerden sorumludur. Mü₁ ve Mü₂ olmak üzere iki alt tipi bulunmaktadır (69).

Delta (δ) reseptörü: Beyinde yaygın dağılım göstermektedir (69). Spinal ve supraspinal analjezi, psikomimetik ve disforik etkilerden sorumludur (68,69).

Kappa (κ) reseptörü: Limbik ve diğer diensefalik alanlarda, beyin sapı ve omurilikte dağılım göstermektedir. Spinal analjezi, sedasyon, dispne, fiziksel bağımlılık, disfori ve solunum depresyonu gibi etkilerden sorumludur (69).

Opioid reseptörleri ile agonist ve antagonistleri Tablo 3'te gösterilmiştir.

Tablo 3. Opioid reseptörleri ve agonist/antagonistleri (69)

	Mü (μ)	Delta (δ)	Kappa (κ)
Endojen Peptidler			
Enkefalinler	Agonist	Agonist	
B-Endorfin	Agonist	Agonist	
Dinorfin A	Agonist		Agonist
Agonistler			
Morfin	Agonist		Zayıf Agonist
Kodein	Zayıf Agonist	Zayıf Agonist	
Fentanil	Agonist		
Meperidin	Agonist	Agonist	
Metadon	Agonist		
Antagonistler			
Nalokson	Antagonist	Zayıf Antagonist	Antagonist
Naltrekson	Antagonist	Zayıf Antagonist	Antagonist

Opioid Kategorileri

Opioidler kimyasal yapılarına göre, fenantrenler (morfin, kodein, hidromorfon, oksimorfon), benzomorfanlar (pentazosin), fenilpiperidinler (fentanil, alfentanil, sufentanil, meperidin) ve difenilheptanlar (propoksifen, metadon) olmak üzere dört şekilde sınıflandırılmaktadır. Tramadol standart opioid sınıflandırmasına katılmamaktadır. Etkisini serotonin geri alımını inhibe ederek göstermekte ve santral etkili analjezi sağlamaktadır (68,69).

Opioidler ayrıca etki şekillerine göre agonist, parsiyel agonist, karma agonist-antagonist ve antagonist olmak üzere dört farklı şekilde sınıflandırılmaktadır (69).

Opioid agonistler: Opioidlerin çoğu bu sınıftadır. Opioid reseptör duyarlılığındaki genetik farklılıklar ve değişik tipteki opioid reseptörlere afinite göstermeleri sebebiyle farklı etkiler ortaya çıkarmaktadırlar (69).

Opioid parsiyel agonistler: Buprenorfin bu sınıftadır. Mü reseptörüne yüksek afinite, ancak düşük etkinlik gösterir. Kappa reseptörünü antagonize etmektedir. Bu sayede hem analjezik etkili olarak hem de opioid bağımlılığında rehabilitasyon süreçlerinde kullanılmaktadır (69).

Karma agonist-antagonistler: Mü reseptör efikasiteleri zayıftır. Bu nedenle mü reseptörüne antagonist etki gösterirken, kappa reseptörü üzerine agonist etki göstermektedirler. Pentazosin bu gruba örnektir (69).

Opioid antagonistler: Nalokson ve naltrekson bu gruptadır. Opioid etkilerini tersine çevirmektedirler. Opioid zehirlenmelerinde kullanılmaktadırlar. Yoksunluk sendromuna sebep olabilmektedirler (68,69).

Nosiseptin/Orfanin FQ Reseptörü (NOP)

Opioid ailesinin en son keşfedilen üyesidir (3,81). Üç yüz yetmiş aminoasit diziliminden oluşan ve G protein kenetli reseptör ailesi üyesi olan reseptör, 1994 yılında Mollereau ve arkadaşları tarafından izole edilmiştir (81). NOP aynı zamanda ORL1, OP4 ya da LC132 olarak da adlandırılmaktadır (82-85). Spesifik endojen ligandı nosiseptin/orfanin FQ'dur (N/OFQ) (3,84). Bu endojen liganda 1995 yılında ilk fizyolojik etkisi olan pronosiseptif etkisinden dolayı Meunier ve arkadaşları tarafından nosiseptin ismi verilirken, Civelli ve arkadaşları da yine aynı yıl heptadekapeptid yapısındaki bu proteini orfanin FQ olarak adlandırmışlardır (84,85).

Opioid peptidler gibi N/OFQ da prepronosiseptin geni tarafından kodlanan preproN/OFQ öncül proteininden sentezlenmektedir (3,82,86-88). N/OFQ opioidlerle yaygın homoloji göstermesine rağmen klasik opioid reseptörlere bağlanmamaktadır (3,89,90). Bu

endojen ligand aminopeptidaz ve endopeptidaz enzimleri tarafından metabolize edilmektedir ve oluşan metabolitler NOP üzerine etkisizdir (91,92).

Klasik opioid reseptörlerle %60 oranında yapısal benzerlik göstermesine rağmen NOP, selektif opioid agonist ve antagonistlere düşük afinite göstermektedir (3,92,93). Bu sebeple de yetim (*orphan*) opioid reseptörü olarak adlandırılmaktadır (3).

Nosiseptin/orfanin FQ reseptörü santral ve periferik sinir sisteminde dağılım göstermektedir (3,94). N/OFQ ve NOP sistemi santral sinir sisteminde stres, anksiyete, ağrının iletimi, öğrenme, bellek, lokomotor aktivite ve besin alımı ile ilgili pek çok farklı biyolojik fonksiyonun düzenlenmesinde rol oynamaktadır. Periferik sinir sisteminde de kardiyak, solunum, sindirim, renal, immün sistem gibi sistemler ile birlikte salgılar üzerine etki etmektedir (86,87,95,96). Periferik dokularda N/OFQ sistemi antitusif, kalpte negatif koronotrop ve iyonotrop, vazodilatör etki gösterir ayrıca gastrointestinal motiliteyi ve inflamasyonu azaltıcı etkilere sahiptir (82,96,97).

Nosiseptin/orfanin FQ reseptörü, Gi proteini ile kenetli reseptörlerdendir. Reseptör uyarıldığında; α ve $\beta\gamma$ alt üniteleri ayrılmaktadır. α alt ünitesi adenilat siklazı inhibe ederek cAMP oluşumunu azaltırken; $\beta\gamma$ alt ünitesi de içe doğru düzeltme yapan K^+ kanalları (Kir3) ve Ca^{2+} kanalları ile etkileşime girmektedir (86,98-100). K^+ kanallarının aktive olması hücre dışına K^+ çıkışının artmasına ve dolayısıyla hücrel hiperpolarizasyona sebep olmaktadır. Voltaj kapılı Ca^{2+} kanallarının kapanması sonucunda da hücre içine Ca^{2+} girişi azalmakta ve veziküllerden sinaptik aralığa nörotransmitter salıverilmesi inhibe olmaktadır (86).

N/OFQ reseptör agonistleri: NC, NC(1-13)NH₂, [Arg¹⁴Lys¹⁵]NC, [(pF)Phe⁴]NC(1-13)NH₂, Ro 65-6570, NNC 63-0532, Ro 64-6198 (101).

N/OFQ reseptör parsiyel agonistleri: [F/G]NC(1-13)NH₂, Ac-RYYRIK-NH₂, Ac-RYYRWK-NH₂, NaIBZOH (101).

N/OFQ reseptör antagonistleri: JTC-801, [Nphe¹]NC(1-13)NH₂, J-113397, peptid III-BTD (101).

KANNABİNOİD VE OPIOİD SİSTEMLER ARASINDAKİ İLİŞKİ

Opioidler ve kannabinoidler benzer farmakolojik etki profiline sahip psikoaktif bileşenlerdir (102-104). Opioid ve kannabinoid reseptörleri çok sayıda analjezik etkili ilaç ve suistimal edilen maddeler için hedef yapılarıdır (102). Bu sistemlerin aktive olması antinosisepsiyona, sedasyona, hipotansiyona, hipotermiye, motor hareketlerde yavaşlamaya, intestinal motilitenin azalmasına, immün sistemin baskılanmasına neden olur. Ayrıca bu iki

sistem ödül ve pekiştiri gibi motivasyonel davranış mekanizmalarının, yeme davranışının ve bilişsel fonksiyonların düzenlenmesi gibi fizyolojik süreçlerde de rol oynamaktadır (102-106).

Her iki sistem de benzer sinyal transdüksiyon özelliklerine sahiptir. Reseptör aktivasyonu, adenilat siklaz aktivitesinin inhibisyonuna, cAMP oluşumunun azalmasına, voltaj kapılı Ca^{2+} kanallarının blokajına, K^+ kanallarının aktivasyonuna ve mitojenle aktive olan protein kinaz kaskadının aktive edilmesine neden olmaktadır (103-105,107,108). Kannabinoidler ve opioidler arasında aynı Gi protein havuzu için yarışma söz konusudur (103,108-110).

Opioid ve kannabinoid reseptörleri medial prefrontal korteks, NAc, lokus seruleus, spinal kordun arka boynuzu, kaudat putamen, dorsal hipokampus, substantia nigra, periakuaduktal gri alan, rafe çekirdekleri, santral medial talamik çekirdekler, medial basal hipotalamus gibi bölgelerde ortak lokalizasyon göstermektedir (7,102-105,108,109,111). Bu alanlardaki nöronlarda presinaptik uçlarda yerleşim göstererek nörotransmitter salıverilmesinin inhibisyonuna sebep olmaktadır (8,104,112).

Kannabinoidler ve opioidlerin reseptör düzeyinde ve lokalizasyonlarındaki ortak özellikleri dışında endojen ligandların salıverilmesi üzerine de etkileri olduğu gösterilmiştir (102,104,110,113). Kannabinoidler, endojen opioidlerin sentez ve salıverilmelerini artırmakta, bu yolla kannabinoidler opioidlerin fonksiyonları üzerinde düzenleyici rol üstlenmektedir (102,110,113). Δ^9 -THC uygulamasının, spinal kordda opioid peptid prekürsörlerinden prodinorfin ile proenkefalinin; hipotalamusta da proopiomelanokortinin ekspresyonunu artırdığı gösterilmiştir (114). Yine Δ^9 -THC uygulamasının, NAc'de endojen enkefalin salıverilmesini artırdığını gösteren çalışmalar da mevcuttur (115). Sıçanlarda spinal kateter yardımıyla kannabinoid agonisti CP 55,940 uygulamasının antinosiseptif etkili dinorfin B salınımını etkilediği gösterilmiştir (116). Perinatal kannabinoid maruziyetinin metenkefalin ve β endorfin seviyelerini etkileyerek endojen opioid sistemin etkilerinin uzamasını sağladığını gösteren çalışmalar yapılmıştır (117).

Opioid ve kannabinoid reseptör agonistlerinin birlikte uygulanması tek tek uygulanmalarına kıyasla akut ağrı modellerinde antinosiseptif etkiyi güçlendirmektedir. Her iki grubun uzun süreli kullanılması tolerans ve bağımlılık gelişmesine sebep olmaktadır. Opioid agonistlere kronik maruziyetin Δ^9 -THC'nin antinosiseptif etkisine tolerans geliştirdiği ve yine benzer şekilde Δ^9 -THC'ye kronik maruziyetin opioidlerin antinosiseptif etkilerine tolerans gelişmesine sebep olduğu çalışmalarla gösterilmiştir (104,118-120).

Her iki grup arasında çapraz bağımlılık da rapor edilmiştir. Kannabinoidler opioid yoksunluk belirtilerini baskılamaktadır (104,121,122). Morfine bağımlı farelerde naloksonla

görülen yoksunluğun somatik belirtilerini AEA'nın azalttığı gösterilmiştir (107,123). Opioidlere veya kannabinoidlere tolerans gelişen deney hayvanlarında antagonist uygulamasının yoksunluğa sebep olduğu kanıtlanmıştır. Yapılan çalışmalarda Δ^9 -THC'ye tolerans gelişmiş sıçanlarda opioid antagonisti naloksonun yoksunluk semptomları oluşturduğu, aynı şekilde morfine bağımlı sıçanlarda da kannabinoid antagonisti SR141716A uygulamasının yoksunluğa sebep olduğu gösterilmiştir (104,124,125). Kronik morfin kullanımında naloksonla görülen yoksunluğun somatik belirtilerini Δ^9 -THC uygulamasının azalttığı kanıtlanmıştır (115).

Ödül süreçlerinde de bu iki sistem arasında etkileşim olduğu gösterilmiştir. SR141716A'nın sıçanların ve farelerin kendi kendilerine eroin uygulamasını, nalokson ya da naltreksonun da maymunların kendi kendilerine Δ^9 -THC uygulamasını azalttığı gösterilmiştir (104,126-128). Δ^9 -THC uygulamasının sebep olduğu dopaminerjik aşırıdaki artışı naloksonun bloke ettiğini gösteren çalışmalar da yapılmıştır (107,129).

CB₁ reseptör agonisti uygulamasının yeme davranışı üzerindeki yiyecek alımını artırıcı yöndeki etkisinin nalokson tarafından bloke edildiği tespit edilmiştir (104,130,131).

Opioid reseptör antagonistleri Δ^9 -THC ile indüklenmiş anksiyolitik etkiyi geri çevirmektedir (107,132). Düşük doz Δ^9 -THC uygulamasıyla ortaya çıkan anksiyolitik etkinin mü reseptör antagonisti funaltreksamin ve delta opioid antagonisti naltirindol ile bloke edildiği, ancak kappa opioid reseptör antagonisti binaltorphimin'in ise etkisiz olduğu gösterilmiştir (104,132). Δ^9 -THC uygulaması ile stres hormonları (kortikosteron ve adrenokortikotropik hormon) düzeylerindeki artışın nalokson ile azaldığı tespit edilmiştir (107,133).

Opioid ve kannabinoid sistemler arasında çapraz duyarlılık söz konusudur. Tekrarlanan Δ^9 -THC uygulaması aynı zamanda morfine karşı duyarlılık oluşumunu da indüklemektedir. Morfine duyarlı sıçanların aynı zamanda Δ^9 -THC ve WIN 55,212-2'ye duyarlı olduğu görülmüştür (107,134).

Tekrarlanan kannabinoid agonist alımının çeşitli beyin bölgelerinde mü reseptör yoğunluğunda artışa sebep olduğu; kronik morfin uygulamasının da CB₁ reseptör yoğunluğunda artışa ya da hiçbir değişiklik olmamasına sebep olduğu tespit edilmiştir (104,135,136).

GEREÇ VE YÖNTEMLER

Bu çalışma Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı Davranış Laboratuvarında gerçekleştirildi. Çalışma, Trakya Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından 29.01.2016 tarih ve 2016/02 sayılı oturumda 2016/02/08 karar numarası ile onaylandı (Ek-1) ve İyi Laboratuvar Uygulamaları Kılavuzu ve Hayvan Etiği Evrensel İlkelerine uygun olarak gerçekleştirildi. Bu çalışma Trakya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri tarafından TÜBAP-2016/69 kayıt numarası ile desteklendi.

DENEKLER

Çalışmada balb/c türü 25-40 gram ağırlığında, 2-3 aylık, erkek fareler kullanıldı. Deney hayvanları havalandırma ve ısıtma-soğutma sistemi olan, gece-gündüz ritmi otomatik olarak ayarlanan, nemi ölçülen bir odada, her kafeste 10 fare olacak şekilde barındırıldı. Beslenmeleri için standart fare yemi ve içme suyu kullanıldı, yem ve su miktarında herhangi bir kısıtlama yapılmadı.

DENEY PLANI VE GRUPLAR

Çalışmaya alınmadan önce bütün fareler ağırlıkları tartılarak kuyrukları daha önceden belirlenmiş renkli numaralandırma sistemine uygun olarak toksik olmayan boyalar ile boyandı. Fareler yapılacak enjeksiyonlara göre her kafeste 10 adet olacak şekilde gruplara ayrıldı.

Gruplarına uygun olarak deney hayvanlarına intraperitoneal yolla kannabinoid reseptör agonisti WIN 55,212-2, N/OFQ reseptör antagonisti JTC-801, çözücü ve serum fizyolojik enjeksiyonları yapıldı. JTC-801 ve WIN 55,212-2 enjeksiyonlarının birlikte olduğu günlerde, önce JTC-801 enjeksiyonu, 10 dk. sonra da WIN 55,212-2 enjeksiyonu yapıldı. 8. ve 9.

günlerde deney hayvanlarına bağlamsal korku koşullanma testi, rota-rod testi, açık alan testi ve zorunlu yüzme testleri yapıldı. Davranış deneyleri, enjeksiyonların tamamlanmasından 30 dk. sonra gerçekleştirildi ve tüm davranış deneyleri tamamlandıktan sonra hayvanlara ötenazi uygulandı.

Çalışma sürecinde kronik enjeksiyonlar sırasında yaşanan hayvan kayıpları yerine yeni denekler alınarak kapatıldı; ancak davranış deneyleri sırasında yaşanan hayvan kayıpları (toplam 2 hayvan) giderilmedi.

Çalışmadaki gruplar ve yapılan uygulamalar Tablo 4’te gösterilmiştir.

Tablo 4. Çalışma grupları ve uygulanan enjeksiyonlar

Gruplar	Uygulama
Grup 1	9 gün WIN 55,212-2
Grup 2	9 gün çözücü
Grup 3	9 gün serum fizyolojik
Grup 4	9 gün WIN 55,212-2 + 8. gün JTC-801
Grup 5	9 gün WIN 55,212-2 + 8. gün serum fizyolojik
Grup 6	9 gün WIN 55,212-2 + 8. gün çözücü
Grup 7	9 gün WIN 55,212-2 + 9. gün JTC-801
Grup 8	9 gün WIN 55,212-2 + 9. gün çözücü
Grup 9	9 gün WIN 55,212-2 + 9. gün serum fizyolojik
Grup 10	9 gün WIN 55,212-2 + 8. ve 9. gün JTC-801
Grup 11	9 gün WIN 55,212-2 + 8. ve 9. gün çözücü
Grup 12	9 gün WIN 55,212-2 + 8. ve 9. gün serum fizyolojik
Grup 13	9 gün JTC-801

KULLANILAN AJANLAR

Deneyler boyunca kullanılan ajanlar ile doz, hacim katalog bilgileri Tablo 5’te gösterilmiştir.

Tablo 5. Ajanlar ve doz, enjeksiyon hacmi, katalog bilgileri

Ajan	Doz	Vücut ağırlığı başına enjeksiyon hacmi	Katalog no
WIN 55,212-2	3 mg/kg	0,1 ml/10 g	Sigma-W102
JTC-801	5 mg/kg	0,1 ml/10 g	Sigma-J39559
Çözücü*	-	0,1 ml/10 g	-
Serum fizyolojik	-	0,1 ml/10 g	-

* %20 dimetil sülfoksit (DMSO), %5 etanol, %5 tween 80, %70 serum fizyolojik

FARELERE UYGULANAN DAVRANIŞ TESTLERİ

Farelerde korku belleğinin değerlendirilmesi için bağlamsal korku koşullanma testi, motor aktiviteyi ölçmek için lokomotor aktivite, denge fonksiyonlarının değerlendirilmesi için rota-rod performans testi, anksiyete ve araştırma davranışını değerlendirmek için açık alan testi ve depresif durumu değerlendirmek amacıyla zorunlu yüzme testi uygulanmıştır.

Farelerde Bağlamsal Korku Koşullanma Testi ile Korku Koşullanmalı Bellek Değerlendirmesi

Bağlamsal korku koşullanma testi farelerde öğrenme ve bellek fonksiyonlarının değerlendirilmesinde kullanılmaktadır. Nötral bir uyarının kendisine eşlik eden caydırıcı uyarılarla birlikte korku davranışı (donma) oluşturduğu bu davranış testi hipokampus ile ilişkili olup, korku bazlı belleği değerlendirmek için kullanılmaktadır.

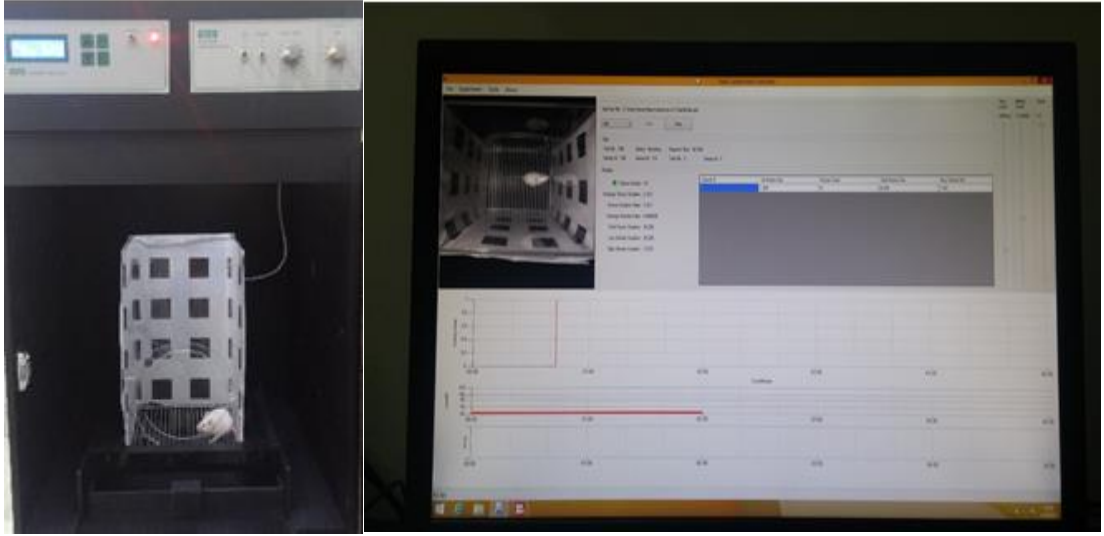
Düzeneğin dış kısmı siyah mat pleksiglas malzemeden, iç kısmı şeffaf pleksiglas malzemeden üretilmiş olup 27 cm genişliğinde 27 cm derinliğinde ve 34 cm yüksekliğindedir. Şeffaf pleksiglas iç bölümünün ağız kısmında 16 cm çapında daire şeklinde kapısı mevcuttur. Tabanında birbirine paralel dizilmiş şok cihazının bağlı olduğu çelik ızgaranın bulunduğu ve çeperlerinde görsel öğelerin yer aldığı kafesten oluşmaktadır. Tavanda ise aydınlatma amaçlı beyaz ışık bulunmaktadır. Düzeneğin tabanında farelerin dışkılarının toplandığı çıkarılabilir çekmece bulunmaktadır (Şekil 4).

Bağlamsal korku koşullanma testi iki günlük bir davranış testidir. Testin 1. gününde fareler sırayla görsel objelerin olduğu kafese alınarak 7 dakika boyunca gözlemlendi. Testin başlangıcından iki dakika sonra ikişer dakika ara ile toplam üç kez (2., 4. ve 6. dakikalarında olmak üzere) 0,5 mA (1 sn) elektrik şoku verildi. Son şokun ardından fareler bir dakika daha düzeneğin içinde bekletildi. 7. dakikanın sonunda deney hayvanı düzenekten çıkarılarak tekrar kafesine yerleştirildi.

Testin 2. gününde (24 saat sonra) fareler sırayla aynı kafes ve düzeneğe tekrar yerleştirildi. 5 dakika boyunca şok uygulanmadan gözlemlendi. Beş dakikanın sonunda deney hayvanı düzenekten çıkarılarak tekrar kafesine yerleştirildi.

Deneyle sırasında hayvanlar düzenekten çıkarıldıktan sonra düzeneğin içindeki dışkılar temizlenerek tabanı %10'luk etanol ile silinip kurutuldu.

Farelerdeki donma davranışları FCS 21200-R sistemi kullanılarak incelendi ve toplam donma süreleri saptandı (Şekil 4).



Şekil 4. FCS 21200-R düzeneği: kafes (sol) ve yazılım (sağ).

Farelerde Rota-rod Performans Testi ile Lokomotor Aktivite ve Dengenin Değerlendirilmesi

Rota-rod performans testi, hayvanların motor koordinasyon ve performanslarının değerlendirildiği bir testtir. Cihazın çalışma prensibi, deney hayvanlarının belirli bir yükseklikte (25 cm) ve sabit bir hızla elektrik enerjisiyle dönen mil (rod) üzerinde belli bir süre içerisinde dengede kalarak yürüebilmesi veya aşağıya düşmemesi temeline dayanmaktadır.

Rota-rod performans testi, Rotamex 4/8 (Columbus Instrument, ABD) kullanılarak gerçekleştirildi (Şekil 5). Düzenek deney hayvanlarının birbirlerini göremeyecekleri şekilde tasarlanmış yan yana 4 kabinden oluşmaktadır. Her bir kabinin genişliği 10 cm, yüksekliği 45 cm ve derinliği 30 cm'dir. Her kabinin içinden silindir şeklinde yatay mil geçmektedir. Hayvan aşağı düşmemek için milin döndüğü yönün tersi yönde yürümeye çalışır.

Kabinlerin ön bölümünde hayvanların mil üzerinde durduğu süreyi kayıt altına alan otomatik numaratorler bulunmaktadır. Deney hayvanı mil üzerinden düştüğünde numarator durmaktadır. Düzeneğin taban kısmında hayvanların dışkılarının toplandığı metal bölüm, ön ve tavan kısmında ise açılabilen şeffaf pleksiglas malzemeden oluşan kapak kısmı bulunmaktadır.

Deney hayvanlarına ilk aşamada alıştırma, düzeneğin ve ortamın tanıtılması amacıyla belirli sürelerde denemeler yaptırıldı.

Her bir deney hayvanı toplamda 3 defa dönen milin üzerine alınarak mil üzerinde dengede kalarak yürüebildikleri süreler kayıt altına alındı. Bu şekilde hayvanın mil üzerinde en uzun durabilme süresi belirlenerek, bu değer rota-rod performans değeri olarak kaydedildi. Bu veriler ile hayvanların lokomotor aktivite ve denge yetileri değerlendirildi. Düzeneğe yeni deney hayvanları konulmadan önce taban %10'luk etanol ile temizlenip kurutuldu.



Şekil 5. Rota-rod cihazı

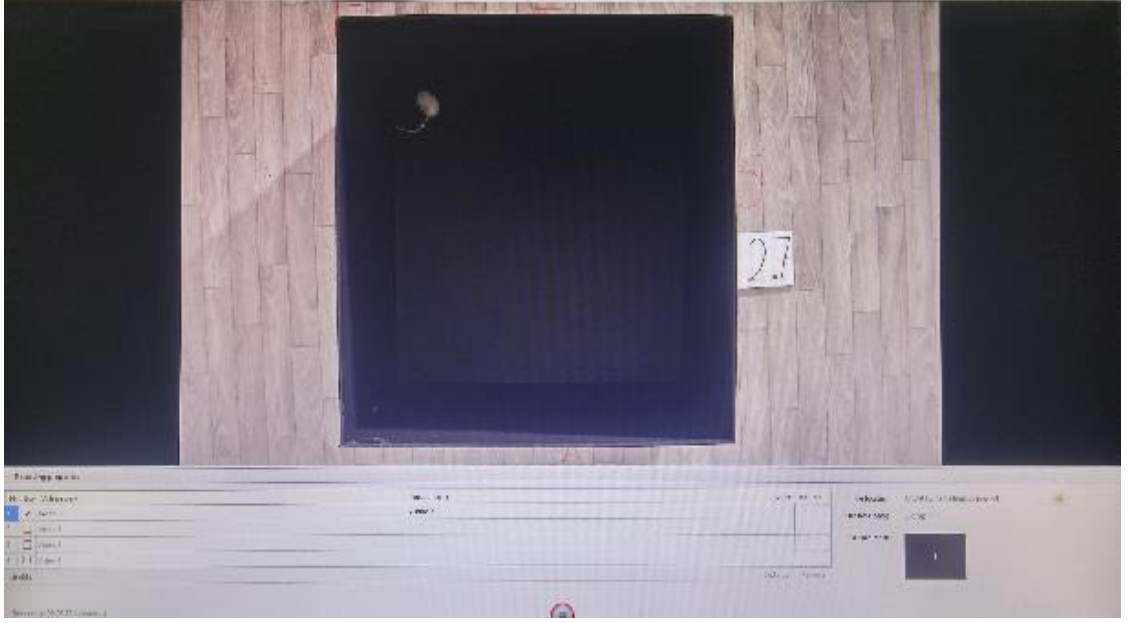
Farelerde Açık Alan Testi ile Anksiyetenin Değerlendirilmesi

Açık alan testi anksiyete ve lokomotor aktivitenin değerlendirildiği bir testtir. Deney hayvanları yeni bir çevrede ilk kez bulduklarında ortamı keşfetme, potansiyel tehlikeleri tespit etme, kendileri için güvenli olan alanı bulma arayışı gibi davranışlarda bulunurlar. Bu davranışları esnasında da kendilerine özgü hareketler sergilerler.

Bu testte deney hayvanı üzeri açık kenarları kapalı bir alana alınır ve hareket parametreleri (dışarı çıkma, sıçrama, arka ayakları üzerine kalkma, tımarlama) gözlemlenir.

Test düzeneğinin tabanı ve dört yüzü 60 cm x 60 cm siyah mat pleksiglas malzemeden üretilmiş panellerden oluşmaktadır ve üstü açıktır. Düzeneğin üstünde deney hayvanlarının hareketlerini kayıt altına almak için kullanılan tavana sabitlenmiş kamera bulunmaktadır.

Düzenek, karşılıklı iki köşesinden 650 lüks ışıkla aydınlatılan boş ve sessiz bir odada bulunmaktadır.



Şekil 6. Açık alan test düzeneğinde kayıt

Test gününde deney hayvanı düzeneğin tam merkezine bırakılarak 10 dakika boyunca hareketleri Ethovision XT 11,5 yazılımı (Noldus, Hollanda) incelendi (Şekil 6). On dakikanın sonunda düzenekten alınarak tekrar kafesine konuldu. Deneğin dışkı sayısı not edildi. Düzeneğin tabanı deneklerin test sürecini etkilememesi için %10'luk etanol ile temizlenip kurutuldu. Her bir test arasında temizlik işlemi yinelenildi.

Açık alan testinde deney hayvanlarının toplam kat ettikleri mesafe, merkez alanda geçirdikleri süre, arka ayakları üzerine kalkma (*rearing*) sayısı belirlendi.

Farelerde Zorunlu Yüzme Testi ile Anksiyetenin Değerlendirilmesi

Zorunlu yüzme testi deney hayvanlarında depresyon modeli oluşturmak ve antidepressanların etkinliğini araştırmak için kullanılan bir testtir. Test düzeneği 19 cm çapında, 60 cm yüksekliğinde şeffaf pleksiglas malzemeden üretilmiş üstü açık silindir ve silindirin içine oturtulduğu şeffaf pleksiglas malzemeden yapılmış kazandan oluşmaktadır. Silindirler siyah mat pleksiglas malzemeden yapılmış plakalara sabitlenmiştir ve tabanla silindirin birleştiği yerde suyun geçişini sağlayacak açıklık bulunmaktadır. Kazanların üstü açıktır ve alt kısmında suyun tahliyesini sağlamak için musluk bulunmaktadır. Kazanların arasına deneklerin birbirini görmesine engel olacak şekilde siyah mat materyal yerleştirilmiştir. Düzeneğin arkasında beyaz ışık veren bir kaynak bulunmaktadır. Düzeneğin karşısına yerleştirilmiş kamera ile de deneklerin hareketleri kayıt altına alınmaktadır (Şekil 7). Silindirler 30 cm yüksekliğinde su ile doludur ve suyun sıcaklığı 23-25°C'dir. Sıcaklık cıvalı termometre ile kontrol edilerek deney

boyunca suyun aynı sıcaklıkta kalmasına özen gösterilmektedir.

Zorunlu yüzme testi iki günlük bir deneydir. Testin ilk gününde deney hayvanları içi su dolu silindirlere merkezden bırakılarak 15 dakika boyunca yüzdürüldü. On beş dakika sonunda sudan çıkarılıp kurutularak tekrar kafesine alındı. Yeni denekler yüzdürülmeden önce silindirler temizlendi. İkinci gün deney hayvanları tekrar içi su dolu silindirlere merkezden bırakıldı ve 5 dakika boyunca Ethovision XT 11,5 yazılımı (Noldus, Hollanda) kullanılarak kayıt altına alındı. Deney süresi boyunca deney hayvanlarının toplam hareketsiz kalma süresi ve ilk hareketsiz kalmaya başladığı süre gibi parametreler incelendi.

İSTATİSTİKSEL ANALİZ

Verilerin sunulmasında tanımlayıcı istatistik kullanıldı. Bağlamsal korku koşullanma, açık alan, zorunlu yüzme ve rota-rod testlerinden elde edilen verilerin analizinde gruplar arası karşılaştırmalar için Kruskal Wallis ve *post hoc* Dunn testi yapıldı. Analizler Graphpad Prism 6.0 for Mac OS X yazılımında gerçekleştirildi ve $p < 0,05$ anlamlı kabul edildi.



Şekil 7. Zorunlu yüzme test düzenneği

BULGULAR

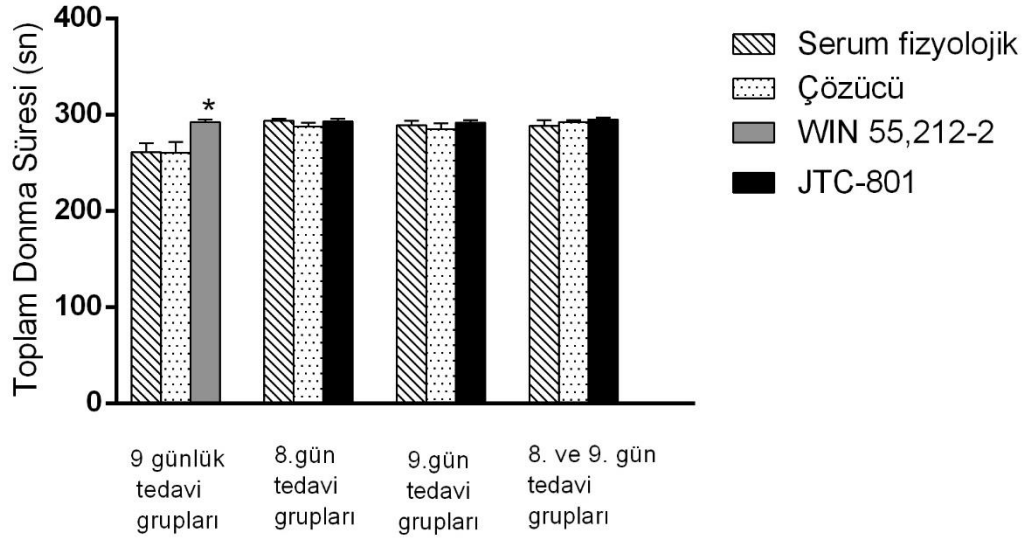
İki günlük testlerin ilk günü tedavinin 8. gününü, ikinci günü de tedavinin 9. gününü ifade etmektedir. Grafiklerde yer alan tedavi grupları ve yapılan uygulamalar Tablo 6'da gösterilmiştir.

Bağlamsal Korku Koşullanma Testi Verileri

Dokuz gün kronik tedavi alan deney hayvanlarına tedavinin sekizinci ve dokuzuncu günlerinde bağlamsal korku koşullanma testi uygulandı. 8. gün, 9. gün, 8. ve 9. gün tedavi gruplarına JTC-801 enjeksiyonundan 10 dakika sonra WIN 55,212-2 enjeksiyonları yapıldı. WIN 55,212-2 enjeksiyonundan 30 dakika sonra teste başlandı. Testin ilk (tedavinin 8. günü) gününde deney hayvanlarına testin 2., 4. ve 6. dakikalarında 0,5 mA (1 sn) elektriksel şok uygulanarak 7 dakika boyunca gözlem yapıldı. Testin ikinci gününde (tedavinin 9. günü) deney hayvanları yine aynı kafese yerleştirilerek 5 dakika boyunca şok verilmeksizin gözlemlendi ve toplam donma süreleri kayıt altına alındı. Bu testten elde edilen veriler farelerin korku koşullanmalı bellek fonksiyonlarını göstermektedir. Çalışmamızda saptanan bulgular tedavi gruplarına göre toplam donma süreleri şeklinde sunulacaktır.

Tablo 6. Tedavi grupları ve yapılan uygulamalar

Tedavi grupları	Yapılan uygulamalar
9 günlük tedavi grupları	9 gün WIN 55,212-2/çözücü/SF alan gruplar
8. gün tedavi grupları	9 gün WIN 55,212-2 + 8. gün JTC-801/çözücü/SF alan gruplar
9. gün tedavi grupları	9 gün WIN 55,212-2 + 9. gün JTC-801/çözücü/SF alan gruplar
8. ve 9. gün tedavi grupları	9 gün WIN 55,212-2 + 8. ve 9. gün JTC-801/çözücü/SF alan gruplar



Şekil 8. Bağlamsal korku koşullanma testinde toplam donma süreleri

(* $p < 0,05$; çözücü ve serum fizyolojik alan gruplara karşı. $n=10$, Kruskal Wallis Varyans analizi, *post hoc* Dunn testi. Grafiklerdeki dikey çizgiler standart hatayı göstermektedir).

Deney sonucunda 9 gün boyunca sadece WIN 55,212-2 alan grubun toplam donma süresinin, 9 gün boyunca çözücü ve 9 gün boyunca serum fizyolojik alan gruplardan istatistiksel yönden anlamlı derecede daha fazla olduğu ($p=0,005$, Kruskal Wallis Varyans analizi) saptandı. 8. gün, 9. gün, 8. ve 9. gün tedavi gruplarında JTC-801, çözücü ve serum fizyolojik uygulanan hayvanların toplam donma süreleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark yoktu (sırasıyla $p=0,2853$, $p=0,9172$, $p=0,1861$, Kruskal Wallis Varyans analizi) (Şekil 8).

Zorunlu Yüzme Testi Verileri

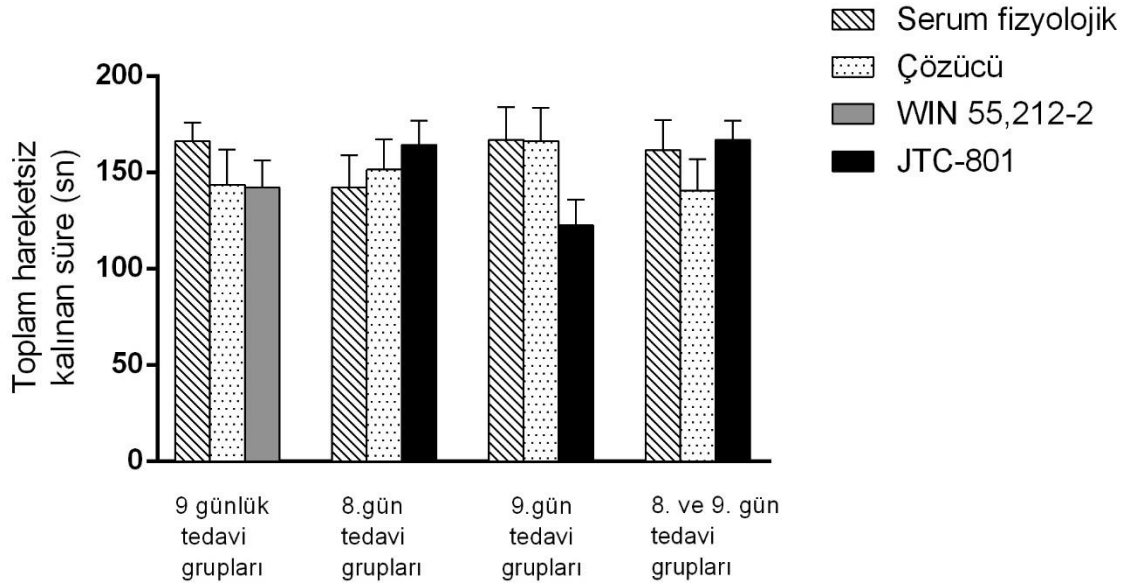
Deney sonucunda 9 günlük tedavi gruplarında WIN 55,212-2 alan grup ile serum fizyolojik ve çözücü alan gruplar arasında toplam hareketsiz kalınan süreler açısından farklılıklar saptanmasına rağmen bu fark istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p=0,4750$, Kruskal Wallis Varyans analizi). 8. gün tedavi gruplarında JTC-801 uygulanan hayvanlar çözücü ve serum fizyolojik alan hayvanlardan daha uzun süre hareketsiz kalmasına rağmen bu fark istatistiksel anlamlı bulunmadı ($p=0,5912$, Kruskal Wallis Varyans analizi). 9. gün tedavi gruplarından JTC-801 enjeksiyonu yapılanların, çözücü ve serum fizyolojik gruplarından daha kısa süre hareketsiz kaldıkları tespit edildi, ancak bu fark istatistiksel anlamlılığa erişmedi ($p=0,0884$, Kruskal Wallis Varyans analizi). 8. ve 9. gün tedavi gruplarında da toplam hareketsiz kalınan süreler birbirlerinden farklı gibi görünse de bu farklar istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p=0,5321$, Kruskal Wallis Varyans analizi). 9. gün JTC-801 uygulanan grup

ile 8. gün veya 8. ve 9. gün JTC-801 uygulanan gruplar arasında da toplam hareketsiz kalınan süreler açısından istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı ($p>0,05$, Kruskal Wallis Varyans analizi) (Şekil 9).

Açık Alan Testi Verileri

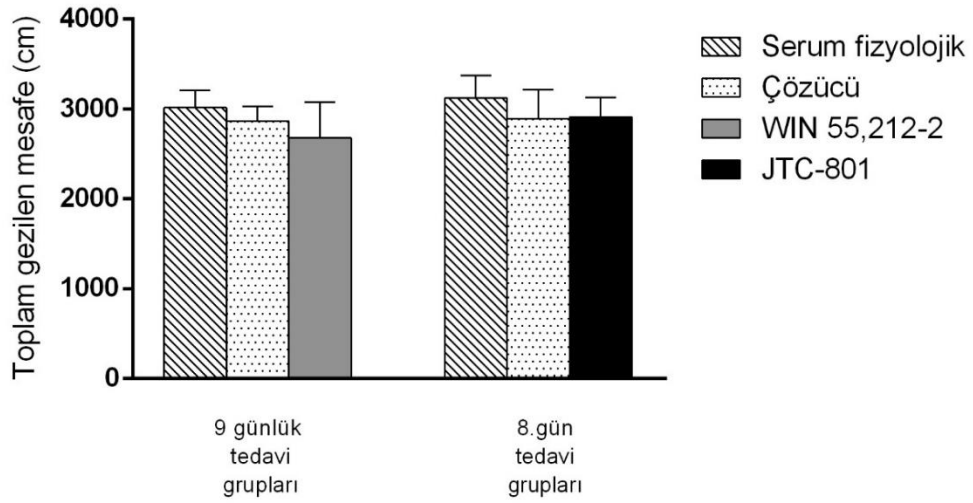
Deney hayvanlarının anksiyete ve lokomotor aktivitelerinin değerlendirildiği bu testte deney hayvanlarının toplam gezdikleri mesafe, merkez alanda geçirdikleri süre, *rearing* (arka ayakları üzerine kalkma) sayısı değerlendirildi. Çalışmamızda saptanan bulgular toplam gezilen mesafe (a), merkez alanda geçirilen süre (b) ve *rearing* sayısı (c) şeklinde 3 alt grupta sunulacaktır.

Toplam gezilen mesafe: Deney sonucunda 9 günlük tedavi gruplarında WIN 55,212-2 alan grubun çözücü ve serum fizyolojik alan gruba göre toplam gezdiği mesafe istatistiksel olarak anlamlı farklı değildi ($p=0,5079$, Kruskal Wallis Varyans analizi). Benzer şekilde, 8. gün tedavi uygulanan gruplardaki değerler de birbirlerinden istatistiksel yönden farklı bulunmadı ($p=0,8521$, Kruskal Wallis Varyans analizi) (Şekil 10).



Şekil 9. Zorunlu yüzme testi toplam hareketsiz kalınan süre

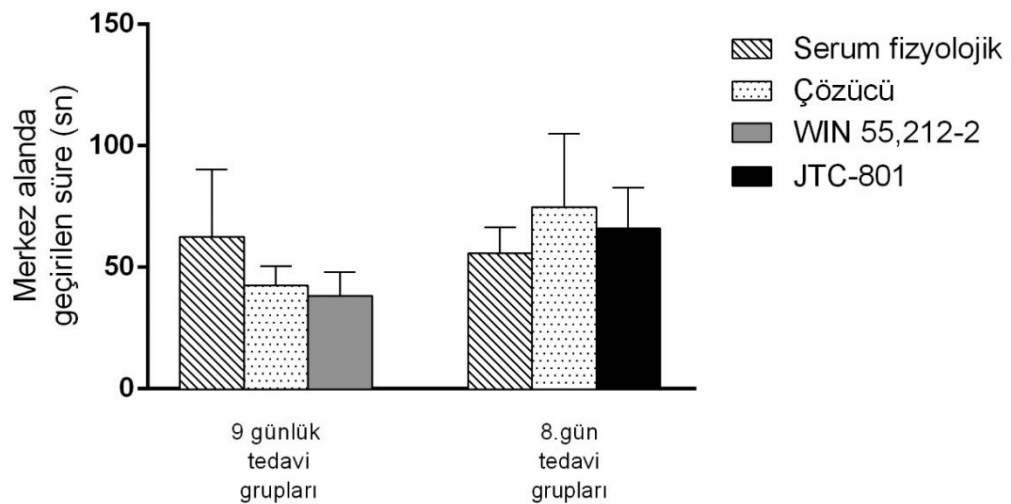
($n=10$, Kruskal Wallis Varyans analizi, *post hoc* Dunn testi. Grafiklerdeki dikey çizgiler standart hatayı göstermektedir).



Şekil 10. Açık alan testi toplam gezilen mesafe

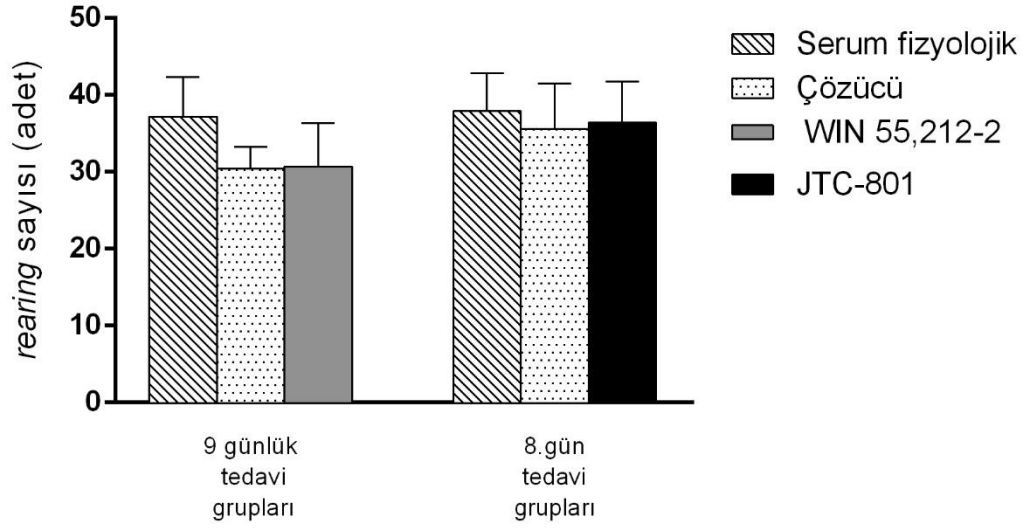
(n=10, Kruskal Wallis Varyans analizi, *post hoc* Dunn testi. Grafiklerdeki dikey çizgiler standart hatayı göstermektedir).

Merkez alanda geçirilen süre: Deneyin sonucunda 9 günlük tedavi gruplarında WIN 55,212-2 alan grubun merkez alanda geçirdiği süre çözücü ve serum fizyolojik alan gruplara göre istatistiksel olarak anlamlı farklı değildi ($p=0,8229$, Kruskal Wallis Varyans analizi). 8. gün tedavi gruplarında JTC-801 alan hayvanların merkez alanda geçirdikleri sürenin, çözücü ve serum fizyolojik uygulanan gruplardan istatistiksel anlamlı farklı olmadığı belirlendi ($p=0,7917$, Kruskal Wallis Varyans analizi) (Şekil 11).



Şekil 11. Açık alan testi merkez alanda geçirilen süre

(n=10, Kruskal Wallis Varyans analizi, *post hoc* Dunn testi. Grafiklerdeki dikey çizgiler standart hatayı göstermektedir).



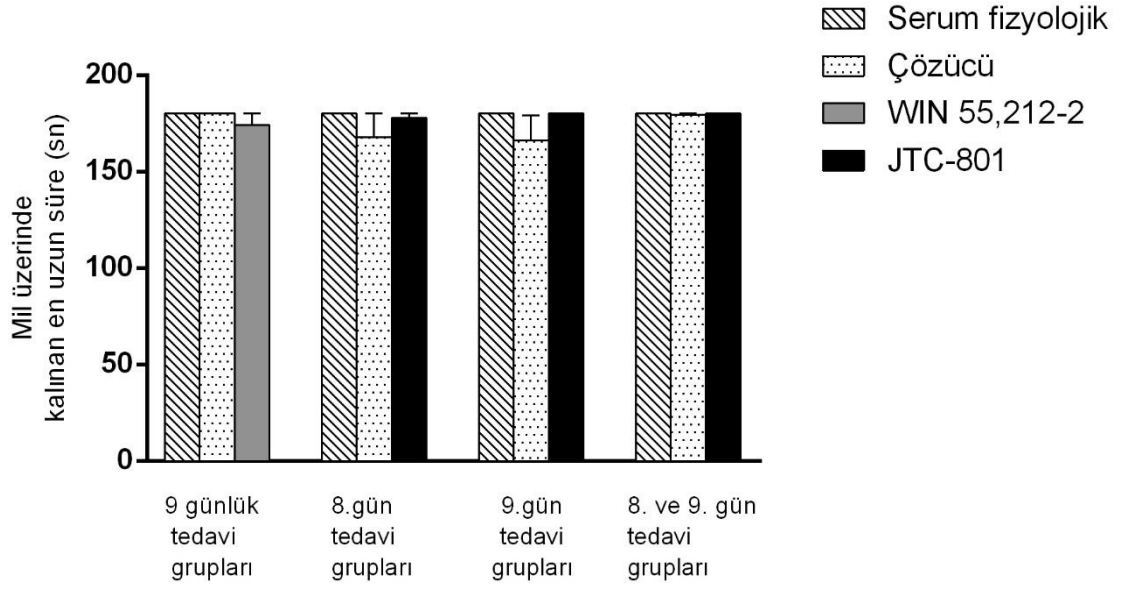
Şekil 12. Açık alan testi *rearing* sayısı

(n=10, Kruskal Wallis Varyans analizi, *post hoc* Dunn testi. Grafiklerdeki dikey çizgiler standart hatayı göstermektedir).

Açık alan testi *rearing* sayısı: 9 günlük tedavi gruplarında, *rearing* sayıları yönünden çözücü, serum fizyolojik ve WIN 55,212-2 grupları arasında istatistiksel anlamlı bir fark bulunmadı ($p=0,6563$, Kruskal Wallis Varyans analizi). Benzer şekilde 8. gün tedavi alan gruplar arasında da istatistiksel anlamlı bir fark saptanmadı ($p=0,9561$, Kruskal Wallis Varyans analizi) (Şekil 12).

Rota-rod Performans Testi Verileri

Deney sonucunda 9 günlük tedavi gruplarında, serum fizyolojik, çözücü ve WIN 55,212-2 uygulanan grupların mil üzerinde geçirdikleri en uzun süre açısından istatistiksel yönden anlamlı farklı olmadığı saptandı ($p=0,3679$, Kruskal Wallis Varyans analizi). 8. gün tedavi uygulanan gruplar arasında ($p=0,5951$, Kruskal Wallis Varyans analizi), 9. gün tedavi uygulanan gruplar arasında ($p=0,1263$, Kruskal Wallis Varyans analizi) ve 8. ve 9. gün tedavi uygulanan gruplar arasında ($p=0,3679$, Kruskal Wallis Varyans analizi) mil üzerinde kalınan en uzun süre yönünden istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmedi (Şekil 13).



Şekil 13. Rota rod testi mil üzerinde kalınan en uzun süre

(n=10, Kruskal Wallis Varyans analizi, *post hoc* Dunn testi. Grafiklerdeki dikey çizgiler standart hatayı göstermektedir).

TARTIŞMA

Kannabinoid agonistlerinin belleğin kazanılmasında bozucu bir etkiye sahip olduğu, özellikle öğrenme fazı sırasında verilen kannabinoid agonistlerinin öğrenmeyi engellediği bildirilmekle birlikte, bunun tersine işaret eden çalışmalar da bulunmaktadır (137). Çalışmamızda kronik verilen CB₁/CB₂ agonisti WIN 55,212-2 bağlamsal korku koşullanma testinde öğrenmeyi/belleği artırıcı bir etkiye sahipti. WIN 55,212-2 uygulamasının erkek Wistar sıçanlarda hem bağlamsal hem de ipuçlu korku koşullanma deneyleri üzerine etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada koşullandırmadan önce WIN 55,212-2'nin (2.5 ve 5.0 mg/kg dozlarda) bağlamsal korku koşullanmada bellek süreçlerini bozduğu; fakat ipuçlu korku koşullanmada donma davranışını etkilemediği gösterilmiştir. Yine aynı çalışmada agonist uygulamasından önce CB₁ antagonistleri SR141716A veya SR147778 enjeksiyonlarının bellek bozulmasını önleyici etkilerinin olduğu tespit edilmiştir. Bu bulgular sonucunda da WIN 55,212-2'nin hipokampüsün rol oynadığı bağlamsal korku koşullanma testinde doza bağımlı olarak öğrenmeyi bozduğu ve amigdala aracılı olan ipuçlu korku koşullanma üzerinde ise etkisinin olmadığı gösterilmiştir. (138). Sıçanlar ile yapılan başka çalışmalarda da hipokampüsün bağlamsal korku koşullanma süreçlerine aracılık ederken; ipuçlu korku koşullanma süreçlerine etkisinin olmadığı tespit edilmiştir (139,140). WIN 55,212-2'nin belleğin pekiştirilmesi süreçlerine olumsuz etkileri su labirenti testinde de gösterilmiştir. Long-Evans türü erkek sıçanlara intrakraniyal ve sistemik WIN 55,212-2 uygulamalarının su labirenti testinde uzun dönem uzaysal belleğin konsolidasyonunu (pekiştirilmesini) bozduğu ve yine benzer bozuklukların hipokampüse WIN 55,212-2 infüzyonunda da olduğu gösterilmiştir (141). Swiss albino erkek farelere CB₁ antagonistleri SR141716A'nın uygulandığı yükseltilmiş artı labirent testinde, antagonistin alıştırılmadan önce ya da hemen sonra yapılan

enjeksiyonlarının belleğin edinilmesi ve pekiştirilmesini pozitif yönde etkilerken, testten önceki enjeksiyonlarının geri çağırma etkisiz olduğu gösterilmiştir. Bu çalışma da bellek bozucu etkilere CB₁ reseptörünün aracılık ettiğini kanıtlar niteliktedir (142).

CB₁ agonistleri ile yapılan çalışmalarda hipokampal ve prefrontal korteksle ilgili öğrenme süreçlerinin bozulduğu gösterilmiştir (143-145). Bağlamsal ve ipuçlu korku koşullanmanın değerlendirildiği bir çalışmada erkek Wistar sıçanlara koşullanma ve test günlerinde 0,25, 1,25, 2,5 ve 5 mg/kg dozlarında WIN 55,212-2 uygulamaları yapılmış, düşük dozda WIN 55,212-2 uygulamasının bağlamsal korku koşullanma üzerinde çok küçük etkiler meydana getirdiği, buna karşılık yüksek dozlarda (2,5 ve 5 mg/kg) WIN 55,212-2'nin kontrol grubuyla kıyasla anlamlı derecede bozukluk oluşturduğu gözlemlenmiştir. Bununla birlikte WIN 55,212-2'nin tüm dozlarının ipuçlu korku koşullanma üzerinde etkisiz olduğu gösterilmiştir (138). Pek çok çalışmanın sonucunda da CB₁ agonistlerinin amigdalanın aksine hipokampus ve prefrontal korteks aracılı bellek süreçleri üzerine daha yıkıcı etkileri olduğu anlaşılmıştır. Emosyonel ve emosyonel olmayan bellek süreçleriyle ilgili nöronal yapıların kannabinoid reseptör aktivasyonlarına birbirlerinden farklı duyarlılık gösterdikleri tespit edilmiştir (146).

Tan ve ark. (2011) bazolateral amigdala CB₁ reseptör aracılığıyla gerçekleşen iletimin korku belleğinin gelişmesinde önemli olduğunu saptamışlardır. Bazolateral amigdala'daki bu aktivasyondan önce mediyal prefrontal korteks'in farmakolojik inaktivasyonunun, korku belleği oluşumunda CB₁ reseptör aracılı potansiyalizasyonu bloke ettiğini de göstermişlerdir. Buna dayanarak bazolateral amigdala içindeki kannabinoid iletiminin korku koşullanma üzerindeki etkisini, mediyal prefrontal korteks ile olan fonksiyonel etkileşimi aracılığıyla gerçekleştiği sonucuna varmışlardır (147).

Korku ve unutmamanın öğrenilmesi ile ilgili süreçlerin birbirlerine benzer yanları olsa da kannabinoid sistem aktivasyonunun bu süreçler üzerinde farklı etkileri olduğu görülmüştür (146). Erkek Sprague-Dawley sıçanlarla yapılan bir çalışmada CB₁ reseptör antagonizmasının unutmama süreçleri üzerinde eksiklik yarattığı ve bu yüzden unutmamanın gerçekleşebilmesi için CB₁ reseptör aktivasyonunun gerekli olduğu tespit edilmiştir. Buna karşılık aynı çalışmada yüksek doz (5 mg/kg) sentetik CB₁ agonisti WIN 55,212-2'nin uygulamasının unutmama süreci üzerine etkisiz olduğu gösterilmiştir (148). Bu etkiye CB₁ reseptörünün tam agonistlerinin birtakım kompensatuar mekanizmalar ile CB₁ reseptör aracılı sinyal iletim mekanizmasında eksiklik oluşturmasının aracılık ettiği ya da unutmamanın gerçekleşebilmesi için test sürecinde CB₁ reseptörlerinin zaman-spesifik olarak uyarılmasının gerektiği gibi hipotezler ortaya atılmıştır (146).

C57BL/6 türü farelere davranış deneylerinden 20 dakika önce SR141716A enjeksiyonunun yapıldığı bir çalışmada, CB₁ reseptör antagonizmasının bağlamsal korku koşullanmada belleğin unutulmasını bozduğu gösterilmiştir (149). Bununla birlikte selektif CB₁ reseptör agonistleri, CB₁/CB₂ reseptör agonistleri ve endokannabinoidlerin metabolizmasından sorumlu enzim inhibitörleri ile sıçanlar üzerinde yapılan çalışmalarda da unutmanın kolaylaştığı tespit edilmiştir (148,150,151). Wistar türü sıçanlara 0,25 mg/kg dozunda WIN 55,212-2 ve 0,2 mg/kg dozunda kannabinoid reseptör antagonisti SR 147778'in intraperitoneal uygulandığı bir çalışmada agonistin bağlamsal korku koşullanma testinde unutmayı kolaylaştırırken, antagonistin bu etkiyi terse çevirdiği gösterilmiş ve bu sonuçtan yola çıkarak da kötü anıların unutulmasını kolaylaştıran süreçler CB₁ reseptör aktivasyonu ile ilişkilendirilmiştir (150). İnsanlardaki yağ asidi amid hidrolaz enziminin genetik mutasyonuna biyolojik olarak sahip farelerle yapılan bir çalışmada mutant farelerde AEA seviyelerinin arttığı ve unutmanın kolaylaştığı gösterilmiştir (152). Anandamid aynı zamanda TRPV₁ kanallarını aktive etmektedir. Bu kanallarının aktivasyonunun belleğin unutulması süreçlerinde kannabinoidlerden bağımsız bir mekanizma olabileceği düşünülmektedir (153).

Belleğin unutulması süreçleri ile ilgili en büyük tutarsızlık, deney hayvanları ile yapılan çalışmalarda CB₁/CB₂ reseptör agonisti WIN 55,212-2 uygulamasının unutmayı kolaylaştırıcı etkilerinin eksikliğinin tespit edilmiş olmasıdır. Bu çelişkili sonuçların sebebinin aydınlatılması için pek çok çalışma yapılmıştır ve erkek Wistar sıçanlarla yapılan bağlamsal korku koşullanma testinde unutmayı kolaylaştırıcı etkilerin 0,25 mg/kg gibi düşük dozlarda ortaya çıkarken, yüksek dozlarda (2,5 mg/kg) ise bu etkinin görülmediği tespit edilmiştir (150,151). Bu yöndeki etkilerin uygulamanın devamlılığı (tek ya da tekrarlanan), ilaç uygulama yeri (sistemik ya da farklı beyin bölgelerine) gibi diğer faktörler ile ilişkili olup olmadığı henüz araştırılmamıştır. Endokannabinoidler ilişkili bir uyarandan sonra ihtiyaç halinde sentezlenip salıverilmektedirler. İlaçların, endokannabinoidlerin metabolizmaları üzerine olan etkilerini ya da onların reseptörlerinin blokajını yalnızca belirgin etkilerin görüldüğü aktif sinapslarda gerçekleştirdiğini söylemek mümkündür. Bu açıdan bakılacak olursa, selektif etkilerin görülmeişinin WIN 55,212-2 ve diğer CB₁/CB₂ agonistlerinin aktif olmayan sinapslarda kannabinoid reseptörlerini aktive etmesine bağlı olabileceği de düşünülmektedir (151).

Yağ asidi amid hidrolaz enzim inhibitörü URB597 ile farelerde yapılan bir çalışmada endokannabinoid sistem aktivasyonunun bağlamsal korku koşullanmada öğrenme ve geri çağırma etki göstermezken, unutma süreçleri üzerinde belirgin etkiler gösterdiği tespit edilmiştir (153).

In vitro çalışmalarda glukokortikoid uygulamasından sonra hipotalamusta, anandamid ve 2-AG seviyelerinin yükseldiği gösterilmiştir (154). Bu çalışma stresli uyarıların endokannabinoid sinyal mekanizmasında hızlı bir indüksiyon meydana getirmesini destekler niteliktedir.

Bu çalışmada, yüksek doz (3 mg/kg) kronik WIN 55,212-2 uygulamasının farelerde bağlamsal korku koşullanma testinde literatürün aksine belleği pozitif yönde etkilediğini tespit ettik. Bu bulgu kannabinoid agonistleri ve antagonistleri ile genellikle elde edilen sonuçlar ile uyuşmamaktadır. Genel olarak kannabinoidlerin bellek üzerine bozucu bir etkisi olduğu bildirilmektedir. Çalışmamızda kronik WIN 55,212-2 alan hayvanların donma sürelerinde bir artış gözlenmiştir. Bu çelişkili durumun bir açıklaması WIN 55,212-2'nin kronik kullanımı olabilir. Literatürde belirtilen etkilerin genellikle akut verilisle elde edildiğine dikkat etmek gereklidir. Akut ve kronik WIN 55,212-2 verilisinin bağlamsal korku koşullanma üzerinde farklı etkilerinin olup olmadığının incelenmesi bir araştırma konusu olabilir. Çalışmamızda bağlamsal korku koşullanma testinin ilk gününde, ikinci gününde ve her iki gününde JTC-801 alan hayvanların total donma sürelerinde bir fark gözlenmemiştir. Bununla birlikte kronik JTC-801 uygulaması da bellek üzerinde herhangi bir fark yaratmamıştır. Mevcut literatürde de JTC-801'in bellek süreçleri üzerine etkisini konu alan bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Çalışmamızda farelerde kronik WIN 55,212-2 uygulamasının antidepresan etkinliği ve JTC-801 uygulamasının bu etki üzerinde herhangi bir değişiklik meydana getirip getirmediği incelendi. Kronik WIN 55,212-2 uygulanan farelerde kronik çözücü ve serum fizyolojik alan gruplara göre toplam hareketsiz kalınan sürede azalma görülmesine rağmen bu fark istatistiksel olarak anlamlı değildi. Testin ilk gününde JTC-801 uygulanan farelerin toplam hareketsiz kalma sürelerinin çözücü ve serum fizyolojik gruplarına göre daha fazla olduğu testin ikinci gününde JTC-801 uygulanan farelerin toplam hareketsiz kalma sürelerinin çözücü ve serum fizyolojik uygulananlara göre daha az olduğu görüldü; ancak aradaki bu farklar istatistiksel olarak anlamlı boyutta değildi. Testin her iki gününde de JTC-801 uygulanan farelerin toplam hareketsiz kalma sürelerinde de istatistiksel olarak anlamlı fark yoktu. Sonuç olarak çalışmamız, kronik WIN 55,212-2 uygulamasının, zorunlu yüzme testinde istatistiksel anlamlı bir değişiklik oluşturmadığını ortaya koymuştur. Kannabinoid sistemin emosyonel yanıtlar üzerine oluşturduğu etkilerin incelendiği çalışmalarda farklı etkiler bildirebilmektedir. Bu farklılıkların nedeni kullanılan hayvan türlerinin farklı olması, uygulanan ilaçların tipleri, dozları ve verilis sürelerinin farklı olması ve seçilen test yöntemleri arasında farklar bulunmasıdır. Naidu ve ark. (2007) FAAH geni silinmiş farelerin zorunlu yüzme testinde gösterdikleri immobilité sürelerinin normal farelerin gösterdiği sürelerden farklı olmadığını

bildirmişlerdir (155). CB₁ geni silinmiş (*knockout*) farelerle yapılan kronik beklenmeyen stres testinde farelerin depresif yanıt oluşturduğu gösterilmiştir (156). Depresif hastaların kannabis kullandığı bir çalışmanın sonucunda, hastalarda duygudurumda iyileşme ve öforide artış görülmesinin yanında stres, anksiyete ve depresif davranışlarda da azalma olduğu görülmüştür (157). Düşük doz CB₁ reseptör agonisti Δ⁹-THC ve selektif CB₁ reseptör antagonisti SR141716A'nın kullanıldığı CD1 türü erkek farelerde yapılan aydınlık-karanlık kutu testinin sonucunda antagonistin, Δ⁹-THC ile görülen anksiyolitik etkiyi geri çevirdiği gösterilmiştir (132). Genetik olarak CB₁ reseptör eksikliği bulunan farelerle yapılan yükseltilmiş artı labirent testinde deneklerde anhedonik etkiler gözlemlenmesi de kannabinoid sistemin rolünü destekler niteliktedir (158). Yapılan biyokimyasal çalışmalar, depresyonda endokannabinoid eksikliği görüldüğünü desteklemektedir. Örneğin depresif vakalarda sıklıkla görülen kronik stres, CB₁ reseptör sayısını ve aynı zamanda hipokampüste endokannabinoid seviyelerini azaltmaktadır. Bu durum endokannabinoid sistemin strese duyarlı olduğunu ve uzamış streste çalışmayı durdurduğunu göstermektedir (159).

Majör depresyon sıklıkla beyinde serotonerjik aktivitedeki değişiklikler ile karakterizedir (160). Sprague-Dawley türü sıçanların beyin kesitlerinin incelendiği bir çalışmada serotonin'in (5-HT), CB₁ reseptör agonisti WIN 55,212-2'nin reseptöre bağlanmasında düzenleyici rol oynadığı ve 5-HT₂ antagonisti varlığında da WIN 55,212-2'nin reseptöre bağlanmasının inhibe edildiği gösterilmiştir (161). Endokannabinoid geri alım inhibitörleri AM404 ve HU-210, CB₁ reseptör agonisti oleamid, CB₁ reseptör antagonisti AM-251 ve antidepresan etkili desipraminin kullanıldığı, Long-Evans türü erkek sıçanlarda yapılan zorunlu yüzme testinde CB₁ reseptör aktivasyonunun immobilitede belirgin azalma gibi antidepresan etkilere aracılık ettiği gösterilmiştir (162).

Çalışmamızda yüksek doz kronik WIN 55,212-2 uygulanan farelerde açık alan testinde toplam gezilen mesafenin daha az olduğu görüldü, ancak fark istatistiksel olarak anlamlı değildi. Yine bu gruptaki farelerin *rearing* sayılarında ve merkez alanda geçirdikleri sürede de çözücü ve serum fizyolojik uygulanan gruplara göre azalma olduğu görüldü, fakat fark istatistiksel olarak anlamlı boyuta ulaşmadı. Hayvanların keşif davranışlarında azalma görülmesi ve periferde geçirilen sürenin uzaması yüksek doz WIN 55,212-2 uygulamasının anksiyojenik etkinlik yaratması ile ilişkilendirilebilir. Kannabinoid sinyal sistemi anksiyetenin kontrolünde rol almaktadır; ancak bifazik etkilerinden dolayı bunun mekanizması ile ilgili net bir tanım yapmakta güçlük çekilmektedir. Kannabinoid agonistlerinin düşük dozlarda anksiyolitik, yüksek dozlarda ise anksiyojenik etkilerinin olduğu rapor edilmiştir (163). Bunun

yanında endokannabinoid AEA da anksiyete ile ilgili etkilerini TRPV₁ kanalları aracılığı ile göstermektedir (164). Duygusal homeostazisten sorumlu hipokampus, amigdala ve prefrontal korteks gibi farklı beyin yapıları da kannabinoidlerin aracılık ettiği anksiyetenin düzenlenmesinde rol oynamaktadır (165). CB₁ reseptör aktivitesinin anksiyete ile ilgili etkilerinin araştırıldığı CB₁ *knockout* farelerle yapılan bir çalışmada yüksek doz kannabinoid uygulamasının GABAerjik nöronlardaki reseptörleri aktive ederek anksiyojenik etki gösterdiği, buna karşılık düşük dozlarda glutamaterjik nöronlardaki reseptörleri aktive ederek anksiyolitik etkiye aracılık ettiği gösterilmiştir (166).

Wistar türü sıçanlar, C57BL/6 türü ve CB₁ *knockout* farelerle yapılan bir çalışmada hipokampus ile serebellar kortekste CB₁ reseptörlerinin eksprese edildiği ve bunun yanında hipokampusün inhibitör terminallerinde CB₁ reseptörlerinin ekspresyonunun eksitator terminallere oranla 10-20 kat daha fazla olduğu gösterilmiştir (167). CB₁ reseptör agonistlerinin anksiyolitik ya da anksiyojenik etkinlik göstermeleri kronik strese maruz kalma ile ilişkilendirilmiş ve Long-Evans türü erkek sıçanlarla yapılan yükseltilmiş artı labirent testinde kronik strese maruz kalmış sıçanlarda CB₁ reseptör agonisti HU-210'un hem düşük hem de yüksek dozlarının anksiyojenik etki gösterdiği tespit edilmiştir. Yine aynı çalışmada strese maruz kalmayan sıçanlarda HU-210'un düşük dozları anksiyolitik, yüksek dozları da anksiyojenik etkinlik göstermiştir (168). Erkek Wistar türü sıçanlarla yapılan bir başka çalışmada da kronik strese maruziyetin prefrontal kortekste CB₁ reseptör sayısını artırdığı, orta beyinde ise azalttığı gösterilmiştir (169).

Sıçanların hipokampus kesitleri ile yapılan bir çalışmada glutamaterjik sinapslardaki CB₁ reseptörlerinin WIN 55,212-2'ye daha düşük duyarlılık gösterdiği tespit edilmiştir. Yine aynı çalışmada GABAerjik sinapslardaki duyarlılığın bifazik nitelikte olduğu, bir kısım inhibitör sinapsların WIN 55,212-2'ye yüksek duyarlılık gösterirken; bir kısım sinapsların da duyarsız olduğu gösterilmiştir (170). CB₁ *knockout* farelerle yapılan sosyal etkileşim, aydınlık-karanlık kutu ve yükseltilmiş artı labirent testleri ile CB₁ reseptörlerinin anksiyete davranışının düzenlenmesinde önemli rol oynadığı gösterilmiştir (171). CB₁ reseptör antagonistleri SR141716A ve AM-251'in kullanıldığı CB₁ *knockout* farelerle yapılan yükseltilmiş artı labirent testinde, CB₁ reseptörünün anksiyolitik ve anksiyojenik etkilere aracılık ettiği tespit edilmiştir (172). Kannabinoidlerin anksiyete ile ilgili etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada yüksek dozda (5 mg/kg) WIN 55,212-2 uygulamasının açık alan testinde erkek balb/c türü farelerin keşif davranışlarını azaltarak anksiyojenik etkiye sebep olduğu gösterilmiştir (173).

Sonuç olarak, elde ettiğimiz veriler kannabinoid reseptör agonisti WIN 55,212-2'nin kronik olarak uygulanmasının bağlamsal korku koşullanma testinde belleği güçlendirici etkisi olduğunu göstermektedir. Çalışmamızda kronik uygulama ile gözlediğimiz bu etkinin literatürde akut verilişle elde edildiği bildirilen etkiden neden farklı olduğunu açıklamak için ilave çalışmaların yapılması gerekli görünmektedir.

SONUÇLAR

Çalışmamızda farelerde kronik WIN 55,212-2 kullanımının bağlamsal korku koşullanma testinde oluşturduğu değişiklik üzerine nosiseptin reseptör antagonisti JTC-801'in etkisi incelendi. Bağlamsal korku koşullanma testinin dışında farelere açık alan, zorunlu yüzme ve rota-rod performans testleri de uygulandı.

1- Bağlamsal korku koşullanma testinde kronik WIN 55,212-2 uygulanan grubun toplam donma süreleri, çözücü ve serum fizyolojik uygulanan gruplara göre daha uzundu.

2- Bağlamsal korku koşullanma testinde tedavinin 8. gününde, 9. gününde ve tedavinin hem 8. hem de 9. günlerinde JTC-801 alan gruplara karşılık gelen çözücü ve serum fizyolojik gruplarında toplam donma süreleri açısından fark yoktu.

3- Zorunlu yüzme testinde 9 günlük tedavi grupları, 8. gün tedavi grupları, 9. gün tedavi grupları, 8. ve 9. gün tedavi gruplarında toplam hareketsiz kalınan süreler arasında fark yoktu.

4- Açık alan testinde 9 günlük tedavi grupları ve 8. gün tedavi gruplarında toplam gezilen mesafe, merkez alanda geçirdikleri süre ve *rearing* sayıları arasında fark görülmedi.

5- Rota-rod performans testinde 9 günlük tedavi grupları, 8. gün tedavi grupları, 9. gün tedavi grupları, 8. ve 9. gün tedavi gruplarında mil üzerinde en uzun kalınan süreler arasında fark yoktu.

ÖZET

Bu çalışmada farelerde kronik WIN 55,212-2 kullanımının bağlamsal korku koşullanma testinde oluşturduğu değişiklik üzerine nosiseptin reseptör antagonisti JTC-801'in etkisinin incelenmesi amaçlandı.

Balb/c türü 130 adet erkek fare, her grupta 10 hayvan olacak şekilde 13 gruba ayrıldı. Dört gruba 9 gün boyunca intraperitoneal yolla kannabinoid reseptör agonisti WIN 55,212-2 (3 mg/kg, i.p.), nosiseptin reseptör antagonisti JTC-801 (5 mg/kg, i.p.), çözücü veya serum fizyolojik enjeksiyonları yapıldı. Geriye kalan 9 gruba 9 gün boyunca WIN 55,212-2 (3 mg/kg, i.p.) enjeksiyonu uygulandı ve bu gruplardan üç tanesine 8. gün (öğrenme), diğer 3 tanesine 9. gün (bellek) ve geriye kalan son 3 gruba ise hem 8 hem de 9. gün JTC-801 (5 mg/kg, i.p.), çözücü veya serum fizyolojik enjeksiyonu yapıldı. Davranış deneyleri (bağlamsal korku koşullanma testi, rota-rod testi, açık alan testi ve zorunlu yüzme testi) 8. ve 9. günlerde gerçekleştirildi.

Bağlamsal korku koşullanma testinde 9 gün boyunca WIN 55,212-2 uygulanan hayvanların toplam donma sürelerinde istatistiksel düzeyde anlamlı artış olduğu görüldü ($p < 0,05$). JTC-801 uygulanan gruplarda çözücü ve serum fizyolojik alan gruplara göre toplam donma süreleri açısından istatistiksel olarak anlamlı fark görülmedi ($p > 0,05$). Açık alan, zorunlu yüzme ve rota-rod performans testlerinin sonuçlarındaki gruplar arası farklar da istatistiksel düzeyde anlamlı boyutta değildi ($p > 0,05$).

Sonuçlarımız WIN 55,212-2'nin kronik kullanımının belleği güçlendirici etkisinin olduğunu göstermektedir.

Anahtar kelimeler: WIN 55,212-2, JTC-801, bağlamsal korku koşullanma, bellek, nosiseptin/orfanin FQ

EFFECT OF THE NOCICEPTIN RECEPTOR ANTAGONIST JTC-801 ON CHRONIC WIN 55,212-2 INDUCED CHANGES IN CONTEXTUAL FEAR CONDITIONING IN MICE

SUMMARY

In this study, it was aimed to investigate the effects of the nociceptin receptor antagonist JTC-801 on the changes induced by WIN 55,212-2 in the contextual fear conditioning test in mice.

Total 130 male Balb/c mice were divided into 13 groups (n= 10 animals for each group). Four groups were injected with the cannabinoid receptor agonist WIN 55,212-2 (3 mg/kg, i.p.), the nociceptin receptor antagonist JTC-801 (5 mg/kg, i.p.), solvent or saline injections for 9 days. Of the remaining 9 groups of mice, which received WIN 55,212-2 (3 mg/kg, i.p.) for 9 days, 3 groups received JTC-801 (5 mg/kg, i.p.), solvent or saline on the 8th day (acquisition), another 3 groups received the treatments on the 9th day (retention), and the remaining 3 groups received the treatments both on 8th and 9th days. Behavioral tests (contextual fear conditioning test, rota-rod test, open field test, and forced swim test) were done on the days 8 and 9.

There was a statistically significant increase in the total freezing time of the animals treated with WIN 55,212-2 for 9 days in the contextual fear conditioning test ($p < 0.05$). No statistically significant difference in total freezing time was detected in JTC-801 applied groups compared to solvent and saline groups ($p > 0.05$). With respect to results of open field, forced swim test and rota rod test, the differences between the groups were also not statistically significant ($p > 0.05$).

Our results show that chronic use of WIN 55,212-2 has positive effects on memory.

Key words: WIN 55,212-2, JTC-801, contextual fear conditioning, memory, nociceptin/orphanin FQ

KAYNAKLAR

1. Ulugöl A. kannabis bitkisi ve kannabinoidlere giriş. *Turkiye Klinikleri J Pharmacol-Special Topics*. 2018;6(1):1-5.
2. Gündüz Ö. Endokannabinoid Sistem. *Turkiye Klinikleri J Pharmacol Special-Topics*. 2018;6(1):15-24.
3. Andero R. Nociceptin and the nociceptin receptor in learning and memory. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2015;62:45-50.
4. Pertwee RG. Pharmacological Actions of Cannabinoids. In: Pertwee RG (Ed.). *Cannabinoids*. 1st ed. Germany: Springer; 2005. p.1-51.
5. Ghelardini C, Di Cesare Mannelli L, Bianchi E. The pharmacological basis of opioids. *Clin Cases Miner Bone Metab* 2015;12(3):219-21.
6. Trang T, Al-Hasani R, Salvemini D, Salter MW, Gutstein H, Cahill CM. Pain and poppies: the good, the bad, and the ugly of opioid analgesics. *J Neurosci* 2015;35(41):13879-88.
7. Herkenham M, Lynn AB, Johnson MR, Melvin LS, de Costa BR, Rice KC. Characterization and localization of cannabinoid receptors in rat brain: a quantitative in vitro autoradiographic study. *J Neurosci* 1991;11(2):563-83.
8. Mansour A, Fox CA, Akil H, Watson SJ. Opioid-receptor mRNA expression in the rat CNS: anatomical and functional implications. *Trends Neurosci* 1995;18(1):22-9.
9. Sweatt J. The Basic of Psychological Learning and Memory Theory. In: Sweatt J (Ed.). *Mechanism of Memory*. 2nd ed. China: Elsevier; 2010. p.3-23.
10. Berktaş F, Kiroğlu O, Aksu F. Antidepresan ilaçların öğrenme ve bellek mekanizmasına etkileri. *Arch Med Rev J* 2017;26(2):178-206.
11. Keleş E, Çepni S. Beyin ve öğrenme. *Türk Fen Eğitimi Derg* 2006;3(2):66-82.

12. Brem A.K. RK, Pascual-Leone A. Learning and Memory. In: Lozano AM. Hallett M (Eds.). Handbook of Clinical Neurology. 116: Elsevier; 2013. p.693-737.
13. Roediger HL I, Zaromb FM, and Goode MK. A Typology of Memory Terms. In: Byrne JH (Ed.). Concise Learning and Memory: The Editor's Selection. 1st ed. Slovenia: Elsevier; 2009. p.1-13.
14. Smith EE, Grossman M. Multiple systems of category learning. *Neurosci Biobehav Rev* 2008;32(2):249-64.
15. Squire LR, Dede AJ. Conscious and unconscious memory systems. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2015;7(3):021667.
16. Dudai Y. The neurobiology of consolidations, or, how stable is the engram? *Ann Rev Psychol* 2004;55:51-86.
17. Squire LR. The neuropsychology of human memory. *Ann Rev Neurosci* 1982;5:241-73.
18. Squire LR. Declarative and nondeclarative memory: multiple brain systems supporting learning and memory. *J Cognitive Neurosci* 1992;4(3):232-43.
19. Cohen NJ, Squire LR. Preserved learning and retention of pattern-analyzing skill in amnesia: dissociation of knowing how and knowing that. *Science* 1980;210(4466):207-10.
20. Squire L.R. SY. Declarative Memory System: Amnesia. In: Byrne JH (Ed.). Concise Learning and Memory: The Editor's Selection. 1st ed. Slovenia: Elsevier; 2009. p.15-25.
21. Stevens WD WG, Schacter DL. Implicit Memory and Priming. In: Byrne JH (Ed.). Concise Learning and Memory: The Editor's Selection. Slovenia: Elsevier; 2009. p.65-83.
22. Hamm AO, Flor H. Fear learning, fear memory, and psychopathology. *Int Psychophysiol* 2015;98(3 Pt 2):497-8.
23. Izquierdo I, Furini CR, Myskiw JC. Fear Memory. *Physiological Rev* 2016;96(2):695-750.
24. Costanzi M, Cannas S, Saraulli D, Rossi-Arnaud C, Cestari V. Extinction after retrieval: effects on the associative and nonassociative components of remote contextual fear memory. *Learn Mem* 2011;18(8):508-18.
25. Tovote P, Fadok JP, Luthi A. Neuronal circuits for fear and anxiety. *Nat Rev Neurosci* 2015;16(6):317-31.
26. Bergstrom HC. The neurocircuitry of remote cued fear memory. *Neurosci Biobehav Rev* 2016;71:409-17.
27. Karadağ ÇH. Kannabinoidlerin Santral Sinir Sistemine Etkileri. *Turkiye Klinikleri J Pharmacol-Special Topics*. 2018;6(1):25-34.
28. Anagnostaras SG, Gale GD, Fanselow MS. Hippocampus and contextual fear conditioning: recent controversies and advances. *Hippocampus* 2001;11(1):8-17.

29. Nasehi M, Davoudi K, Ebrahimi-Ghiri M, Zarrindast MR. Interplay between serotonin and cannabinoid function in the amygdala in fear conditioning. *Brain Res* 2016;1636:142-51.
30. Johansen JP, Cain CK, Ostroff LE, LeDoux JE. Molecular mechanisms of fear learning and memory. *Cell* 2011;147(3):509-24.
31. King EC, Pattwell SS, Glatt CE, Lee FS. Sensitive periods in fear learning and memory. *Stress* 2014;17(1):13-21.
32. Sotres-Bayon F, Bush DE, LeDoux JE. Acquisition of fear extinction requires activation of NR2B-containing NMDA receptors in the lateral amygdala. *Neuropsychopharmacology* 2007;32(9):1929-40.
33. Sotres-Bayon F, Quirk GJ. Prefrontal control of fear: more than just extinction. *Current Op Neurobiol* 2010;20(2):231-5.
34. Keifer OP, Jr., Hurt RC, Ressler KJ, Marvar PJ. The Physiology of Fear: Reconceptualizing the Role of the Central Amygdala in Fear Learning. *Physiology* 2015;30(5):389-401.
35. LeDoux JE, Iwata J, Cicchetti P, Reis DJ. Different projections of the central amygdaloid nucleus mediate autonomic and behavioral correlates of conditioned fear. *J Neurosci* 1988;8(7):2517-29.
36. Sweatt J. Associative Learning and Unlearning. In: Sweatt J (Ed.). *Mechanism of Memory*. 2nd ed. China: Elsevier; 2010. p.105-27.
37. Sweatt J. Studies of Human Learning and Memory. In: Sweatt J (Ed.). *Mechanism of Memory*. 2nd ed. China: Elsevier; 2010. p.25-47.
38. Yang Y, Wang JZ. From Structure to Behavior in Basolateral Amygdala-Hippocampus Circuits. *Front Neural Circuits*. 2017;11:86.
39. McDonald AJ, Mott DD. Functional neuroanatomy of amygdalohippocampal interconnections and their role in learning and memory. *J Neurosci Res* 2017;95(3):797-820.
40. Song J, Olsen RH, Sun J, Ming GL, Song H. Neuronal Circuitry Mechanisms Regulating Adult Mammalian Neurogenesis. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2016;8(8).
41. Andre CM, Hausman JF, Guerriero G. Cannabis sativa: The Plant of the Thousand and One Molecules. *Frontiers Plant Sci* 2016;7:19.
42. Russo EB. Constituents, history, international control, cultivation, and phenotypes of cannabis. In: Pertwee RG (Ed.). *Handbook of Cannabis*. 1st ed. New York: Oxford University Press; 2014. p.3-22.
43. Basavarajappa BS, Shivakumar M, Joshi V, Subbanna S. Endocannabinoid system in neurodegenerative disorders. *J Neurochem* 2017;142(5):624-48.
44. Idris AI, Ralston SH. Cannabinoids and bone: friend or foe? *Calcified Tissue Int* 2010; 87(4):285-97.

45. Mechoulam R, Gaoni Y. A Total synthesis of dl-delta-1-tetrahydrocannabinol, the active constituent of hashish. *J Am Chem Soc* 1965;87:3273-5.
46. Giacoppo S, Mandolino G, Galuppo M, Bramanti P, Mazzon E. Cannabinoids: new promising agents in the treatment of neurological diseases. *Molecules* 2014;19(11):18781-816.
47. Abrams DI, Jay CA, Shade SB, Vizoso H, Reda H, Press S, et al. Cannabis in painful HIV-associated sensory neuropathy: a randomized placebo-controlled trial. *Neurology* 2007; 68(7):515-21.
48. Pryce G, Baker D. Emerging properties of cannabinoid medicines in management of multiple sclerosis. *Trends Neurosci* 2005;28(5):272-6.
49. Le Foll B, Tyndale RF. Cannabinoids: Friend or foe? *Clin Pharmacol Ther* 2015;97(6): 528-31.
50. Dhopeshwarkar A, Mackie K. CB2 Cannabinoid receptors as a therapeutic target-what does the future hold? *Mol Pharmacol* 2014;86(4):430-7.
51. Topuz RD. Kannabinoidlerin Farmakolojisi. *Turkiye Klinikleri J Pharmacol-Special Topics*. 2018;6(1):6-14.
52. Devane WA, Hanus L, Breuer A, Pertwee RG, Stevenson LA, Griffin G, et al. Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science* 1992;258(5090):1946-9.
53. Mechoulam R, Ben-Shabat S, Hanus L, Ligumsky M, Kaminski NE, Schatz AR, et al. Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. *Biochem Pharmacol* 1995;50(1):83-90.
54. Di Marzo V, DPL, Bisogno T. The Biosynthesis, Fate and Pharmacological Properties of Endocannabinoids. In: Pertwee RG (Ed.). *Cannabinoids*. 1st ed. Germany: Springer; 2005. p.147-85.
55. Wei D, Allsop S, Tye K, Piomelli D. Endocannabinoid Signaling in the Control of Social Behavior. *Trends Neurosci* 2017;40(7):385-96.
56. Cascio MG, Marini P. Biosynthesis and fate of endocannabinoids. *Handbook Exp Pharmacol* 2015;231:39-58.
57. Matsuda LA, Lolait SJ, Brownstein MJ, Young AC, Bonner TI. Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature* 1990;346(6284):561-4.
58. Munro S, Thomas KL, Abu-Shaar M. Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature* 1993;365(6441):61-5.
59. Pertwee RG, Howlett AC, Abood ME, Alexander SP, Di Marzo V, Elphick MR, et al. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXIX. Cannabinoid receptors and their ligands: beyond CB(1) and CB(2). *Pharmacological Rev* 2010;62(4):588-631.

60. Aghazadeh Tabrizi M, Baraldi PG, Borea PA, Varani K. Medicinal chemistry, pharmacology, and potential therapeutic benefits of cannabinoid CB2 receptor agonists. *Chem Rev.* 2016;116(2):519-60.
61. Vemuri VK, Makriyannis A. Medicinal chemistry of cannabinoids. *Clin Pharmacol Ther* 2015;97(6):553-8.
62. Puighermanal E, Busquets-Garcia A, Maldonado R, Ozaita A. Cellular and intracellular mechanisms involved in the cognitive impairment of cannabinoids. *Biol Sci* 2012;367(1607):3254-63.
63. De Carvalho CR, Pamplona FA, Cruz JS, Takahashi RN. Endocannabinoids underlie reconsolidation of hedonic memories in Wistar rats. *Psychopharmacol* 2014;231(7):1417-25.
64. Pietropaolo S, Bellocchio L, Ruiz-Calvo A, Cabanas M, Du Z, Guzman M, et al. Chronic cannabinoid receptor stimulation selectively prevents motor impairments in a mouse model of Huntington's disease. *Neuropharmacol* 2015;89:368-74.
65. Volkow ND, Baler RD, Compton WM, Weiss SR. Adverse health effects of marijuana use. *N Engl J Med* 2014;370(23):2219-27.
66. Deng L, Guindon J, Cornett BL, Makriyannis A, Mackie K, Hohmann AG. Chronic cannabinoid receptor 2 activation reverses paclitaxel neuropathy without tolerance or cannabinoid receptor 1-dependent withdrawal. *Biol Psychiatr* 2015;77(5):475-87.
67. Wiley JL, Marusich JA, Huffman JW. Moving around the molecule: relationship between chemical structure and in vivo activity of synthetic cannabinoids. *Life Sci* 2014;97(1):55-63.
68. Schumacher MA. BA, Way WL. Opioid Analjezikler & Antagonistleri (çeviri A. Ulugol). Katzung BG (Ed.). *Temel ve Klinik Farmakoloji*. 12. baskı. İstanbul: Nobel Tıp Kitap Evleri Tic. Ltd. Şti.;2014. p.543-64.
69. Trescot AM, Datta S, Lee M, Hansen H. Opioid pharmacology. *Pain Physician* 2008;11(2):S133-53.
70. Shang Y, Filizola M. Opioid receptors: Structural and mechanistic insights into pharmacology and signaling. *Eur J Pharmacol* 2015;763(Pt B):206-13.
71. Pert CB, Pasternak G, Snyder SH. Opiate agonists and antagonists discriminated by receptor binding in brain. *Science* 1973;182(4119):1359-61.
72. Pert CB, Snyder SH. Opiate receptor: demonstration in nervous tissue. *Science* 1973;179(4077):1011-4.
73. Kosterlitz HW, Waterfield AA. In vitro models in the study of structure-activity relationships of narcotic analgesics. *Ann Rev Pharmacol* 1975;15:29-47.
74. Brownstein MJ. A brief history of opiates, opioid peptides, and opioid receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90(12):5391-3.

75. Schiff Jr PL. Opium and its alkaloids. *Am J Pharmaceut Education* 2002;66(2):186.
76. Waldhoer M, Bartlett SE, Whistler JL. Opioid receptors. *Ann Rev Biochem* 2004;73:953-90.
77. Khademi H, Kamangar F, Brennan P, Malekzadeh R. Opioid therapy and its side effects: A review. *Arch Iranian Med* 2016;19(12):870-6.
78. Massotte D. In vivo opioid receptor heteromerization: where do we stand? *British J Pharmacol* 2015;172(2):420-34.
79. Walwyn WM, Miotto KA, Evans CJ. Opioid pharmaceuticals and addiction: the issues, and research directions seeking solutions. *Drug Alcohol Depend* 2010;108(3):156-65.
80. Raynor K, Kong H, Chen Y, Yasuda K, Yu L, Bell GI, et al. Pharmacological characterization of the cloned kappa-, delta-, and mu-opioid receptors. *Mol Pharmacol* 1994;45(2):330-4.
81. Mollereau C, Parmentier M, Mailleux P, Butour JL, Moisand C, Chalon P, et al. ORL1, a novel member of the opioid receptor family. Cloning, functional expression and localization. *FEBS Lett.* 1994;341(1):33-8.
82. Witkin JM, Statnick MA, Rorick-Kehn LM, Pintar JE, Ansonoff M, Chen Y, et al. The biology of Nociceptin/Orphanin FQ (N/OFQ) related to obesity, stress, anxiety, mood, and drug dependence. *Pharmacol Ther.* 2014;141(3):283-99.
83. Lachowicz JE, Shen Y, Monsma FJ, Jr., Sibley DR. Molecular cloning of a novel G protein-coupled receptor related to the opiate receptor family. *J Neurochem* 1995;64(1):34-40.
84. Meunier JC, Mollereau C, Toll L, Suaudeau C, Moisand C, Alvinerie P, et al. Isolation and structure of the endogenous agonist of opioid receptor-like ORL1 receptor. *Nature* 1995;377(6549):532-5.
85. Reinscheid RK, Nothacker HP, 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):792-4.
86. Toll L, Bruchas MR, Calo G, Cox BM, Zaveri NT. Nociceptin/Orphanin FQ Receptor Structure, Signaling, Ligands, Functions, and Interactions with Opioid Systems. *Pharmacological Rev* 2016;68(2):419-57.
87. Calo G, Guerrini R, Rizzi A, Salvadori S, Regoli D. Pharmacology of nociceptin and its receptor: a novel therapeutic target. *Br J Pharmacol* 2000;129(7):1261-83.
88. Saito Y, Maruyama K, Saido TC, Kawashima S. N23K, a gene transiently up-regulated during neural differentiation, encodes a precursor protein for a newly identified neuropeptide nociceptin. *Biochem Biophysical Res Commun* 1995;217(2):539-45.
89. Rekik K, Faria Da Silva R, Colom M, Pacifico S, Zaveri NT, Calo G, et al. Activation of nociceptin/orphanin FQ receptors inhibits contextual fear memory reconsolidation. *Neuropharmacology* 2017;125:39-49.

90. Meunier JC. Nociceptin/orphanin FQ and the opioid receptor-like ORL1 receptor. *Eur J Pharmacol* 1997;340(1):1-15.
91. Terenius L, Sandin J, Sakurada T. Nociceptin/orphanin FQ metabolism and bioactive metabolites. *Peptides* 2000;21(7):919-22.
92. Meis S. Nociceptin/orphanin FQ: actions within the brain. *Neuroscientist* 2003;9(2):158-68.
93. Meunier J, Mouldous L, Topham CM. The nociceptin (ORL1) receptor: molecular cloning and functional architecture. *Peptides* 2000;21(7):893-900.
94. Schlicker E, Morari M. Nociceptin/orphanin FQ and neurotransmitter release in the central nervous system. *Peptides* 2000;21(7):1023-9.
95. Malfacini D, Ambrosio C, Gro MC, Sbraccia M, Trapella C, Guerrini R, et al. Pharmacological profile of nociceptin/orphanin FQ receptors interacting with G-Proteins and beta-Arrestins 2. *PloS One*. 2015;10(8):e0132865.
96. Lambert DG. The nociceptin/orphanin FQ receptor: a target with broad therapeutic potential. *Nature Rev Drug Discovery* 2008;7(8):694-710.
97. Leggett JD, Dawe KL, Jessop DS, Fulford AJ. Endogenous nociceptin / orphanin FQ system involvement in hypothalamic-pituitary-adrenal axis responses: relevance to models of inflammation. *J Neuroendocrinol* 2009;21(11):888-97.
98. Childers SR, Creese I, Snowman AM, Synder SH. Opiate receptor binding affected differentially by opiates and opioid peptides. *Eur J Pharmacol* 1979;55(1):11-8.
99. Connor M, Christie MJ. Modulation of Ca²⁺ channel currents of acutely dissociated rat periaqueductal grey neurons. *J Physiol* 1998;509(1):47-58.
100. Zhang NR, Planer W, Siuda ER, Zhao HC, Stickler L, Chang SD, et al. Serine 363 is required for nociceptin/orphanin FQ opioid receptor (NOPR) desensitization, internalization, and arrestin signaling. *J Biological Chem* 2012;287(50):42019-30.
101. Calo G, Rizzi A, Bigoni R, Guerrini R, Salvadori S, Regoli D. Pharmacological profile of nociceptin/orphanin FQ receptors. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2002;29(3):223-8.
102. Scavone JL, Sterling RC, Van Bockstaele EJ. Cannabinoid and opioid interactions: implications for opiate dependence and withdrawal. *Neuroscience* 2013;248:637-54.
103. Vigano D, Grazia Cascio M, Rubino T, Fezza F, Vaccani A, Di Marzo V, et al. Chronic morphine modulates the contents of the endocannabinoid, 2-arachidonoyl glycerol, in rat brain. *Neuropsychopharmacol* 2003;28(6):1160-7.
104. Vigano D, Rubino T, Parolaro D. Molecular and cellular basis of cannabinoid and opioid interactions. *Pharmacol Biochem Behav* 2005;81(2):360-8.
105. Bushlin I, Rozenfeld R, Devi LA. Cannabinoid-opioid interactions during neuropathic pain and analgesia. *Curr Opin Pharmacol* 2010;10(1):80-6.

106. Befort K. Interactions of the opioid and cannabinoid systems in reward: Insights from knockout studies. *Frontiers Pharmacol* 2015;6:6.
107. Robledo P, Berrendero F, Ozaita A, Maldonado R. Advances in the field of cannabinoid--opioid cross-talk. *Addiction Biol* 2008;13(2):213-24.
108. Childers SR, Fleming L, Konkoy C, Marckel D, Pacheco M, Sexton T, et al. Opioid and cannabinoid receptor inhibition of adenylyl cyclase in brain. *Ann New York Acad Sci* 1992;654:33-51.
109. Fattore L, Deiana S, Spano SM, Cossu G, Fadda P, Scherma M, et al. Endocannabinoid system and opioid addiction: behavioural aspects. *Pharmacol Biochem Behav* 2005;81(2):343-59.
110. Manzanares J, Corchero J, Romero J, Fernandez-Ruiz JJ, Ramos JA, Fuentes JA. Pharmacological and biochemical interactions between opioids and cannabinoids. *Trends Pharmacol Sci* 1999;20(7):287-94.
111. Wills KL, Parker LA. Effect of Pharmacological Modulation of the Endocannabinoid System on Opiate Withdrawal: A Review of the Preclinical Animal Literature. *Frontiers Pharmacol* 2016;7:187.
112. Schlicker E, Kathmann M. Modulation of transmitter release via presynaptic cannabinoid receptors. *Trends Pharmacol Sci* 2001;22(11):565-72.
113. Parolaro D, Rubino T, Vigano D, Massi P, Guidali C, Realini N. Cellular mechanisms underlying the interaction between cannabinoid and opioid system. *Current Drug Targets* 2010;11(4):393-405.
114. Corchero J, Fuentes JA, Manzanares J. delta 9-Tetrahydrocannabinol increases proopiomelanocortin gene expression in the arcuate nucleus of the rat hypothalamus. *Eur J Pharmacol* 1997;323(2-3):193-5.
115. Valverde O, Noble F, Beslot F, Dauge V, Fournie-Zaluski MC, Roques BP. Delta9-tetrahydrocannabinol releases and facilitates the effects of endogenous enkephalins: reduction in morphine withdrawal syndrome without change in rewarding effect. *Eur J Neurosci* 2001;13(9):1816-24.
116. Pugh G, Jr., Smith PB, Dombrowski DS, Welch SP. The role of endogenous opioids in enhancing the antinociception produced by the combination of delta 9-tetrahydrocannabinol and morphine in the spinal cord. *J Pharmacol Exp Ther* 1996;279(2):608-16.
117. Kumar AM, Haney M, Becker T, Thompson ML, Kream RM, Miczek K. Effect of early exposure to delta-9-tetrahydrocannabinol on the levels of opioid peptides, gonadotropin-releasing hormone and substance P in the adult male rat brain. *Brain Res* 1990;525(1):78-83.
118. Bloom AS, Dewey WL. A comparison of some pharmacological actions of morphine and delta9-tetrahydrocannabinol in the mouse. *Psychopharmacology* 1978;57(3):243-8.

119. Smith FL, Cichewicz D, Martin ZL, Welch SP. The enhancement of morphine antinociception in mice by delta9-tetrahydrocannabinol. *Pharmacol Biochem Behav* 1998;60(2):559-66.
120. Cichewicz DL, Martin ZL, Smith FL, Welch SP. Enhancement mu opioid antinociception by oral delta9-tetrahydrocannabinol: dose-response analysis and receptor identification. *J Pharmacol Exp Ther* 1999;289(2):859-67.
121. Bhargava HN. Inhibition of naloxone-induced withdrawal in morphine dependent mice by 1-trans-delta9-tetrahydrocannabinol. *Euro J Pharmacol* 1976;36(1):259-62.
122. Hine B, Friedman E, Torrelío M, Gershon S. Morphine-dependent rats: blockade of precipitated abstinence by tetrahydrocannabinol. *Science* 1975;187(4175):443-5.
123. Vela G, Ruiz-Gayo M, Fuentes JA. Anandamide decreases naloxone-precipitated withdrawal signs in mice chronically treated with morphine. *Neuropharmacology* 1995;34(6):665-8.
124. Hirschhorn ID, Rosecrans JA. Morphine and delta 9-tetrahydrocannabinol: tolerance to the stimulus effects. *Psychopharmacologia* 1974;36(3):243-53.
125. Navarro M, Chowen J, Rocio ACM, del Arco I, Villanua MA, Martin Y, et al. CB1 cannabinoid receptor antagonist-induced opiate withdrawal in morphine-dependent rats. *Neuroreport* 1998;9(15):3397-402.
126. Chaperon F, Soubrie P, Puech AJ, Thiebot MH. Involvement of central cannabinoid (CB1) receptors in the establishment of place conditioning in rats. *Psychopharmacology* 1998;135(4):324-32.
127. Braidá D, Pozzi M, Parolaro D, Sala M. Intracerebral self-administration of the cannabinoid receptor agonist CP 55,940 in the rat: interaction with the opioid system. *Eur J Pharmacol* 2001;413(2-3):227-34.
128. Tanda G, Munzar P, Goldberg SR. Self-administration behavior is maintained by the psychoactive ingredient of marijuana in squirrel monkeys. *Nature Neurosci* 2000;3(11):1073-4.
129. Chen JP, Paredes W, Li J, Smith D, Lowinson J, Gardner EL. Delta 9-tetrahydrocannabinol produces naloxone-blockable enhancement of presynaptic basal dopamine efflux in nucleus accumbens of conscious, freely-moving rats as measured by intracerebral microdialysis. *Psychopharmacology* 1990;102(2):156-62.
130. Arnone M, Maruani J, Chaperon F, Thiebot MH, Poncelet M, Soubrie P, et al. Selective inhibition of sucrose and ethanol intake by SR 141716, an antagonist of central cannabinoid (CB1) receptors. *Psychopharmacology* 1997;132(1):104-6.
131. Kirkham TC, Williams CM. Synergistic effects of opioid and cannabinoid antagonists on food intake. *Psychopharmacology* 2001;153(2):267-70.
132. Berrendero F, Maldonado R. Involvement of the opioid system in the anxiolytic-like effects induced by Delta(9)-tetrahydrocannabinol. *Psychopharmacology* 2002;163(1):111-7.

133. Manzanares J, Corchero J, Fuentes JA. Opioid and cannabinoid receptor-mediated regulation of the increase in adrenocorticotropin hormone and corticosterone plasma concentrations induced by central administration of delta(9)-tetrahydrocannabinol in rats. *Brain Res* 1999;839(1):173-9.
134. Cadoni C, Pisanu A, Solinas M, Acquas E, Di Chiara G. Behavioural sensitization after repeated exposure to Delta 9-tetrahydrocannabinol and cross-sensitization with morphine. *Psychopharmacology* 2001;158(3):259-66.
135. Thorat SN, Bhargava HN. Evidence for a bidirectional cross-tolerance between morphine and delta 9-tetrahydrocannabinol in mice. *Eur J Pharmacol* 1994;260(1):5-13.
136. Corchero J, Oliva JM, Garcia-Lecumberri C, Martin S, Ambrosio E, Manzanares J. Repeated administration with Delta9-tetrahydrocannabinol regulates mu-opioid receptor density in the rat brain. *J Psychopharmacol* 2004;18(1):54-8.
137. Kruk-Slomka M, Dzik A, Budzynska B, Biala G. Endocannabinoid System: the direct and indirect involvement in the memory and learning processes-a short review. *Mol Neurobiol* 2017;54(10):8332-47.
138. Pamplona FA, Takahashi RN. WIN 55212-2 impairs contextual fear conditioning through the activation of CB1 cannabinoid receptors. *Neurosci Lett* 2006;397(1-2):88-92.
139. Kim JJ, Fanselow MS. Modality-specific retrograde amnesia of fear. *Science* 1992;256(5057):675-7.
140. Phillips RG, LeDoux JE. Differential contribution of amygdala and hippocampus to cued and contextual fear conditioning. *Behav Neurosci* 1992;106(2):274-85.
141. Yim TT, Hong NS, Ejaredar M, McKenna JE, McDonald RJ. Post-training CB1 cannabinoid receptor agonist activation disrupts long-term consolidation of spatial memories in the hippocampus. *Neuroscience* 2008;151(4):929-36.
142. Takahashi RN, Pamplona FA, Fernandes MS. The cannabinoid antagonist SR141716A facilitates memory acquisition and consolidation in the mouse elevated T-maze. *Neurosci Lett* 2005;380(3):270-5.
143. Mallet PE, Beninger RJ. The cannabinoid CB1 receptor antagonist SR141716A attenuates the memory impairment produced by delta9-tetrahydrocannabinol or anandamide. *Psychopharmacology* 1998;140(1):11-9.
144. Braidia D, Sala M. Cannabinoid-induced working memory impairment is reversed by a second generation cholinesterase inhibitor in rats. *Neuroreport* 2000;11(9):2025-9.
145. Varvel SA, Lichtman AH. Evaluation of CB1 receptor knockout mice in the Morris water maze. *J Pharmacol Exp Ther* 2002;301(3):915-24.
146. Chhatwal JP, Ressler KJ. Modulation of fear and anxiety by the endogenous cannabinoid system. *CNS spectr* 2007;12(3):211-20.

147. Tan H, Lauzon NM, Bishop SF, Chi N, Bechard M, Laviolette SR. Cannabinoid transmission in the basolateral amygdala modulates fear memory formation via functional inputs to the prelimbic cortex. *J Neurosci* 2011;31(14):5300-12.
148. Chhatwal JP, Davis M, Maguschak KA, Ressler KJ. Enhancing cannabinoid neurotransmission augments the extinction of conditioned fear. *Neuropsychopharmacology* 2005;30(3):516-24.
149. Suzuki A, Josselyn SA, Frankland PW, Masushige S, Silva AJ, Kida S. Memory reconsolidation and extinction have distinct temporal and biochemical signatures. *J Neurosci* 2004;24(20):4787-95.
150. Pamplona FA, Prediger RD, Pandolfo P, Takahashi RN. The cannabinoid receptor agonist WIN 55,212-2 facilitates the extinction of contextual fear memory and spatial memory in rats. *Psychopharmacology* 2006;188(4):641-9.
151. Stern CAJ, de Carvalho CR, Bertoglio LJ, Takahashi RN. Effects of Cannabinoid Drugs on Aversive or Rewarding Drug-Associated Memory Extinction and Reconsolidation. *Neuroscience* 2018;370:62-80.
152. Dincheva I, Drysdale AT, Hartley CA, Johnson DC, Jing D, King EC, et al. FAAH genetic variation enhances fronto-amygdala function in mouse and human. *Nature Commun* 2015;6:6395.
153. Laricchiuta D, Centonze D, Petrosini L. Effects of endocannabinoid and endovanilloid systems on aversive memory extinction. *Behavioural Brain Res* 2013;256:101-7.
154. Di S, Malcher-Lopes R, Marcheselli VL, Bazan NG, Tasker JG. Rapid glucocorticoid-mediated endocannabinoid release and opposing regulation of glutamate and gamma-aminobutyric acid inputs to hypothalamic magnocellular neurons. *Endocrinology* 2005;146(10):4292-301.
155. Naidu PS, Varvel SA, Ahn K, Cravatt BF, Martin BR, Lichtman AH. Evaluation of fatty acid amide hydrolase inhibition in murine models of emotionality. *Psychopharmacology* 2007;192(1):61-70.
156. Martin M, Ledent C, Parmentier M, Maldonado R, Valverde O. Involvement of CB1 cannabinoid receptors in emotional behaviour. *Psychopharmacology* 2002;159(4):379-87.
157. Gruber AJ, Pope HG, Jr., Brown ME. Do patients use marijuana as an antidepressant? *Depression* 1996;4(2):77-80.
158. Haller J, Bakos N, Szirmay M, Ledent C, Freund TF. The effects of genetic and pharmacological blockade of the CB1 cannabinoid receptor on anxiety. *Euro J Neurosci* 2002;16(7):1395-8.
159. Hill MN, Patel S, Carrier EJ, Rademacher DJ, Ormerod BK, Hillard CJ, et al. Downregulation of endocannabinoid signaling in the hippocampus following chronic unpredictable stress. *Neuropsychopharmacology* 2005;30(3):508-15.
160. Owens MJ, Nemeroff CB. Role of serotonin in the pathophysiology of depression: focus on the serotonin transporter. *Clin Chem* 1994;40(2):288-95.

161. Devlin MG, Christopoulos A. Modulation of cannabinoid agonist binding by 5-HT in the rat cerebellum. *J Neurochem* 2002;80(6):1095-102.
162. Hill MN, Gorzalka BB. Pharmacological enhancement of cannabinoid CB1 receptor activity elicits an antidepressant-like response in the rat forced swim test. *Eur Neuropsychopharmacol* 2005;15(6):593-9.
163. Viveros MP, Marco EM, File SE. Endocannabinoid system and stress and anxiety responses. *Pharmacol Biochem Behav* 2005;81(2):331-42.
164. Moreira FA, Aguiar DC, Terzian AL, Guimaraes FS, Wotjak CT. Cannabinoid type 1 receptors and transient receptor potential vanilloid type 1 channels in fear and anxiety-two sides of one coin? *Neuroscience* 2012;204:186-92.
165. Rubino T, Guidali C, Vigano D, Realini N, Valenti M, Massi P, et al. CB1 receptor stimulation in specific brain areas differently modulate anxiety-related behaviour. *Neuropharmacology* 2008;54(1):151-60.
166. Rey AA, Purrio M, Viveros MP, Lutz B. Biphasic effects of cannabinoids in anxiety responses: CB1 and GABA(B) receptors in the balance of GABAergic and glutamatergic neurotransmission. *Neuropsychopharmacology* 2012;37(12):2624-34.
167. Kawamura Y, Fukaya M, Maejima T, Yoshida T, Miura E, Watanabe M, et al. The CB1 cannabinoid receptor is the major cannabinoid receptor at excitatory presynaptic sites in the hippocampus and cerebellum. *J Neurosci* 2006;26(11):2991-3001.
168. Hill MN, Gorzalka BB. Enhancement of anxiety-like responsiveness to the cannabinoid CB(1) receptor agonist HU-210 following chronic stress. *Euro J Pharmacol* 2004;499(3):291-5.
169. Bortolato M, Mangieri RA, Fu J, Kim JH, Arguello O, Duranti A, et al. Antidepressant-like activity of the fatty acid amide hydrolase inhibitor URB597 in a rat model of chronic mild stress. *Biol Psychiatry* 2007;62(10):1103-10.
170. Ohno-Shosaku T, Tsubokawa H, Mizushima I, Yoneda N, Zimmer A, Kano M. Presynaptic cannabinoid sensitivity is a major determinant of depolarization-induced retrograde suppression at hippocampal synapses. *J Neurosci* 2002;22(10):3864-72.
171. Uriguen L, Perez-Rial S, Ledent C, Palomo T, Manzanares J. Impaired action of anxiolytic drugs in mice deficient in cannabinoid CB1 receptors. *Neuropharmacology* 2004;46(7):966-73.
172. Haller J, Varga B, Ledent C, Freund TF. CB1 cannabinoid receptors mediate anxiolytic effects: convergent genetic and pharmacological evidence with CB1-specific agents. *Behav Pharmacol* 2004;15(4):299-304.
173. Rutkowska M, Jamontt J, Gliniak H. Effects of cannabinoids on the anxiety-like response in mice. *Pharmacol Rep* 2006;58(2):200.

ŞEKİLLER LİSTESİ

ŞEKİLLER

Şekil 1. Uzun süreli bellek sınıflandırılması ve ilgili beyin yapıları.....	4
Şekil 2. Korku yanıtının oluşması (A) ve sönmesinde (B) rol oynayan yapıların basitleştirilmiş şeması.....	7
Şekil 3. Trisinaptik devre	8
Şekil 4. FCS 21200-R düzeneği: kafes (sol) ve yazılım (sağ).....	22
Şekil 5. Rota-rod cihazı.....	23
Şekil 6. Açık alan test düzeneğinde kayıt.....	24
Şekil 7. Zorunlu yüzme test düzeneği	25
Şekil 8. Bağlamsal korku koşullanma testinde toplam donma süreleri.....	27
Şekil 9. Zorunlu yüzme testi toplam hareketsiz kalınan süre.....	28
Şekil 10. Açık alan testi toplam gezilen mesafe.....	29
Şekil 11. Açık alan testi merkez alanda geçirilen süre.....	29
Şekil 12. Açık alan testi <i>rearing</i> sayısı	30
Şekil 13. Rota rod testi mil üzerinde kalınan en uzun süre	31

TABLolar

Tablo 1. Kannabis bitkisinin içeriğindeki bileşiklerin sınıflandırılması.....	10
Tablo 2. Kannabinoid reseptörlerinin sinyal iletim mekanizmaları.....	12
Tablo 3. Opioid reseptörleri ve agonist/antagonistleri	14
Tablo 4. Çalışma grupları ve uygulanan enjeksiyonlar	20
Tablo 5. Ajanlar ve doz, enjeksiyon hacmi, katalog bilgileri	20
Tablo 6. Tedavi grupları ve yapılan uygulamalar	26

ÖZGEÇMİŞ

1989 yılında Edirne'nin Uzunköprü ilçesinde doğdum. İlköğretim ve ortaöğretimimi Uzunköprü'de tamamladım. Lisans eğitimimi İstanbul Marmara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi'nde tamamlayarak 2012 yılında mezun oldum. 2012-2013 yılları arasında Yeditepe Üniversitesi Hastanesi Klinik Eczacılık Hizmetleri biriminde görev yaptım. 2013 yılında halen bünyesinde bulunduğum Edirne Uzunköprü Devlet Hastanesi'nde göreve başladım. 2015 yılında Trakya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans programına başladım.

EKLER

Ek 1



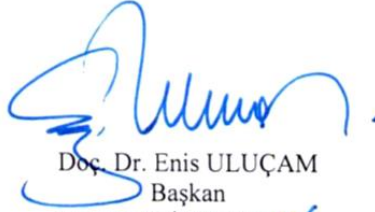
T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu
(Trakya University, Local Ethics Committee of Animal Experiments)

Oturum Sayısı: 2016/02

Karar Tarihi: 29.01.2016

KARAR NO: 2016.02.08

Yürütücülüğünü Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi öğretim üyesi Prof. Dr. Çetin Hakan KARADAĞ'ın yaptığı, Ecz. Sinem YILMAZ' ın Yüksek Lisans tezi olarak planlanan TÜHADYEK-2016/11 protokol nolu "Farelerde kronik WIN 55,212-2 kullanımının bağlamsal korku koşullanma testinde oluşturduğu değişiklik üzerine nosiseptin reseptör antagonisti JTC-801'in etkisi" başlıklı çalışma görüşüldü. Araştırmanın amaç, yaklaşım, gereç ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmesi sonucunda; Hayvan deneyleri yerel etik kurulu yönergesinde belirtilen ilke ve kurallara uygun bulunarak, çalışmanın yapılabileceğine mevcudun oy birliği ile karar verilmiştir.



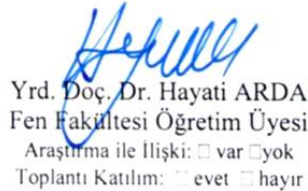
Doç. Dr. Enis ULUÇAM
Başkan

Araştırma ile İlişki: var yok
Toplantı Katılım: evet hayır



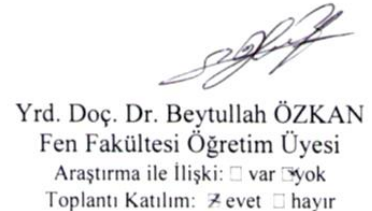
Vet. Hekim Ziya ÇUKUR
Vet. Hek. Üye

Araştırma ile İlişki: var yok
Toplantı Katılım: evet hayır



Yrd. Doç. Dr. Hayati ARDA
Fen Fakültesi Öğretim Üyesi

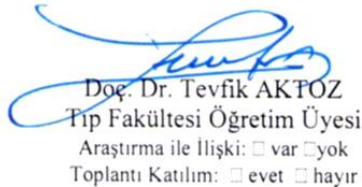
Araştırma ile İlişki: var yok
Toplantı Katılım: evet hayır



Yrd. Doç. Dr. Beytullah ÖZKAN
Fen Fakültesi Öğretim Üyesi

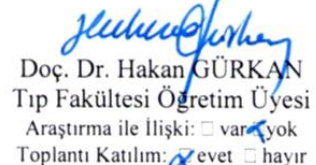
Araştırma ile İlişki: var yok
Toplantı Katılım: evet hayır

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



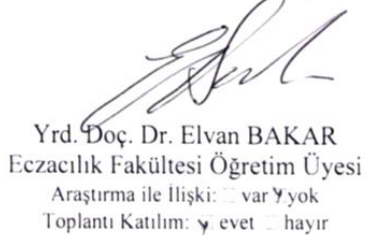
Doç. Dr. Tevfik AKTOZ
Tıp Fakültesi Öğretim Üyesi

Araştırma ile İlişki: var yok
Toplantı Katılım: evet hayır



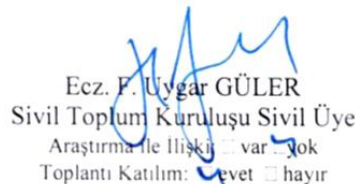
Doç. Dr. Hakan GÜRKAN
Tıp Fakültesi Öğretim Üyesi

Araştırma ile İlişki: var yok
Toplantı Katılım: evet hayır



Yrd. Doç. Dr. Elvan BAKAR
Eczacılık Fakültesi Öğretim Üyesi

Araştırma ile İlişki: var yok
Toplantı Katılım: evet hayır



Ecz. F. Uygur GÜLER
Sivil Toplum Kuruluşu Sivil Üye

Araştırma ile İlişki: var yok
Toplantı Katılım: evet hayır

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