



**T.C.
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ
ENSTİTÜSÜ
VETERİNER FAKÜLTESİ
FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI**



**OPIOİD KULLANIMININ
MİKROBİYOM-BAĞIRSAK-BEYİN AKSI ÜZERİNE ETKİLERİ**

EDA KÖŞELİ

(DOKTORA TEZİ)

BURSA-2022





T.C.
BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
VETERİNER FAKÜLTESİ
FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI



**OPIOİD KULLANIMININ
MİKROBİYOM-BAĞIRSAK-BEYİN AKSI ÜZERİNE ETKİLERİ**

EDA KÖŞELİ

(DOKTORA TEZİ)

DANIŞMAN:
Prof.Dr. Cenk AYDIN

YÖK 100/2000
TÜBİTAK 2214-A/ 2211-C

BURSA-2022

T.C.
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ETİK BEYANI

Doktora tezi olarak sunduğum “Opioid Kullanımının Mikrobiyom-Bağırsak-Beyin Aksı Üzerine Etkileri” adlı çalışmanın, proje safhasından sonuçlanmasına kadar geçen bütün süreçlerde bilimsel etik kurallarına uygun bir şekilde hazırlandığını ve yararlandığım eserlerin kaynaklar bölümünde gösterilenlerden oluştuğunu belirtir ve beyan ederim.

Adı Soyadı

Eda Köşeli

Tarih ve İmza

TEZ KONTROL ve BEYAN FORMU

...../...../.....

Adı Soyadı: Eda Köşeli

Anabilim Dalı: Veteriner/ Fizyoloji

Tez Konusu: Opioid Kullanımının Mikrobiyom-Bağırsak-Beyin Aksı Üzerine Etkileri

<u>ÖZELLİKLER</u>	<u>UYGUNDUR</u>	<u>UYGUN</u>	<u>AÇIKLAMA</u>
		<u>DEĞİLDİR</u>	
Tezin Boyutları	X	☐	
Dış Kapak Sayfası	X	☐	
İç Kapak Sayfası	X	☐	
Kabul Onay Sayfası	X	☐	
Sayfa Düzeni	X	☐	
İçindekiler Sayfası	X	☐	
Yazı Karakteri	X	☐	
Satır Aralıkları	X	☐	
Başlıklar	X	☐	
Sayfa Numaraları	X	☐	
Eklerin Yerleştirilmesi	X	☐	
Tabloların Yerleştirilmesi	X	☐	
Kaynaklar	X	☐	

DANIŞMAN ONAYI

Ünvanı Adı Soyadı:

Prof. Dr. Cenk AYDIN

İmza:

İÇİNDEKİLER

Dış Kapak	
İç Kapak	
ETİK BEYAN.....	II
TEZ KONTROL BEYAN FORMU.....	III
İÇİNDEKİLER.....	IV
TÜRKÇE ÖZET.....	VI
İNGİLİZCE ÖZET.....	VII
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	5
2.1. Mikrobiyota-Bağırsak-Beyin Aksı.....	5
2.2. Bağırsak Mikrobiyomu	6
2.3. Kısa Zincirli Yağ Asitleri.....	7
2.4. Opioid Kullanımı.....	9
2.4.1. Tarihçesi.....	9
2.4.2. Opioidlerin Farmakolojik Etkileri.....	11
2.4.3. Kullanım Alanı ve Yan Etkileri.....	11
2.4.4. Kronik Morfinin Uygulamasının Gastrointestinal Sistem Üzerine Etkisi....	14
2.4.5. Kronik Opioid Uygulamasının Bağırsak Mikrobiyotası Üzerine Etkisi.....	15
2.4.6. Kronik Opioid Uygulamasının Kısa Zincirli Yağ Asitleri Üzerine Etkisi.....	17
2.5. Bağırsak Bariyer Bütünlüğü.....	18
2.6. İnterlökin (IL-18).....	20
2.7. Yuva Yapma Davranışı.....	22
2.8. Tolerans Gelişiminin Ağrı Uyarınlı Davranış Testi ile Ölçümü.....	23
3. GEREÇ ve YÖNTEM.....	25
3.1. <i>İn-vivo</i> ilaç Uygulamaları.....	25
3.1.1. Kronik Morfin Uygulamaları.....	25
3.1.1.1. Pelet Yöntemi.....	25
3.1.1.2. Artan Dozlarda Morfin Uygulaması.....	25
3.1.1.3. Günlük Morfin Uygulaması.....	26
3.1.2. Mü-opioid Reseptör Blokajı.....	26
3.1.3. Bağırsak Mikrobiyotasını Değiştirmek için Yapılan Bütirik asit ve Vankomisin Uygulamaları.....	26
3.2. Davranış Testleri.....	26
3.2.1. Kuyruk Daldırma Testi.....	26
3.2.2. Yuva Yapma Davranış Testi.....	27
3.3. <i>Ex-vivo</i> İlaç Uygulamaları.....	28
3.3.1. Latin Kare (Latin Square) Metodu.....	28
3.3.2. Durum Ortamı (Condition Media-CM) Yöntemi.....	31
3.4. Longitudinal Muscle Myenteric Plexus (LMMP) İzolasyonu.....	33
3.5. RNA İzolasyonu ve Nicel Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Real-Time qPCR)	34
3.6. İstatistiksel Analiz.....	35
4. BULGULAR.....	36

4.1. Morfine Karşı Gelişen Antinoseptif Toleransın Değerlendirilmesi.....	36
4.2. Morfine Karşı Gelişen Antinoseptif Toleransın Bütirik asit ve Vankomisin Uygulamaları ile Değerlendirilmesi.....	36
4.3. Morfin Uygulamasının Yuva Yapma Davranışına Etkisi.....	37
4.3.1. Günlük Morfin Uygulaması.....	37
4.3.2. Morfin Pelet Uygulaması.....	38
4.4. Yuva Yapma Davranışının Bütirik asit ve Vankomisin Uygulamaları ile Değerlendirilmesi.....	38
4.5. Kronik Morfin Uygulamasının IL-18 Salınımına Etkisi.....	42
4.6. Morfin Aracılı IL-18 Salınımının Etki Mekanizması.....	42
4.6.1. Longitudinal Muscle Myenteric Plexus (LMMP) İzolasyonu ile Değerlendirilmesi	42
4.6.2. Lantin Square ve Condition Media Methodları ile Değerlendirilmesi.....	43
5. TARTIŞMA ve SONUÇ.....	45
6. KAYNAKLAR.....	53
7. SİMGELER VE KISALTMALAR.....	65
8. TEŞEKKÜR.....	68
9. ÖZGEÇMİŞ.....	70

TÜRKÇE ÖZET

Bağırsak mikrobiyomu ve metabolitlerinin hastalık oluşum ve prognozunda önemli rol oynadıklarının ortaya çıkmasıyla bu alanda yapılan çalışmaların sayısı da giderek artmaktadır. Opioid ilaçların kullanımı ve buna bağlı ölümle sonuçlanabilen yan etkilerinin artması ise tolerans gelişim mekanizmalarının aydınlatılması gerekliliğini ortaya çıkarmıştır. Kronik morfin kullanımı ile gelişen toleransın pek çok nedeni olsa da, bağırsak mikrobiyotasının kompozisyon bozukluğu (disbiyozis), tolerans yolaklarının anlaşılmasında halen en önemli başlıktır. Bağırsak mikrobiyotasının sistemik etkileri ve hangi mekanizmalarla bu işlevleri yerine getirdiği tam olarak aydınlatılamamıştır. Mevcut literatür ışığında, bağırsak bariyer bütünlüğünün bozulmasının süreçteki ilk basamak olduğu düşünülmekte ve bariyer bütünlüğünün korunması ilaç çalışmalarının odağını oluşturmaktadır. Bu çalışmada, kronik morfin uygulamasının merkezi sinir sisteminde (MSS) geliştirdiği tolerans *in-vivo* davranış testlerinden, bağırsak bariyer bütünlüğü üzerindeki etkisinin bir ifadesi olarak interlökin (IL)-18 salınımından ve de bu salınıma ilişkin yolakların ortaya çıkarılması için *ex-vivo* deney modellerinden yararlanılmıştır. Çalışmanın sonuçları kronik morfin uygulamasının yuva yapma davranış skorunda azalmaya neden olduğunu gösterdi. Bu etki ağrı uyaranlı davranış testleri ile de doğrulandı. Vankomisin ve bütirik asit ile oluşturulan bağırsak mikrobiyota değişikliğinin morfine karşı gelişen nosiseptif toleransı azalttığı ancak MSS’nde gelişen toleransa etkili olmadığı gösterildi. Kronik morfin uygulamasının ileum dokusunda IL-18 salınımını mü-opioid reseptör aracılı arttırdığı ve de bağırsak bariyer bütünlüğünün korunmasında rol oynayan IL-18 salınımının ise enterik nöronlar aracılı olabileceği sonucuna varıldı. Ex-vivo çalışmalarda ise IL-18 salınımının bağırsak mikrobiyotasındaki değişiklik aracılı olabileceği gösterildi. Bu çalışmanın, opioid tolerans mekanizmasının anlaşılmasında, moleküler farmakoloji ve ilaç araştırmalarında yeni perspektif katabileceği öngörülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Opioid, Bağırsak Mikrobiyomu, IL-18, Mikrobiyom-Bağırsak-Beyin Aksı, Bağırsak geçirgenliği

İNGİLİZCE ÖZET

Effects of Opioids on Microbiome-Gut-Brain Axis

With the emergence of the intestinal microbiome and its metabolites playing a major role in disease formation and prognosis, the number of studies in this field has been increasing substantially. The use of opioid drugs and the increase in their side effects that even can result in death have revealed the necessity of elucidating the mechanisms of tolerance development. Although there are many reasons for the tolerance that develops with chronic morphine use, dysbiosis of the intestinal microbiota remains the most significant topic in understanding the tolerance pathways. The systemic effects of the intestinal microbiota and the mechanisms by which it fulfills these functions have not been fully clarified. In the light of the current literature, disruption of the intestinal barrier integrity is considered to be the first step in the process, therefore maintaining the barrier integrity is becoming the focus of drug studies. In this study we used, *in-vivo* behavioral assays to show the effect of chronic morphine administration in the central nervous system (CNS), IL-18 expression as an indicator of intestinal barrier integrity, and *ex-vivo* experimental models to reveal the pathways related to this release. The results of the study showed that chronic morphine administration caused a decrease in nesting behavior scores. This effect was also confirmed by pain-induced behavioral tests. It has been shown that the intestinal microbiota disruption induced by vancomycin and butyric acid reduces nociceptive tolerance to morphine, but does not affect the tolerance developed in the CNS. It was concluded that chronic morphine administration increased interleukin (IL)- 18 expression in ileum tissue via the mu-opioid receptor, and IL-18 release, which plays a role in maintaining intestinal barrier integrity, may be mediated by enteric neurons. *Ex-vivo* studies have shown that IL-18 release may be mediated by changes in the gut microbiota. It is anticipated that this study may add a new perspective to understanding the mechanism of opioid tolerance, molecular pharmacology, and drug research.

Keywords: Opioids, Gut Microbiome, IL-18, Microbiome-Gut-Brain Axis, Gut permeability

1. GİRİŞ

Bağırsak- Beyin Aksı (GBA) üzerine yapılan araştırmalar, bağırsak mikrobiyomunun, miyelinasyon, nörojenez, mikroglia olgunlaşması ve kan-beyin bariyerinin oluşumu gibi temel nörojeneratif süreçlerde rol oynadığını göstermektedir (Scriven, Dinan, Cryan, & Wall, 2018; Sharon, Sampson, Greschwind, & Mazmanian, 2016). Bunun yanında, kolondaki bakterilerin lifli gıdaları fermente etmesi sonucu ortaya çıkan metabolik ürünlerin de (kısa zincirli yağ asitleri gibi) beyinde, bağırsak mikrobiyomuna benzer bir şekilde etki gösterebileceği (kan-beyin bariyeri bütünlüğünü iyileştirme, astrositler ve mikroglia aracılı inflamatuvar yanıtta etki ve nörojenezi artırma gibi) bildirilmiştir (Silva, Bernardi, & Frozza, 2020). Kısa zincirli yağ asitleri (SCFAs), hem epitel hücreleri hem de bağışıklık hücreleri üzerinde salgılanan ve metabolite duyarlı G-protein reseptörlerine bağlanarak genel dolaşıma katılırlar. Ayrıca bağırsak epitel hücreleri için gerekli olan enerjiyi sağlamada da görev alırlar (Muchhala, Jacob, Kang, Dewey, & Akbarali, 2021; Tan ve ark., 2014). Kısa zincirli yağ asitlerinin nöro-immünoendokrin regülasyonunda önemli rol oynadığı düşünülse de, bu etkinin altında yatan mekanizma ve hangi kısa zincirli yağ asidinin beyin fizyolojisi ve davranış üzerine etki ettiği tam olarak açıklığa kavuşturulamamıştır (Silva ve ark., 2020).

Opioid grubu analjezikler, orta ila şiddetli ağrının tedavisi için en çok kullanılan ilaç grubunda yer almaktadır (Akbarali, & Dewey, 2017). Ancak opioid türevlerinin uzun süre alınımı, eş değer yanıtın sağlanması için artan dozlarda ilaç kullanımını gerektirmekte ve opioid toleransının oluşmasına neden olmaktadır. Opioid türevleri ilaçların, kötüye kullanımı (bağımlılık gibi) sonucu ya da opioid toleransı gelişimi neticesinde, Amerika da her gün 115'ten fazla insanın hayatını kaybettiği "Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezi" (CDC) tarafından bildirilmiştir (Akbarali, & Dewey, 2019). Opioid tolerans mekanizmasını açığa çıkarabilmek için çeşitli yöntemler kullanılmasına rağmen halen

aydınlatılamamış olması, kompleks bir fenomen olduğunu göstermektedir (Kang ve ark., 2017). Bağımlılık ve tolerans geliştirme mekanizmalarının anlaşılması, ağrı tedavisi için geliştirilen ilaçların kötüye kullanımı ve yan etkilerinin azaltılmasında önemlidir (Akbarali, & Dewey, 2017).

Kronik ağrı hastanın sağlık durumunu ve yaşam kalitesini olumsuz yönde etkiler. Kısmi tıkanıklık, şiddetli bağırsak iltihabı gibi komplikasyon kaynaklı ağrı gözlenen (Bielefeldt, Davis, & Binion, 2009) İnflamatuvar Bağırsak Hastalığına (IBD) sahip hastalarda, kronik opioid kullanımına bağlı olarak klinik depresyon gözlemlendiği bildirilmiştir. Yuva yapma davranışının klinik depresyonun değerlendirilmesinde hayvan modeli olarak kullanılabileceği ve bu davranışın opioid ve non-steroid analjeziklere de yanıt verdiği bilinmektedir (Cheatham ve ark., 2021, Negus, Neddenriep, Altarifi, Carroll, Leidl, & Miller, 2015). Farelerde kolitis modelinin kullanıldığı bir çalışmada, kolitis oluşturulmayan farelerde, günlük morfin uygulamasına bağlı olarak depresyonun görülmediği ve bu durumun yuva yapma davranışına etki etmediği bildirilmiştir (Cheatham ve ark., 2021). Ancak yüksek dozlarda akut veya kronik morfin uygulamasının, yuva yapma davranışı üzerine etkisi bilinmemektedir. Bağırsak mikrobiyotasının geniş spektrumlu antibiyotik kullanılarak değiştirilmesi sonucunda, antinosiseptif tolerans oluşumunu engellediği ağrı uyaranlı davranış testleri (tail-flick-kuyruk daldırma) ile ortaya konulmuş olsa da (Kang ve ark., 2017) ağrı uyarsız (yuva yapma) davranış testlerine nasıl etki ettiği bilinmemektedir.

Bağırsak epiteli, dış "fiziksel" ve iç "işlevsel" (immünolojik) işlevi olan iki bariyere sahiptir. Bu iki bariyerin birbirleriyle olan etkileşimi bağırsak bariyer bütünlüğünün korunmasında rol oynar (Bischoff ve ark., 2014). Bağırsak bariyeri, organizma ve bağırsak mikrobiyotası arasındaki simbiyotik ilişkinin sürdürülmesinde kritik role sahiptir (Muchhala ve ark., 2022). Bağırsak bariyerinin mukus tabakası, antimikrobiyal peptitleri ve proteinleri içerir. İntestinal kriptler üzerindeki Paneth hücreleri, organizmayı enfeksiyondan korumak için, alfa-defensin, lizozim ve Reg3 (regenerating islet-derived protein) gibi, antimikrobiyal faktörleri üretir (Bischoff ve ark., 2014). Antimikrobiyal peptitler, kommensal bakteri kompozisyonu ve epitel bariyerinin korunmasında rol oynarlar (Ostaff, Stange, & Wehkamp, 2013). Antimikrobiyal

peptitlerin kaybı, patojenik bakterilerin kolonizasyonuna ortam hazırlayarak inflamatuvar yanıtın oluşmasına ve bağırsak bariyer bütünlüğünün bozulmasına sebep olabilir. Kronik morfin uygulamasının, bağırsak bariyer bütünlüğünü bozduğu ve bağırsak lümeninden sistemik dolaşıma katılan bakterilerin de inflamatuvar bir yanıtı neden olduğu bilinmektedir (Banerjee ve ark., 2016; Kang ve ark., 2017; Komla ve ark., 2019; Mischel, Muchhala, Dewey, & Akbarali, 2020; Muchhala ve ark., 2021). Morfinin gastrointestinal sistem üzerindeki olumsuz etkileri bilinse de bu etkilerin moleküler mekanizması henüz netlik kazanmamıştır.

Pleyiotropik proinflamatuvar bir sitokin olan interlökin-18 (IL-18), intestinal hemostazisin sağlanması ve enfeksiyonlara karşı oluşan yanıtta kritik bir rol oynar (Elinav ve ark., 2011; Jarret ve ark., 2020; Lara-Tejero ve ark., 2006; Raupach, Peuschel, Monack, & Zychlinsky, 2006). Enterik sinir sistemi nöronlarından noksan olan farelerin (Ruest ve ark., 2003), kolonik goblet hücrelerindeki antimikrobiyal peptit salınımının azaldığı, bağırsak disbiyozu olduğu ve sonuç olarak farelerin *Salmonella typhimurium* enfeksiyonuna daha duyarlı hale geldiği tespit edilmiştir (Jarret ve ark., 2020). Öte yandan IL-18, patolojik koşullar altında bağırsak epitel bariyerinin bozulmasını da kolaylaştırabilir. Yapılan bir çalışmada, immün ve bağırsak epitel hücrelerinde IL-18'in inhibisyonunun [genetik olarak IL-18 veya reseptör (IL-18R1) noksanlığı oluşturarak] deneysel kolitis modellerinde bağırsak iltihabını hafifletebileceği ve IL-18 aracılı goblet hücre sayısında azalmayı önleyebileceği bildirilmiştir (Nowarski ve ark., 2015). Bu durum, IL-18 salınımının bağırsak epitel bariyer işlevinin sürdürülmesinde ne kadar önemli bir rol oynadığını göstermektedir.

Bu çalışmada,

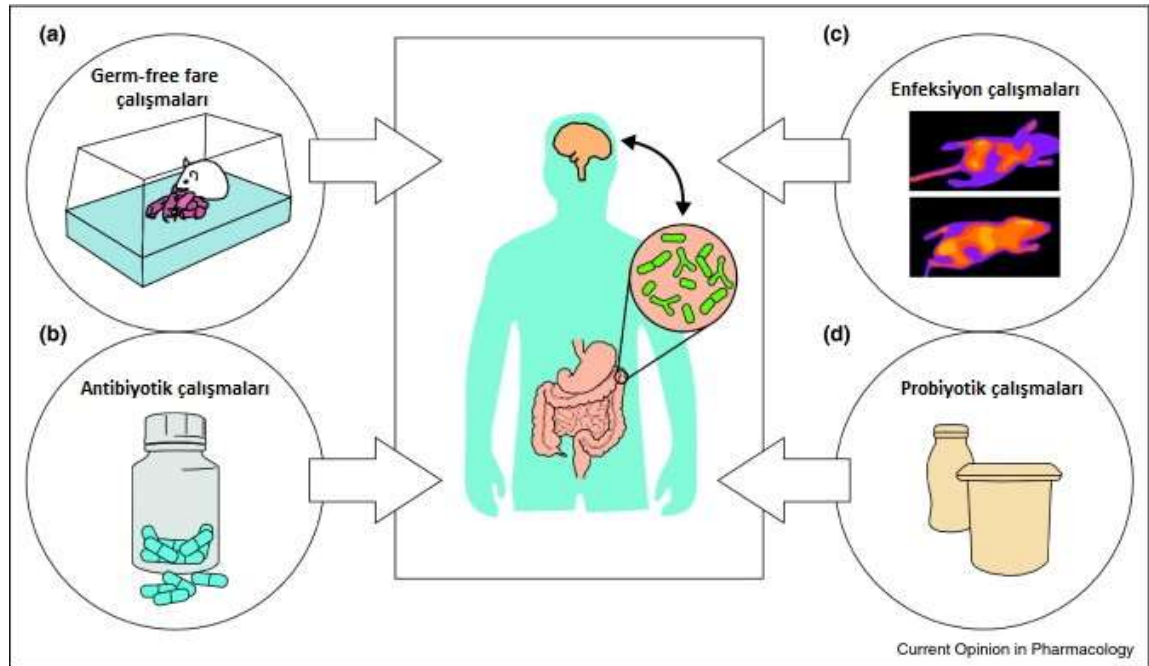
- i) opioidlere karşı gelişen toleransın ağrı uyaransız (yuva yapma) davranış testleri ile ortaya konulması ve ağrı uyaranlı (kuyruk daldırma) testler ile de doğrulanması,
- ii) vankomisin (antibiyotik) ve bütirik asit (SCFA) kullanılarak oluşturulan bağırsak mikrobiyota değişikliğinin her iki davranış testinde de opioidlere karşı gelişen toleransı tersine çevirip çevirmeyeceğinin saptanması,

iii) morfin pellet implantasyonu ve aratan dozlarda i.p. morfin enjeksiyonu ile oluşturulan kronik morfin uygulamalarının, bağırsak bariyer bütünlüğünün bir ifadesi olarak, IL-18 salınımına muhtemel etkilerinin ortaya konulması hedeflenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Mikrobiyota-Bağırsak-Beyin Aksı

Merkezi sinir sistemi (MSS) ve gastrointestinal sistem (GİS) arasında, vagus siniri (anatomik), bağışıklık sistemi (humoral), hipotalamus-hipofiz-adrenal korteks aksı (HPA) aracılı, çift yönlü bir iletişim bulunmaktadır (Mayer, & Tillisch, 2011). Ayrıca MSS ve GİS arasında, “mikrobiyom-bağırsak-beyin aksı” olarak da bilinen bir bağlantının olduğu ve bağırsak mikrobiyotasının bu kapsamda önemli bir rol oynadığı bilinmektedir. Bağırsak mikrobiyotasındaki değişiklikler metabolizmayı, bağışıklığı ve hormonal sistemi etkilemektedir. Mikrobiyotadaki değişiklikler kanser, obezite, bağırsak hastalıkları, karaciğer yağlanması, depresyon, panik atak, kaygı bozuklukları, Parkinson, Alzheimer gibi hastalıklara da yol açabilmektedir (Collins, & Bercik, 2009).



Şekil.1. Şekil son yıllarda yapılan mikrobiyota-bağırsak-beyin aksı çalışmalarının gelişimini şematize etmektedir (Bravo ve ark., 2012).

Mikrobiyota-bağırsak-beyin iletişimini anlamak için çeşitli stratejiler uygulanmıştır. Germ-free fareler kullanılarak yapılan araştırmalar bakteri yoksunluğundaki beyin işlevi ile ilgili önemli bilgiler sunarken, antibiyotikler kullanarak çeşitli bakteri gruplarının elimine edilmesi ya da dışardan bakteri türleri ilavesinin (Fekal transplantasyon gibi) davranışı etkilediği ortaya konmuştur. Probiyotik tedavisinin sadece bağırsak sağlığı üzerine değil aynı zamanda depresyon, panik atak, kaygı gibi davranış bozukluklarını da iyileştirdiği gösterilmiştir (Huang ve diğerleri., 2017; Liu ve diğerleri., 2018; Noonan, Zaveri, Macaninch, & Martyn, 2020). Laboratuvar hayvanlarında enfeksiyon modelleri kullanılarak yapılan çalışmalar ise (Bravo, Dinan, & Cryan, 2011; Clapp, Aurora, Herrera, Bhatia, Wilen, & Wakefield, 2017) bağırsakta patojenik bakterilerin sayısındaki artışın anksiyete benzeri davranışlara neden olabileceğini göstermiştir.

Tüm bu stratejiler aracılığıyla elde edilen sonuçlar, bağırsak mikrobiyotası ve MSS arasında karmaşık bir iletişimin varlığını vurgulamaktadır (Bravo ve ark., 2012; Şekil 1). Beyinde bulunan birçok transmitter ve transmitter reseptörünün bağırsakta da lokalize olduğu ve bağırsaktaki periferik mekanizmaların MSS fonksiyonlarını da etkilediği belirtilmiştir (Akbarali, & Dewey, 2017; Holzer, 2007). Ancak, bağırsak mikrobiyotasının, MSS aracılığıyla bu değişimleri hangi mekanizmaları aktive ederek ortaya çıkardığı henüz kesinlik kazanmamıştır (Akbarali, & Dewey, 2019).

2.2. Bağırsak Mikrobiyomu

Canlı vücudunu paylaşmasına rağmen, canlıya ait bir hücre olmayan kommensal, simbiyotik ve patojenik mikroorganizmaların (bakteri, mantar, protozoa) oluşturduğu ekolojik topluluk “mikrobiyota”, bu çevrede yaşayan mikroorganizmaların toplam genomu ise “mikrobiyom” olarak tanımlanmaktadır [Türkiye Bilimler Akademisi (TÜBA), 2017]. Organizmaya yerleşen mikroorganizmaların büyük çoğunluğu doğum sonrası erken yaşamda kolonize olarak canlının immun sisteminin gelişmesinde rol almaktadır (Hooper, & Gordon, 2001; Sudo ve ark., 1997). İnsan vücudunda toplamda 10^{13} adet ökaryotik hücre bulunurken, bağırsakta bulunan ve bağırsak mikrobiyomunu oluşturan bakterilerin sayısının 10^{14} adedi bulabileceği bildirilmektedir (Tannock, 1999).

Bağırsakta yaşayan kommensal bakteriler başlıca mukus, antibakteriyel ve antifungal peptidlerin salınımında rol oynar. Ayrıca bağırsakta bulunan patojen mikroorganizmaların kolonizasyonunu engellenmesi ve bağırsak ile ilişkili lenf nodüllerini uyararak mukozal immünoglobulin-A üretimini de arttırmaktadırlar (Bischoff, 2011; Groschwitz, & Hogan, 2009).

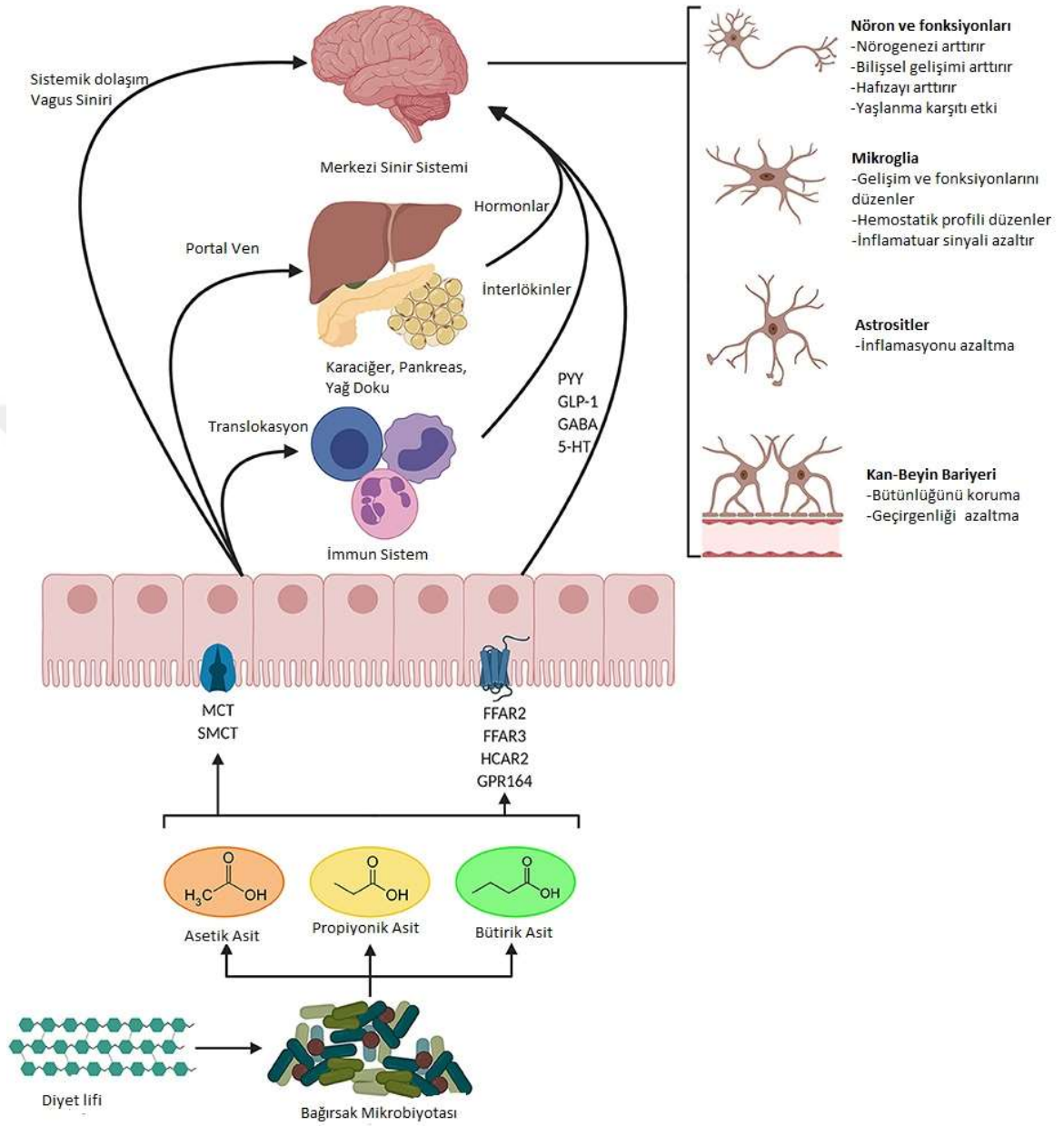
Bağırsak mikrobiyomunu şekillendiren faktörler arasında genetik (Goodrich, Davenport, Waters, Clark, & Ley, 2016), diyet (Carmody ve ark., 2015; David ve ark., 2014), yaşam tarzı (Allen ve ark., 2015; Kang ve ark., 2014) ve coğrafya (Rampelli ve ark., 2015; Yatsunenkov ve ark., 2012) bulunmaktadır. Gebelik süresince korunaklı bir ortamda bulunan fetüsün mikroorganizmalarla ilk teması doğum sırasında olmaktadır. Normal doğumla doğan yavruların bağırsak mikrobiyomunda *Lactobacillus* ve *Prevotella* türleri ağırlıklı olarak bulunurken; sezaryen ile doğanlarda *Staphylococcus* ve *Corynebacterium* türlerinin yaygın olduğu bildirilmektedir (Bäckhed ve ark., 2015; Dominguez-Bello ve ark., 2010). Yetişkinlik döneminde ise bağırsak mikrobiyomunun %99'unu, *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Proteobacteria* ve *Actinobacter* grubuna ait bakteriler oluşturmaktadır (Ley ve ark., 2008). Diyetin, bağırsak mikrobiyotasını değiştirmesinin yanında, genleri dahi etkilediği de belirtilmektedir. Örneğin, *Escherichia coli* (*E. coli*)'nin çeşitli genleri eksprese ederek DNA hasarı ve genomik instabiliteye neden olduğu, bazı gram negatif bakterilerin ise sitoletal toksin (cytolethal distending toxin- CDT) aracılı kolorektal kansere yol açtıkları bilinmektedir (TÜBA, 2017). Kanser prognozunda bağırsak mikrobiyotasının oynadığı rol göz önüne alındığında antikanser ilaçların etkinliğinin bağırsakta bulunan bakterilerin toksin salınımlarını engellemeye yönelmesinin faydalı olacağı ileri sürülmektedir (Roy & Trinchieri, 2017).

2.3. Kısa Zincirli Yağ Asitleri

Lif ve polisakkaritler gibi sindirimi zor olan besin maddelerinin kalın bağırsakta bulunan bakterilerce yıkımlanması sonucu son ürün olarak organik asit, gaz ve kısa zincirli yağ asitleri (SCFAs) elde edilir. (Martin-Gallausiaux, Marinelli, Blottiere, Laraufie, & Lapaque, 2021; Silva ve ark., 2020). Kısa zincirli yağ asitlerinin bağırsak-beyin etkileşimini ve beyin işleyişini doğrudan ya da dolaylı olarak etkileyebildiği ve hatta

sağlığın korunması ve hastalıkların prognozunda önemli rol aldıkları bilinmektedir (Silva ve ark., 2020; Tan ve ark., 2014). Kolonda üretilen kısa zincirli yağ asitleri sistemik dolaşıma katılarak diğer dokulara da ulaşır. Buna bağlı olarak kahverengi yağ dokusu aktivasyonunda, karaciğer mitokondriyal fonksiyonunun düzenlenmesinde, insülin sekresyonunda artışa ve vücut enerji homeostazisinde etkin rol oynamaktadır (Silva ve ark., 2020).

Kısa zincirli yağ asitleri, H^+ (Hidrojen iyonu) bağımlı monokarboksilat taşıyıcıları (MCT) veya sodyum bağımlı monokarboksilat taşıyıcıları (SMCT) aracılığı ile kolonositler (kolondaki enterositler) tarafından emilir. Kısa zincirli yağ asitlerinin mukozal bağışıklık, bağırsak bariyer bütünlüğü ve fonksiyonuna olan etkileri serbest yağ asidi reseptörü 2 ve 3 (FFAR2 ve FFAR3), hidrokarboksilik asit reseptörü (GPR109a/HCAR2) ve GPR164 gibi G-protein aracılı reseptörlere (GPCR) bağlanmaları aracılığıyla gerçekleşir. Kısa zincirli yağ asitlerinin adı geçen reseptörler ile etkileşimi bağırsak hormonlarını aktive eder. Bu aktivasyon sistemik dolaşım ya da vagal yollar aracılığı ile beyinde dolaylı olarak sinyal iletimine yol açar. Kısa zincirli yağ asitleri periferik olarak, T düzenleyici hücrelerin (Treg) farklılaşmasını indükleyerek interlökinlerin salgılanmasını düzenler ve sistemik inflamasyonu uyarırlar. Kısa zincirli yağ asitleri, endotelial hücreler aracılığıyla kan-beyin bariyerini geçebilir ya da bütünlüğünü etkileyebilir. Ayrıca glial hücre morfolojisi ve işlevi, nörotrofik faktör modülasyonu, nörojenezi artırarak serotonin biyosentezi, nöronal hemostazis ve fonksiyonunu iyileştirmek suretiyle nöroinflamasyonu etkileyebilirler. Tüm bu bilgiler göz önüne alındığında kısa zincirli yağ asitlerinin bağırsak-beyin yollarıyla etkileşimi, duygu, biliş, beyin işlevsel bozuklukları, ve patofizyolojisini doğrudan veya dolaylı olarak etkileyebildiği düşünülmektedir (Silva ve ark., 2020; Şekil 2).



Şekil.2. Kısa Zincirli Yağ Asitleri ile bağırsak beyin etkileşim yolları (Silva ve ark., 2020)

2.4. Opioid Kullanımı

2.4.1. Tarihçesi

Opioidler, opiumdan elde edilen, içerisinde Afyon çiçeği (*Papaver somniferum*) özsuyu, morfin, kodein, tebain gibi doğal ürünleri ve bunların semi-sentetik türevlerini içeren, analjezik ve sedatif etkileri nedeniyle kronik ağrı tedavisinde çokça tercih edilen

ilaç grubudur (Gutstein, & Akil, 2006). Opioid kullanımının tarihte tam olarak ne zaman başladığına dair kesin bilgi bulunmamaktadır. Bunun nedeni antik yazarlar tarafından günümüze gelen kayıtlarda tarif edilen ve opioid etkisi yaratan maddenin tam olarak betimlenememesidir. Ancak bilim dünyasında opioidlerin etken maddesinin milattan önce üçüncü yüzyılda Sümerler (şimdiki Irak bölgesi) tarafından, Afyon çiçeği tohumundan izole edildiği düşünülmektedir. Milattan sonra sekizinci yüzyılda opioidler Arap tüccarlar tarafından Hindistan ve Çin'e taşınmış, on- onüçüncü yüzyılda ise Asya ve Avrupa'nın bir kısmına yayılım göstermiştir. Onaltıncı yüzyılın başlarındaki belgelere bakıldığında en yoğun olarak Çin olmak üzere Türkiye, Mısır, Almanya ve İngiltere'de ilaç bağımlılığı ve tolerans ile ilgili raporların belgelendiği görülmektedir (Brownstein, 1993).

Ondokuzuncu yüzyılda (1804) Alman bilim adamı ve eczacı Friedrich Wilhelm Adam Sertürner tarafından izole edilinceye kadar afyon bitkisindeki aktif bileşen bilinmiyordu. Sertürner izole ettiği bileşiği Yunan uyku tanrısı Morpheus'tan esinlenerek "morfin" olarak adlandırdı. İlerleyen dönemlerde İskoçya'lı hekim Dr. Charles Wood'un hipodermik iğneyi icat etmesiyle morfinin enjeksiyon olarak kullanımı daha net doz ayarlaması sağlamasından dolayı, morfin kullanımı yaygınlaştı. Bu yaygın ve kontrolsüz kullanımın ise Amerikan İç Savaşı'nda (1861-1865) gazilerin morfin bağımlısı olmasına sebep olan ortamı yarattığı bildirilmiştir (Holzer, 2014).

Amerika Birleşik Devletleri, Ekim 2017 itibariyle artan opioid krizine yanıt olarak acil sağlık durumu ilan ederek opioid kullanımında sınırlama ve kontrol altına alma çalışmaları başlattı. Bu kapsamda "Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezi" (CDC)'nin yayınladığı "Kronik Ağrı için Opioid Reçete Yazma Rehberi (2016)", ağrı kontrolünde opioid gerekliliği ve dozajın ayarlanması ile ilgili gelişmelerin başlamasına aracı olmuştur (Dowell, Haegerich, & Chou, 2016).

Türkiye'de madde bağımlılığı ile ilgili kurumsal yapılanmalar 1997 yılında "Uyuşturucu Madde Kullanımı ile Mücadele Takip ve Yönlendirme Alt Kurulu" nun oluşturulmasıyla başlamıştır. Türkiye'nin Avrupa Birliği üyeliği süreci doğrultusunda 2001 yılında Türkiye'de Avrupa Uyuşturucu ve Uyuşturucu Bağımlılığı İzleme Merkezi (EMCDDA) Temas Noktası kurulmasına ve söz konusu temas noktasının Emniyet Genel Müdürlüğü olmasına karar verilmiştir. Türkiye Uyuşturucu ve Uyuşturucu Bağımlılığı

İzleme Merkezi tarafından EMCDDA'nın belirlediği standart tablo ve sualnamelere uygun olarak her yıl hazırlanan Türkiye Uyuşturucu Raporları EMCDDA ile paylaşılmaktadır (Sağlıklı Yaşam ve Bağımlılıkla Mücadele Çalışma Grubu Raporu, 2018).

2.4.2. Opioidlerin Farmakolojik Etkileri

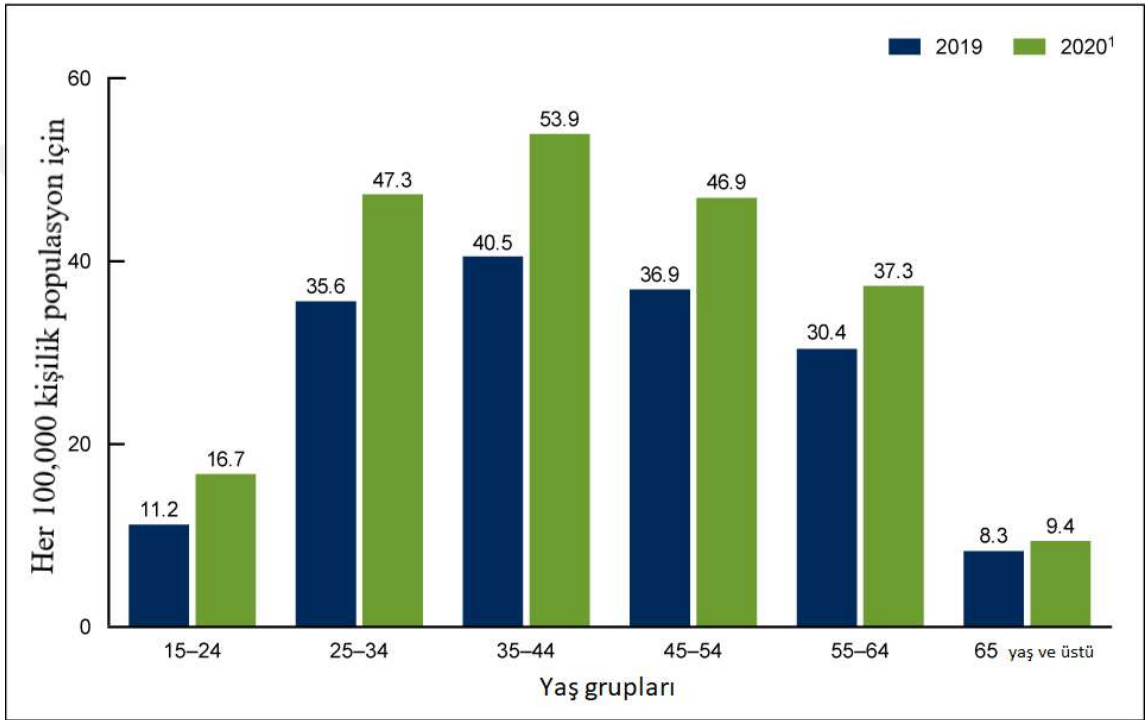
Opioidler analjezik etkilerini, ağrının iletilmesi ve modülasyonunda rol oynayan beyin ve omurilik bölgelerinde yer alan G protein-bağlı reseptörleri aktive ederek gösterirler. Üç ana opioid reseptörü vardır; mü (μ , MOR), kappa (κ , KOR) ve delta (Δ , DOR). Bu reseptörler beyin ve omurilik başta olmak üzere, vasküler, kardiyak, akciğer ve bağırsak gibi periferik dokularda bulunmaktadırlar. Mü-opioid reseptörler (MOR) aktivasyonu analjezi, öfori (aşırı coşku hali), sedasyon, solunum depresyonu ve kabızlık oluşturmaktadır. Kappa opioid reseptörlerinin (KOR) aktivasyonu sonucu hafif analjezik etkiler ve düşük düzeyde solunum depresyonu, delta opioid reseptörlerinin (DOR) aktivasyonu ise minimum yan etki ile analjezi oluştur (Rausch, & Jansen, 2012).

2.4.3. Kullanım Alanı ve Yan Etkileri

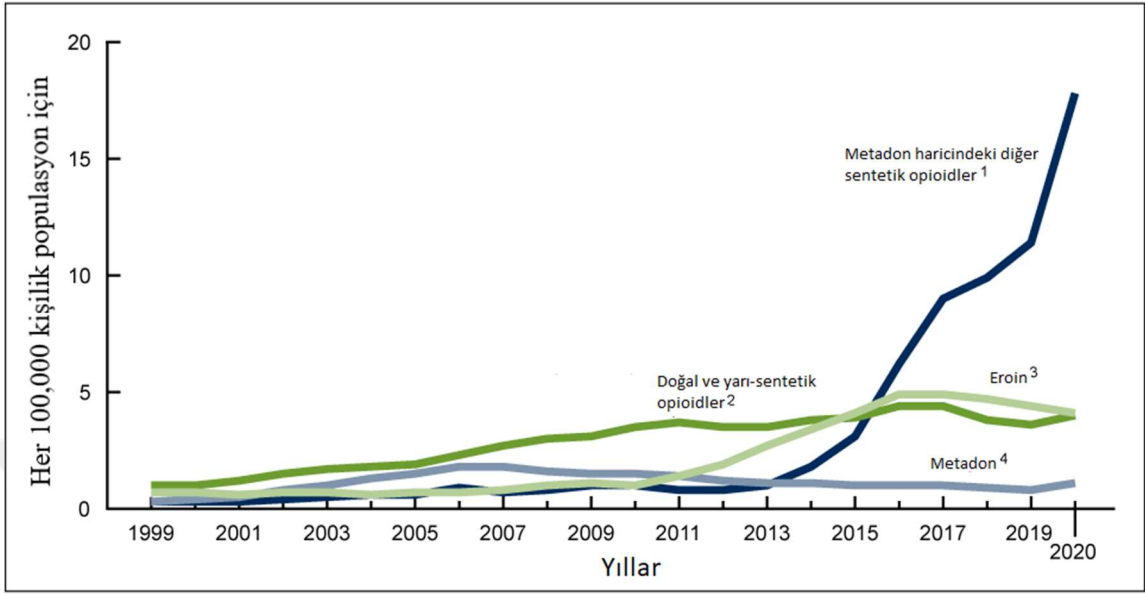
Kronik ağrı kontrolünde etkili analjezik olarak kullanılan opioidlerin, yan etkilerinin fazla olması nedeniyle kullanımı sınırlı tutulmaktadır. Yan etki gelişiminde cinsiyet, ırk ve yaş gibi faktörler rol oynamaktadır (Swegle, & Logemann, 2006). Pek çok organda opioid reseptörleri bulunması nedeniyle oldukça geniş bir etki yelpazesine sahiptirler. Uzun süreli opioid kullanımının MSS üzerine olan başlıca etkileri sedasyon, zihinsel bulanıklık, solunum depresyonu ve öforidir. Uzun süreli opioid kullanımında analjezik etkinin devamlılığı için artan dozlarda opioid alınması, MSS'de tolerans gelişimine neden olabilmektedir (Akbarali, & Dewey, 2019; Rausch, & Jansen, 2012).

Opioidlerin yüksek dozda kullanımı hipoventilasyona bağlı solunum depresyonu oluşturmaları nedeniyle ölümcül olabilmektedir (Akbarali, & Dewey, 2019). CDC'nin raporlarında doğal (morfin ve kodein), yarı-sentetik (eroïn, dihidromorfinon veya oksikodon gibi) ve tam sentetik (fentanil, petidin, metadon, veya tramadol gibi) opioid grubu ilaçların doz aşımı kaynaklı oluşan ölüm oranları yer almaktadır. Son

yayınlanan raporda doz aşımı kaynaklı ölüm oranları, 2019 yılı ile karşılaştırıldığında 2020 yılında %31 oranında artış göstermiştir. Ölüm oranındaki artışın tüm yaş gruplarında istatistiksel önem düzeyinde yüksek olduğu görülmektedir (Hedegaard, & Warner, 2021; Şekil 3). Ölüm oranlarının en yüksek olduğu ilaç grubunun metadon dışındaki sentetik opioid grubu ilaçların oluşturması dikkat çekicidir (Şekil 4).



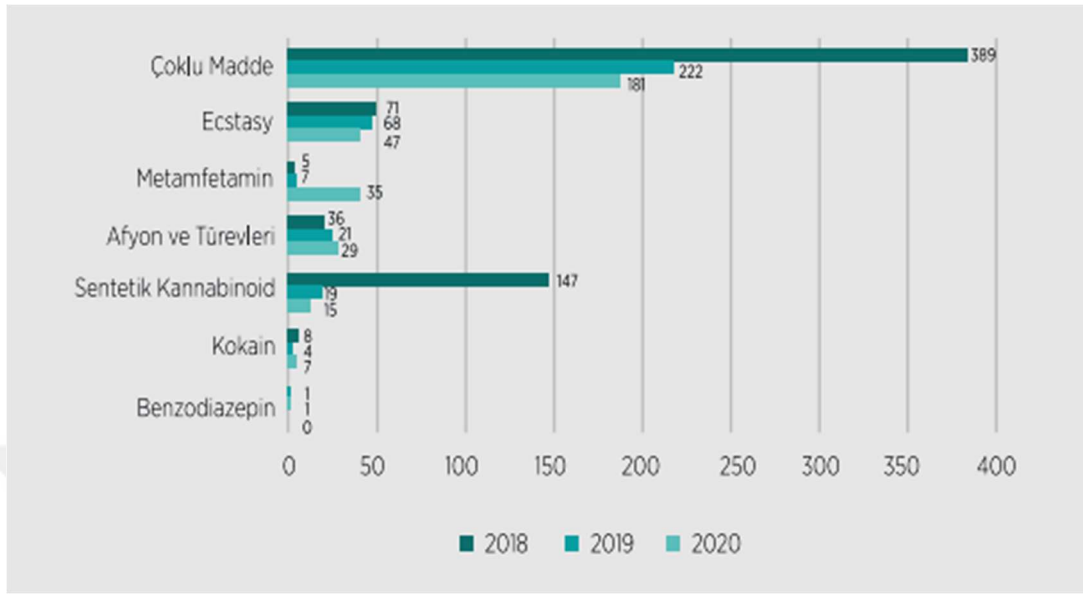
Şekil.3. Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezi (CDC) doz aşımına bağlı ölüm raporlarındaki yaş gruplarına göre ölüm oranlarının karşılaştırılması (Hedegaard, & Warner, 2021).



Şekil.4. Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezi (CDC) doz aşımına bağlı ölüm raporlarındaki 1999-2020 yılları arasında opioid türlerine göre ölüm oranları (Hedegaard, & Warner, 2021).

Avrupa Uyuşturucu ve Uyuşturucu Bağımlılığı İzleme Merkezi (EMCDDA)'nin 2020 yılında yayınladığı verilere göre 2011'den bu yana Avrupa ülkelerinde görülen doz aşımına bağlı ölüm sayılarında da artış olduğu ve bu vakaların %78'nin opioid grubu ilaçlardan kaynaklandığı bildirilmektedir. Ölüm oranları yaş aralığına göre değerlendirildiğinde ise 25 yaş altı grupta %8, 25-39 yaş arası %38, 40-64 yaş arası %48 ve 64 yaş üstü bireylerde %8 olarak rapor edilmiştir [European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction (EMCDDA), 2020].

Emniyet Genel Müdürlüğü Narkotik Suçlarla Mücadele Daire Başkanlığı'nın 2021 yılında yayınladığı Türkiye Uyuşturucu Raporu verilerine göre 2020 yılında Türkiye'de 314 (293 Erkek; 21 Kadın) madde bağlantılı ölüm gözlemlenmiştir (Şekil 5). Ölüm vakalarının %36,9'unda eroine, %31,2'sinde metamfetamine, %29,6'sında ise ekstaziye rastlanmıştır. Gözlemlenen ölümlerin yaş dağılımı ise 30 yaş altı ölümler %40,7, 30-39 yaş arası ölümler %33,8, 40 yaş üzeri ölümler ise %24,2 olarak rapor edilmiştir (Türkiye Uyuşturucu Raporu, 2021).

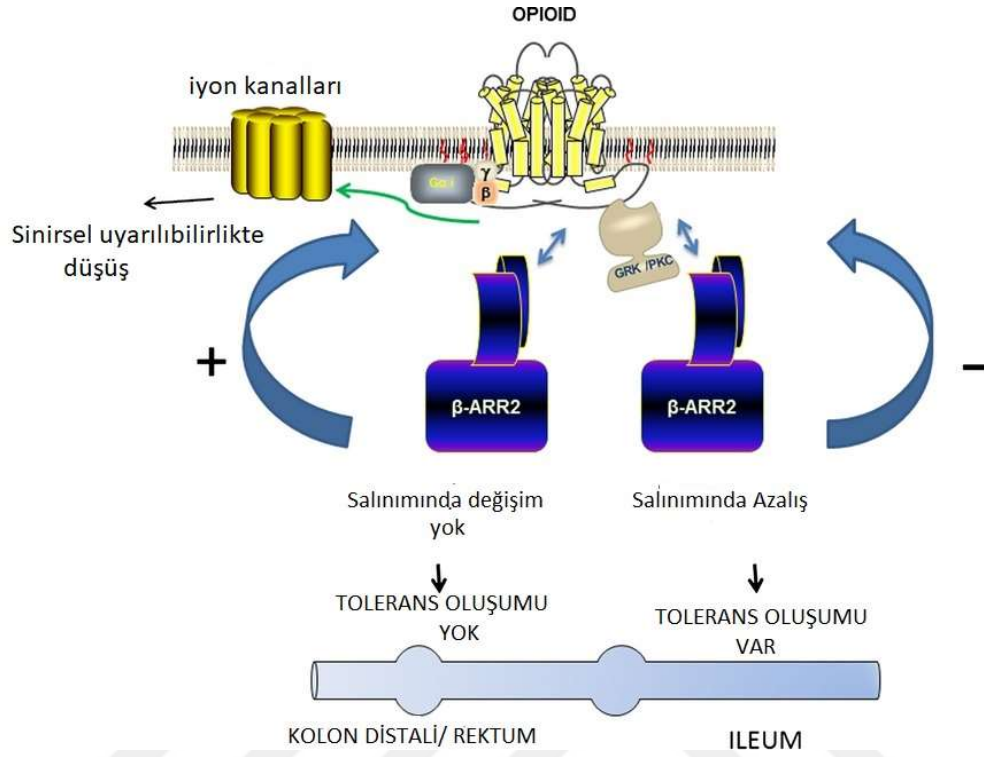


Şekil.5. Türkiye’de görülen madde bağlantılı ölümlerin yıllara ve kullanılan maddelere göre dağılımı (Türkiye Uyuşturucu Raporu, 2021).

Opioidlere ilişkin literatür bilgisi ve ilgili kurum raporları göz önüne alındığında, opioid grubu ilaçlara karşı gelişen tolerans mekanizmasının anlaşılması, bu ilaçların kötüye kullanımının önüne geçilmesi ve daha güvenli opioid grubu ilaçların üretiminde önem taşımaktadır.

2.4.4.. Kronik Morfinin Uygulamasının Gastrointestinal Sistem Üzerine Etkisi

Gastrointestinal sistemde, enterik nöronlar üzerinde yaygın olarak bulunan 3 çeşit (mü, delta ve kappa) G-protein aracılı opioid reseptörü bulunduğu bilinmektedir (Akbarali, & Dewey, 2017; Holzer, 2007). Opioid kullanımının gastrointestinal sistemde görülen en yaygın yan etkileri peristaltik aktivitede azalma, sfinkter tonusunda artış, kabızlık ve opioid bağırsak fonksiyonu bozukluğudur. Opioid bağırsak fonksiyon bozukluğu abdominal kramp, şişkinlik, ve gastro-özefagal reflüyü içeren semptomları ifade etmektedir (Akbarali, & Dewey, 2019; Galligan, & Akbarali, 2014). Bunun yanında bulantı ve kusma gibi yan etkiler ise genellikle geçicidir ve sadece ilk tedavi sırasında deneyimlenir (Rausch, & Jansen, 2012).



Şekil.6. Kronik opioid uygulamasının gastrointestinal sistem üzerindeki farmakolojik etkileri (Akbarali, Inkisar, & Dewey, 2014).

Opioid kullanımının ileum ve kolondaki moleküler etki mekanizması benzerlik göstermektedir. Agonist ilacın alımını takiben G-protein reseptörlerine bağlanarak etkinlik gösterir. Tekrarlanan dozlarda morfin uygulaması, ileumda G-protein reseptörlerindeki duyarlılığın kontrolünde rol oynayan (Maguma, Dewey, & Akbarali, 2012), β -arrestin2 (β -ARR2) seviyesinde düşüşe neden olurken kalın bağırsakta herhangi bir değişiklik oluşturmaz (Şekil 6). Bu durum kronik opioid uygulamasının ince bağırsakta toleransa neden olurken kalın bağırsakta neden oluşmadığını açıklamaktadır (Akbarali ve ark., 2014; Ross, Gabra, Dewey, & Akbarali, 2008). Fakat kronik opioid uygulamasının MSS üzerindeki moleküler düzeyde tolerans oluşum mekanizmasının nasıl geliştiği halen açıklığa kavuşturulamamıştır.

2.4.5. Kronik Opioid Uygulamasının Bağırsak Mikrobiyotası Üzerine Etkisi

Bağırsak mikrobiyotasının, sitokinler, humoral ve sinirsel yollar aracılığıyla organizma ile iletişimde olduğu bilinmektedir (Bischoff, 2011; Sudo ve ark., 2004). Gastrointestinal fonksiyonların değerlendirilmesi ve iyileştirilmesi koruyucu hekimlik

uygulamaları için önemlidir (Bischoff, 2011). Bağırsak mikrobiyotasındaki değişikliklerin İnflamatuvar Bağırsak Hastalığı (Inflammatory Bowel Disease- IBD), alerji, astım, kardiyovasküler hastalıklar ve metabolik bozukluklara neden olduğuna dair çok sayıda kanıt vardır (Nishida ve ark., 2018). IBD’li bireylerin bağırsak mikrobiyomu, sağlıklı bireylerinkiyle karşılaştırıldığında, anti-inflamatuvar kapasiteye sahip bakterilerin sayısında azalma gözlenirken, inflamatuvar etkiye sahip bakteri sayısında ise artış olduğu tespit edilmiştir (Frank ve ark., 2007; Peterson, Frank, Pace, & Gordon, 2008). Bu kapsamda yapılan genomik analizler IBD’li hastalarda *Firmicutes* sayılarında azalma, *Proteobacter* ve *Bacteroides* sayılarında ise artma olduğunu göstermiştir (Frank ve ark., 2007). Sokol ve arkadaşları (2008), farelerde kolitis modeli oluşturularak yaptıkları çalışmada *Feacalibacterium prausnitzii* (*F. prausnitzii*) oral gavajının kolitisin prognozunu iyileştirdiğini saptamışlardır. Etki mekanizmasının ise *F. prausnitzii* aracılı mononükleer kan hücrelerini uyarılmasının, interlekin (IL)-10 üretimini arttırması ve böylece IL-12 ve IFN- γ gibi inflamatuvar sitokinlerin salınımının inhibe edilmesi aracılığı olduğu gösterilmiştir (Sokol ve ark., 2008). IBD’li hastaların bağırsak mikrobiyomunda kompozisyonunda değişiklik olduğu kanıtlanmasına rağmen, bu değişimin tedavide kullanılan ilaçlardan mı yoksa bağırsak inflamasyonundan mı kaynaklandığı halen kesinlik kazanmamıştır (Nishida ve ark., 2018).

Opioid grubu ilaçlar IBD semptomlarından biri olan ağrı tedavisinde etkili ve en çok reçete edilen ağrı kesicilerdendir. Ayrıca bu ilaçların “Opioid Induced Dysbiosis” (OID) olarak bilinen mikrobiyom kompozisyon değişikliğine ve diğer dokulara bakteriyel translokasyona neden olduğu bildirilmiştir (Mischel ve ark., 2020). Opioid tolerans gelişiminde bağırsak mikrobiyomunun önemli role sahip olduğu rapor edilmiştir (Akbarali, & Dewey, 2017; Pappagallo, 2001). Bunu ortaya koymak için yapılan çalışmalarda kronik morfin tedavisi öncesi ve sonrasında, oral yolla verilen antibiyotiklerin, morfin tolerans gelişimini engellediği bildirilmiştir. Tolerans gelişiminin engellenmesinde, bağırsak mikrobiyomunda bulunan Gram-pozitif bakterilerden *Clostridiales* ve *Lactobacilliales*’lerin sayısındaki düşüş olabileceği belirtilmiştir. Bağırsak bariyer geçirgenliğinin artması bağırsakta bulunan bakterilerin genel dolaşıma karışmasına, buradan mezenterik lenf nodülleri, karaciğer ve dalağa geçmesine ve bunun

da pro-inflamatuar sitokinlerin salınımının uyarılmasına neden olduğu belirtilmektedir (Kang ve ark., 2017). Kronik morfin uygulamasının gastrointestinal sistem’de oluşturduğu etki morfin ya da morfin aracılı fizyopatolojik değişimler şeklinde olabileceği gibi bağırsak mikroçevresindeki metabolit ürünler kaynaklı da ortaya çıktığı düşünülmektedir. Mikroçevrenin etkisini gösterebilmek için yapılan bir çalışmada, naïve (herhangi bir ilaç uygulaması yapılmamış olan) farelerden toplanan dorsal kök nöronları (Dorsal Root Ganglia- DRG) kronik morfin uygulanan farelerin kolonundan elde edilen süzüntü ile inkübe edildiğinde DRG’de hipersensitiviteye neden olduğu gösterilmiştir (Mischel, Dewey, & Akbarali, 2018).

2.4.6. Kronik Opioid Uygulamasının Kısa Zincirli Yağ Asitleri Üzerine Etkisi

Bağırsak mikrobiyotasını oluşturan bakteriler ile bağırsak epitelial hücreleri arasında simbiyotik bir ilişki vardır. Bağırsakta yaşayan mikroorganizmalar ürettikleri kısa zincirli yağ asitleri aracılığıyla bağırsak bariyer bütünlüğünün korunmasında yardımcı rol oynarlar (Muchhala ve ark., 2021). Kronik morfin ve antibiyotik uygulamasının farelerde bağırsak mikrobiyotasını (*Clostridiales* ve *Lactobacilliales*’lerin sayısında azalış gibi) değiştirdiği bilinmektedir (Kang ve ark., 2017). Bütirik asidin kolonda yerleşik bulunan Gram pozitif bakteriler tarafından üretildiği (Louis, & Flint, 2009) ve bu bakteri grubundaki eksikliğin bütirik asit üretim yetersizliğine bağlı opioid toleransına etki edebileceği düşündürmektedir. Bağımlılık oluşturan ilaçların MSS üzerine etkilerinin mikrobiyota aracılı olup olmadığının araştırıldığı bir çalışmada, antibiyotik verilen fareler kısa zincirli yağ asitleri (asetik, bütirik ve propiyonik asit) ile beslendiğinde kokain kaynaklı ödüle yönelme davranışını tersine çevirdiği gösterilmiştir (Király ve ark., 2016). Bu çalışma bağırsak mikrobiyotası tarafından üretilen kısa zincirli yağ asitlerinin MSS aracılı davranış kalıpları üzerine etkili olduğu hipotezini doğrulamaktadır.

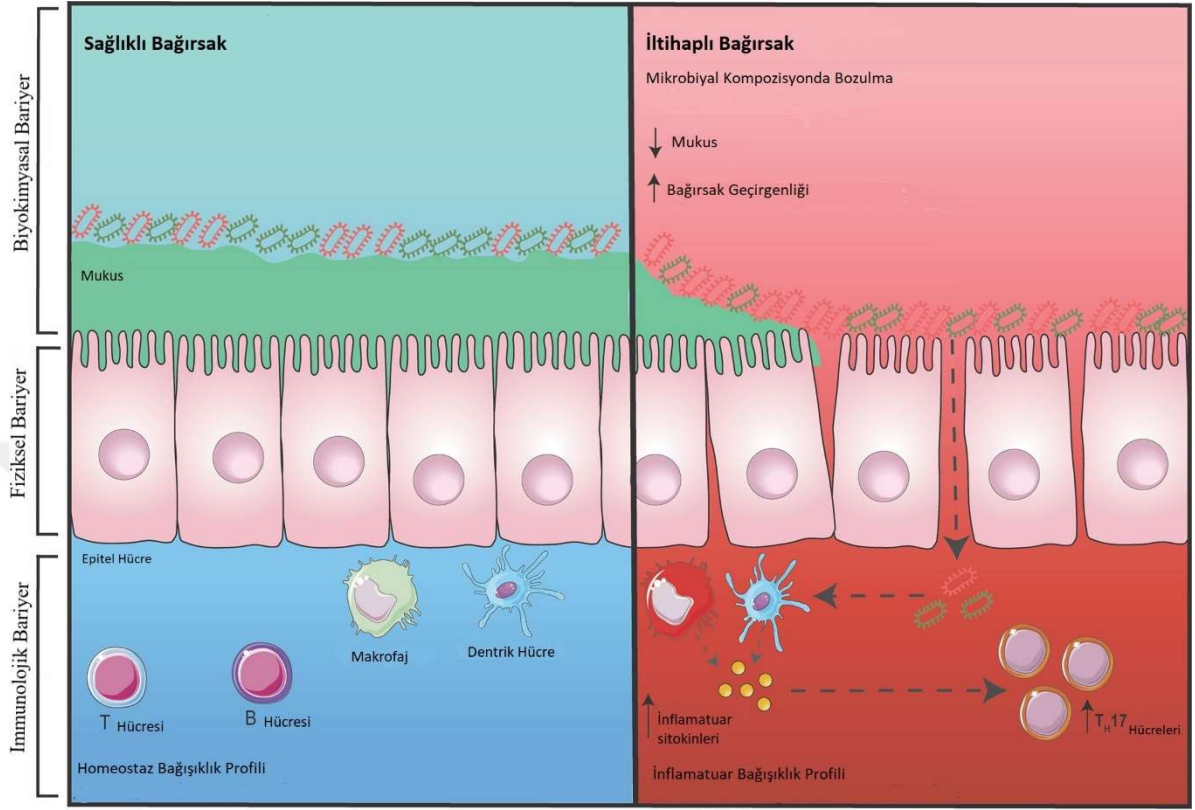
Mevcut literatürler ışığında, kronik morfin uygulamasıyla birlikte oral yolla verilen bütirik asidin tolerans gelişimine etkisi hakkında yeterli veri olmadığı görülmektedir. Çalışmamızda oral gavaj yoluyla verilen kısa zincirli yağ asitlerinden biri

olan bütirik asidin, morfin pellet implantasyonu ile oluşturulan kronik opioid uygulaması ile geliştirilen tolerans üzerine etkisinin belirlenmesi hedeflenmiştir.

2.5. Bağırsak Bariyer Bütünlüğü

İnsan vücudunda yaklaşık olarak 400 m² lik bir alan kaplayan bağırsak bariyerinin işlevi için organizmadaki toplam enerjinin %40'ı kullanılmaktadır. Su ve elektron kaybı ile patojenik mikroorganizmaların vücuda girişine engel olan bağırsak bariyeri aynı zamanda bağırsak mikrobiyotasının translokasyonunu da önlenmektedir (Bischoff ve ark., 2014). Bağırsak bariyer bütünlüğü aynı zamanda epiteliyal mukus tabakasının korunmasında önemlidir (Tan ve ark., 2014). Kronik gastrointestinal hastalıklar (çölyak, IBD, kolon kanseri gibi), karaciğer hastalıkları, tip-1 diyabet, obezite gibi hastalıkların prognozu bağırsak bariyer bütünlüğünün bozulması ile ilişkilidir (Tan ve ark., 2014; Vancamelbeke, & Vermeire, 2017). Bu nedenle ilaç geliştirme çalışmalarında bağırsak bariyer bütünlüğünün korunması önem kazanmaktadır (Vancamelbeke, & Vermeire, 2017).

Fonksiyonel ve immunolojik işlevleri olan bağırsak bariyerinin en dış katmanını, dışardan gelen etkenlere karşı fiziksel koruma sağlayan mukus tabakası oluşturmaktadır. Jel kıvamındaki bu tabaka epitel hücrelerinin üzerini kaplar ve kommensal bakteriler, antimikrobiyal peptidler ve immunglobulinleri içerisinde barındırır. Mukus tabakasının altındaki ikinci katman ise epiteliyal hücreleri ve bu hücreleri birbirine bağlayan ve molekül transportunda da görev alan tight junctions (TJs)'ları kapsamaktadır. Son katman olan lamina propria ise T ve B hücreleri, dendrik hücreler, makrofajlar ve immün hücrelerini içermektedir (Vancamelbeke, & Vermeire, 2017). Miyenterik pleksusta bulunan enterik sinir hücrelerinin de immunolojik yanıt oluşumu ve bariyer bütünlüğünün korunmasında etkili olduğu bilinmektedir (Bischoff ve ark., 2014; Mischel ve ark., 2020). Bu katmanlar sağlıklı bağırsakta belirgin sınırlar ile ayrılırken; kronik hastalıklar, ilaçlar ve toksinler bağırsak bariyer bütünlüğünün bozulmasına neden olabilmektedir (Şekil 7).



Şekil.7. Sağlıklı (mavi) ve yangılı (kırmızı) bağırsaktaki bariyer görünümü (Cooney, Nagareddy, Murphy, & Lee, 2021).

Bağırsak bütünlüğünün bozulması sonucu, bağırsak içeriğinin dolaşıma karışması “geçirgen bağırsak sendromu” olarak adlandırılmaktadır (Bischoff ve ark., 2014; Mischel ve ark., 2020; Tan ve ark., 2014). Geçirgen bağırsak sendromu inflamasyon ile ilişkilendirilse de, inflamasyonun IBD’de hastalık semptomlarının görülmesinden önce ortaya çıktığını belirten yayınlar vardır (Vancamelbeke, & Vermeire, 2017). Bağırsak bütünlüğünün korunmasında bağırsak geçirgenliği, bağırsak mikrobiyotası ve mukozal bağışıklık arasındaki bir eş etkinlik ile sağlanmaktadır. Bu bağlamda gıdaların sindirimi, sıvı alımında artış, bağırsak epitelium katmanı, bağışıklık hücreleri, kan damarları, düz kaslar ve enterik sinir sisteminin bu eş etkinliğin oluşmasında önemlidir (Şekil 8).



Şekil.8. Bağırsak geçirgenliği, bağırsak mikrobiyotası ve mukozal bağışıklık arasındaki eş etkinlik (Bischoff ve ark., 2014).

Geçirgen bağırsak sendromu, idrar ve kan örneklerinin kullanıldığı *in-vivo*; biyopsi ile alınan doku örneklerinin kullanıldığı *ex-vivo*; hücre kültürü yöntemi ile bağırsak hücre hatlarının kullanıldığı *in-vitro*; qPCR, western blot ve immune boyamadan faydalanan *in-situ* yöntemler kullanılarak tespit edilebilmektedir (Vancamelbeke, & Vermeire, 2017).

Kronik opioid kullanımı bağırsak mikrobiyotasında disbiyozis (bağırsak mikrobiyotası dengesinin bozulması) oluşumuna neden olabilmektedir. Disbiyozis, bağırsak epitel hücrelerinde, nöroepitel mekanizma aracılı, fonksiyon bozukluğu oluşturarak geçirgen bağırsak sendromuna yol açar (Akbarali, & Dewey, 2019; Mischel ve ark., 2020; Muchhala ve ark., 2021). Kronik morfin uygulamasının bağırsak bariyer bütünlüğüne etkisi *in-vivo* (FIT-C dextran) ve *in-situ* (immune boyama) yöntemler kullanılarak ortaya konulmuştur (Kang ve ark., 2017). Ancak, bağırsak bariyerinin karmaşık yapısı göz önüne alındığında, bu değişimin mekanizması tam olarak netlik kazanmamıştır. Bu çalışmada, daha önce yapılan çalışmalardan farklı olarak bağırsak bütünlüğünü korumada rol oynayan interlökin (IL)-18, bariyer bütünlüğünün bir göstergesi olarak değerlendirilmiştir.

2.6. İnterlökin (IL-18)

İnterlökin (IL) -1 ailesine bağlı proinflamatuvar bir sitokin olan IL-18 1900'lü yılların sonunda keşfedilmiştir. Okamura ve ark. IL-18 blokajının *Propionibacterium*

acnes (*P. acnes*) aracılı oluşan hepato sitotoksisteyi engellediğini bildirmişlerdir (Okamura ve ark., 1995). T helper 1 (Th1) hücreleri aracılığıyla interferon gama (IFN- γ) üretimini arttıran IL-18, etkinliğini gösterebilmesi için IL-12'nin varlığına ihtiyaç duymaktadır (Nakanishi, 2018). Sitoplazmada pro-aktif (pro-IL-18) halde bulunan IL-18, caspase-1 proteaz enzimi aracılığı ile aktive edilmekte birlikte, makrofaj ve Kupffer hücrelerinin de doğrudan IL-18 üretebildikleri bilinmektedir (Tsutsui ve ark., 1999; Nakanishi, 2018).

Ön beyin ile alt beyin sapı arasında fizyolojik bir arayüz olan periaqueductal gray (periaqueductal gri; PAG) iç ve dış stres faktörlerine karşı davranışsal tepkilerin verilmesinde rol oynar (Benarroch, 2012). Hayvan deneyleri proinflatuar sitokinlerin amigdala, hipotalamus ve PAG'deki nörotransmitter salınımını etkilediğini göstermiştir (Dantzer, O'Connor, Freund, Johnson, & Kelley, 2008). İnsanlarda ise IL-18'in, MSS'ndeki opioid mekanizması ile duygusal düzen/ düzensizliğin bir belirteci olarak kullanılabileceği ortaya konulmuştur (Prossin ve ark., 2011). Enterik sinir sisteminden salınan IL-18, bağırsak goblet hücrelerinde antimikrobiyal peptid salınımını etkileyerek bağışıklığa, bağırsak bariyer bütünlüğünün korunmasına ve patojenik mikroorganizmaların elimine edilmesine yardımcı olmaktadır (Jarret ve ark., 2020). IL-18 mRNA ve protein, IL-18 bağlayıcı protein ve IL-18 reseptör seviyelerinin değerlendirildiği ağrı üzerine bir çalışmada ise, IL-18 aracılı nörotransmitter sinyal blokajının nöropatik ağrıyı azalttığı ve opioid grubu ilaçların (morfin ve buprenorfin) etkinliğini arttırdığı belirtilmiştir (Pilat ve ark., 2016).

Kronik opioid kullanımına bağlı IL-18 salınım ve etki mekanizmaları hakkında henüz yeterli literatür bulunmamaktadır. Bu kapsamda çalışmada, kronik morfin uygulamasının IL-18 salınımı üzerindeki etkisi, ileum longitudinal muscle myenteric plexus (LMMP) izolasyonu ile enterik nöronlardan salınımı qPCR yöntemi kullanarak ortaya konulması ve etki mekanizmasının anlaşılması hedeflenmiştir.

2.7. Yuva Yapma Davranışı

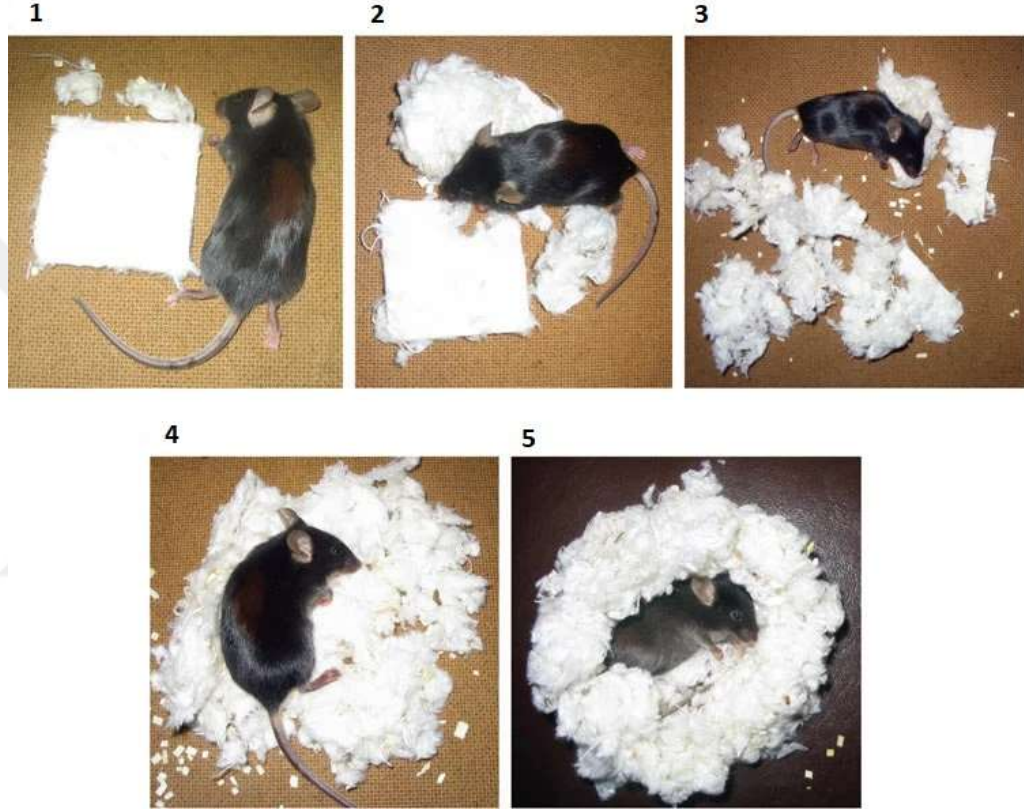
Yuva yapma davranışı taksonomik olarak yaygın görülen ve hayvanlar aleminde üreme başarısını arttıran bir davranıştır (Mainwaring ve ark., 2017). Omurgalılar, neredeyse tüm kuşlar ve birçok memeli türü, sürüngenler, amfibiler ve balıklar bir ya da birkaç farklı formda yuva yapma davranışı gösterirler. Yuva yapma davranışı yavruya gelişimini tamamlamak için gerekli zamanı kazandırmasından dolayı üreme başarısı için önemlidir (Hansell, 2005; Mainwaring ve ark., 2017). Yuvanın şekli ve yapısı, yuvanın yapıldığı bölgenin çevresel koşullarına göre uyarlanabilir. İklim değişikliği kaynaklı denizlerdeki yükselme, tropik fırtınalar sonucu yuvaları su basması, yuvalama alanı ile yuva yapım için gerekli malzeme temini ve cinsiyetin çevre sıcaklığına bağlı olarak değişebildiği türlerdeki orantısız dağılım göz önünde tutulduğunda doğada yaşayan hayvanlarda yuva yapma davranışı etkilenmektedir (Mainwaring ve ark., 2017).

Kemirgen hayvanlarda yuva yapımı barınmanın haricinde termoregülasyonun korunmasında önemlidir (Deacon, 2006). Laboratuvar ortamında yetiştirilen fareler de içgüdüsel olarak yuva yapma davranışı göstermektedir (Cheatham ve ark., 2021). Laboratuvar hayvanlarında yuva yapma davranışının tespiti kafeslerine bırakılan kompres halindeki materyalin kullanım oranına göre ölçülebilmektedir. Skorlama kafese konulmuş olan kompres materyalin parçalanma ya da kafes içindeki yer değiştirme oranına göre yapılır (Şekil 9). Bu test için saman, parçalanmış kağıt, kenevir ip, kompres pamuk ya da tüy gibi materyaller tercih edilmektedir. Bunlara arasında en yaygın kullanılanı kompres pamuk materyalidir (Deacon, 2006).

Yuva yapma davranışının beyinde deneysel oluşturulan lezyonlar, çeşitli farmakolojik ajanlar ve gen mutasyonlarına duyarlı olduğu bildirilmiştir (Deacon, Croucher, & Rawlins, 2002). Bu sebeple yuva yapma davranış testi, ağrı üzerine yapılan araştırmalarda, ağrıya bağlı işlevsel bozuklukluklar ve depresyonun ifadesi olarak ölçümlenebilmektedir (Deacon, 2006; Negus ve ark., 2015). Swiss Webster (SW) ırkı farelerde deneysel kolitis oluşturulduğu çalışma günlük olarak 1 ve 3,2 mg/kg dozlarında morfin uygulamasının, yuva yapma davranış skorlamasında düşüşe neden olduğu

gösterilmiştir (Cheatham ve ark., 2021). Fakat daha yüksek dozlarda akut veya kronik morfin uygulamasının, yuva yapma davranışı üzerine etkisi gizemini korumaktadır.

Çalışmada yuva yapma davranış testi yüksek dozda uygulanan morfine karşı gelişen toleransın, MSS üzerine olan olası etkisini ortaya çıkarmak için kullanılmıştır.



Şekil.9. Kompres pamuk materyali ile yuva yapma davranış testi skorlaması (Deacon, 2006).

2.8. Tolerans Gelişiminin Ağrı Uyaranlı Davranış Testi ile Ölçümü

Ağrı, Uluslararası Ağrı Çalışmaları Birliği (IASP) tarafından, gerçek veya potansiyel bir doku hasarından kaynaklanan veya bu şekilde tanımlanan, hoş olmayan bir duyu ve duygusal bir deneyim olarak tanımlanmıştır. Ağrı her ne kadar basit bir uyarana karşı verilen bir yanıt olduğu düşünülse de, oluşum mekanizması karmaşıktır ve ağrıya verilen cevap bireyden bireye göre değişebilmektedir (Ramabadran, & Bansinath, 1986).

Ağrı ölçüm deneylerinin insanlarda kullanımı için gereken etik izin belgesinin alınması zor olduğundan, ağrı deneylerinde ağırlıklı olarak rodentler kullanılmaktadır (Mogil, 2009). Ağrı ölçümü ya uyaranlı (Stimulus-Evoked) ya da uyaransız (non-

Stimulus-Evoked) ölçülebilecek davranış testleri ile yapılmaktadır. Uyaranlı davranış testlerinde, mekanik, sıcaklık (tail-flick, hot plate, ve termal probe testleri), soğuk (cold plate, acetone evaporation ve cold plantar testleri) uyaranları kullanılmaktadır. Uyaransız yapılan davranış testleri ise doğal olarak görülen (yuva yapma davranış testi), ağrının yüz ifadeleriyle ile ölçüldüğü (grimace scales testi) ya da ağrılı bir bireyin yaralı vücut kısmına yüklediği ağırlık miktarı (weight bearing) ile saptanmaktadır. Ağrı ölçüm deneyleri deneyin yapıldığı laboratuvar, deneyi yapan kişi ve kullanılan malzemelerden etkilenebileceği için sübjektif olarak kabul edilir (Deuis, Dvorakova, & Vetter, 2017; Tappe-Theodor and Kuner, 2014). Örneğin, kuyruk daldırma yöntemi (Tail-immersion) ile yapılan bir deneyde, fareler plastik tüp ya da tekstil materyali ile yapılan keseye sokulduklarında kuyruk çekme sürelerinin farklılıkların oluşabileceği gözlemlenmiştir (Ramabadran, Bansinanth, Turndorf, & Puig, 1989).

Ağrı deneylerinde hangi testin tercih edileceği, deneyde kullanılacak ilaç ve ortaya konulacak etki mekanizmasına göre belirlenmektedir. Sıcak su banyosu gibi termal uyaran kullanılarak yapılan “kuyruk daldırma testi” sedasyon gerektirmemesi, deney kontrolünün kolay olması gibi nedenlerle opioid türevi ilaçların analjezik etkilerinin test edilmesinde sıklıkla tercih edilmektedir (Ramabadran ve ark., 1989; Ramabadran, & Bansinath, 1986). Ayrıca bu test yöntemi spinal kord aracılı ağrının ölçülmesinde de kullanılmaktadır. Çalışmada kuyruk daldırma testinin kullanılmasının nedeni, kronik morfin uygulamasının MSS’indeki etkisinin dorsal kök nöronları (Dorsal Root Ganglia-DRG) aracılı iletimi ve dorsal kök nöronlarında aşırı duyarlılık oluşturmalarıdır (Mischel ve ark., 2018; Muchhala ve ark., 2021).

3. GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışma Virginia Commonwealth Üniversitesi'nde (VCU IACUC) Kurumsal Hayvan Bakım ve Kullanım Komitesi'nden alınan AM10322 protokol numaralı izin ile yürütülmüştür. Çalışmada 25–30 g ağırlığındaki, erkek, Swiss Webster (SW) ırkı fareler (Envigo, Indianapolis, IN, USA) ve 40-45 g ağırlığındaki the Institute of Cancer Research (ICR) erkek fareler (Envigo, Indianapolis, IN, USA) kullanılmıştır. Fareler her kafeste 5 adet olacak şekilde, 12 saatlik aydınlık / karanlık döngüsünde barındırılmış, yem ve su ad-libitum olarak sağlanmıştır.

3.1. *İn- vivo* ilaç Uygulamaları

3.1.1. Kronik Morfin Uygulamaları

3.1.1.1. Pelet Yöntemi

Yetmiş beş (75) mg/kg morfin (MP) veya plasebo (PP) peletler, SW farelerin dorsal bölgelerindeki cilt altı dokularına implante edildi. Farelere, traş etmeden önce %2,5 izofluran ile anestezi uygulandı, cilt %10 povidon iyot (General Medical Corp., Walnut, CA, USA) ile temizlendi. Boynun dibinde 1 cm yatay kesi yapmadan önce alkollü ped ile silindi. Pelet deri altına yerleştirildikten sonra, yara klipsleri (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) ile kesi alanı kapatıldı. Cerrahi bölge tekrar %10 povidon iyot ile temizlenerek aseptik cerrahi alanının kontaminasyonu minimuma indirildi. Hayvanlar toparlanma süreçlerini (7 gün) deney boyunca kalacakları kafeslerde geçirdiler.

3.1.1.2. Artan Dozlarda Morfin Uygulaması

Artan dozlarda morfin uygulaması, ICR farelere, dört gün boyunca, günde iki kere, intra peritoneal (i.p.) olarak, 20 mg/kg (1. gün), 40 mg/kg (2. ve 3. gün) ve 80 mg/kg (4. gün) dozunda yapıldı.

3.1.1.3. Günlük Morfin Uygulaması

Günlük morfin uygulaması SW farelerde yuva yapma davranış testi için kullanıldı. Bu uygulama farelere yedi gün boyunca, günde bir kez, s.c. olarak 10 mg/kg dozunda ve yuva yapma davranış testini başlatmadan otuz dakika önce yapıldı.

3.1.2. Mü-opioid Reseptör Blokajı

Mü-opioid reseptör (MOR) blokajı için uygulanan Nalokson (NLX), ICR farelere, dört gün boyunca, morfin uygulamasından 10 dk. önce, subkutan (s.c.) olarak, 2 mg/kg (1. gün), 4 mg/kg (2. ve 3. gün) ve 8 mg/kg (4. gün) dozunda yapıldı.

3.1.3. Bağırsak Mikrobiyotasını Değiştirmek için Yapılan Bütirik asit ve Vankomisin Uygulamaları

250 mmol dozunda seyreltilen Sodyum Bütrat (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), SW farelere, beş gün boyunca, günde iki kez, oral gavaj yoluyla, 10 mg/kg dozunda uygulandı. Bütirik asit oral gavaj uygulaması morfin (MP-BUT) ve plasebo (PP-BUT) peletlerin implante edilmesinin ertesi günü başladı.

Vankomisin (Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI, USA), SW farelere, on beş gün boyunca, günde iki kez, oral gavaj yoluyla, 10 mg/kg dozunda uygulandı. Vankomisin oral gavaj uygulaması morfin (MP-VAN) ve plasebo (PP-VAN) peletlerin implante edilmesinden sekiz gün önce başladı.

Çalışmada oral gavaj yönteminin tercih edilme nedeni doz ayarlamasının kolay olması ve suya katılımda oluşan sıvı tüketim isteksizliği ve canlı ağırlık kaybının önüne geçilmek istenmesidir (Kang ve ark., 2017)

3.2. Davranış Testleri

3.2.1. Kuyruk Daldırma Testi

Bu yöntem hayvanın kuyruğunun distal 1/3'ünü 56 °C sıcaklığındaki su banyosuna daldırılması suretiyle, spinal düzeydeki analjezik yanıtın ölçülmesi için kullanılan bir

testtir. Fareler test başlangıcı öncesi bir kese içerisinde zapturapta alındı. Doku hasarının oluşmaması için kuyruk ucu sıcak su banyosunda 10 saniyeyi geçmeyecek şekilde tutuldu.

Kronik morfin uygulaması yapılan SW ve ICR farelerin ilk olarak ağrı eşik (baseline) ölçümleri yapıldı. Ek doz morfin etkisi (challenge) için tüm farelere baseline ölçümlerinin hemen ardından s.c. 10 mg/kg morfin uygulandı. Yirmi dakika sonrasında ise kuyruk daldırma testi tekrarlandı. Maksimum potansiyel etki [Maximum Potensial Effect (% MPE)] aşağıdaki formül kullanılarak hesaplandı:

$$\% MPE = [(challenge\ zamanı - baseline\ zamanı) / (10 - baseline\ zamanı)] \times 100$$

3.2.2. Yuva Yapma Davranış Testi

Yuva yapma davranış testinde SW fareler kafeslerinde tek başlarına olacak şekilde yerleştirildi (Cheatham ve ark., 2021; Negus ve ark., 2015). Kare şeklindeki kompres pamuk yuva materyeli altı (6) eşit parçaya bölünerek, kafes içerisine eşit aralıklarla konuldu (Şekil 10). Bu deney öncesinde yapılan gavaj ve enjeksiyonlar aklimesyon periyodu başlamadan önce başka bir odada yapıldı. Fareler deneyin yapılacağı odaya, deney başlangıcından otuz (30) dakika önceden getirilip aklimesyonları sağlandı. Farelerin kompres pamuk materyalini kullanarak yuva yapmaları yüz (100) dakika boyunca gözlemlendi. Yuva yapma davranışının skorlanması farelerin kompres pamuk materyalini şekil 10'da gösterilen hayali çizgilerin dışına taşıma oranları ile yapıldı. Bu kapsamda testin 0, 1, 3, 10, 30 ve 100'üncü dakikaları yukarıdaki tanımlamaya göre skorlandı. Bu deneyde verilebilecek en yüksek skor beş (5)'tir. Bu skor, testin başlangıcında kafese yerleştirilen tüm kompres pamuk materyallerinin şekil 11'de gösterildiği gibi bir alanda toplandığı anlamına gelmektedir.



Şekil.10. “Yuva Yapma Davranış Testi” başlamadan önceki kompres pamuk materyalinin yerleşimi (Dakika=0, Yuva Yapma Davranışı Skorlaması=0). Resimdeki siyah çizgiler kafesin eşit alana bölündüğünü göstermek için fotoğraf üzerine sonradan çizilmiştir.



Şekil.11. Kontrol grubu farelerin Yuva Yapma Davranış Testi bitiminde (100 dakika) kafesteki kompres pamuk materyalinin pozisyonu (Dakika=100, Temizlenen Alan=5).

3.3. *Ex-vivo* İlaç Uygulamaları

3.3.1. Latin Kare (Latin Square) Metodu

Bu yöntem IL-18 salımındaki artışın direk morfin aracılı olup olmadığını test etmek için yapıldı. Bu uygulama için toplamda sekiz adet, herhangi bir ilaç uygulaması yapılmamış olan (naïve) ICR erkek fare kullanıldı.

Naïve farelerin ileum distalinin 12 cm'lik kısmı izole edildi. İzole edilen distal ileum dokuları aşağıdaki işlemlerden geçirildi:

- 20 ml'lik bir şırınga kullanılarak ileum içeriği soğuk Fosfat Tamponlu Tuz Çözeltisi (PBS) ile temizlendi.
- İleum uzunlamasına kesildi ve steril bir petri kabında soğuk PBS ile üç kez yıkandı.
- Dokular daha sonra dört eşit parçaya (her biri 3 cm) kesildi ve her parçanın ağırlığı kaydedildi (Şekil 12).
- Dokular tartıldıktan (Mettler-Toledo, Barcelona, İspanya) sonra her biri yaklaşık 1 cm olacak şekilde daha küçük doku parçacıklarına ayrıldı.
- Doku parçacıkları 6'lı bir hücre kültürü plakasında %5 Fetal Bovine Serum (FBS) + %1 Antibiyotik- Antimikotik (Gibco, ThermoFisher, Scientific, Waltham, MA, USA) içeren DMEM/F12 hücre kültürü besi yeri ile 2 saat süreyle inkübe (%5 CO₂ ve %95 O₂, 37°C) edildi.
- İnkübasyon periyodunun ardından doku parçacıkları üç kez %5 FBS-DMEM/F12 hücre kültürü besi yeri ile yıkandı.
- Her bir doku parçası, steril bir 12'li hücre kültürü plakasının tek bir oyuğuna aktarıldı.
- Oyuktaki doku parçaları üzerine eklenecek morfin (Cerilliant Corporation, Round Rock, Texas, USA) ve Nalokson (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) uygulaması için gereken hücre kültürü besi yeri aşağıdaki şekilde hazırlandı:

- Kontrol grubu hücre kültürü besi yeri:

%5 FBS + %1 Antibiyotik- Antimikotik içeren DMEM/F12 (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA)

- 10 µM Morfin grubu hücre kültürü besi yeri:

%5 FBS + %1 Antibiyotik- Antimikotik + 10 µM/ml morfin içeren DMEM/F12

- 10 μ M Morfin + Nalokson (NLX) grubu hücre kültürü besi yeri:
%5 FBS + %1 Antibiyotik- Antimikotik + 10 μ M/ml morfin + 1 μ M/ml Nalokson (NLX) içeren DMEM/F12
- NLX grubu hücre kültürü besi yeri:
%5 FBS + %1 Antibiyotik- Antimikotik + 1 μ M/ml Nalokson (NLX) içeren DMEM/F12
- Yukarıda ayrıntıları verilen hücre kültürü besi yerlerine Morfin ve Nalokson Latin kare yöntemine göre uygulandı (Tablo 1).
- Oyuktaki doku parçaları üzerine eklenen hücre kültürü besi yerleri 100 mg doku başına 1 ml besi yeri olacak şekilde ayarlandı ve inkübatörde (VWR-Air jacket- 10810-888; %5 CO₂ ve %95 O₂, 37°C) gece boyunca (yaklaşık 12 saat) inkübe edildi.
- Total RNA izolasyonu, inkübasyon bitimi takiben yapıldı.



Şekil.12. Latin Square metodunda kullanılan doku hazırlığı.

Tablo.1. Morfin ve Nalokson'ın Latin kare yöntemine göre uygulaması.

D1	D2	D3	D4
Kontrol	10 µM Morfin	NLX	10 µM Morfin + NLX
10 µM Morfin + NLX	Kontrol	10 µM Morfin	NLX
NLX	10 µM Morfin + NLX	Kontrol	10 µM Morfin
10 µM Morfin	NLX	10 µM Morfin + NLX	Kontrol

3.3.2. Durum Ortamı (Condition Media-CM) Yöntemi

Bu yöntem IL-18 salımındaki artışın kronik morfin aracılı bağırsak mikroçevresindeki değişikliklerden kaynaklı olup olmadığını tespit etmek için yapıldı.

Durum ortamı yönteminin birinci basamağında 10 adet ICR erkek fare kullanıldı. Fareler random olarak iki gruba ayrıldı:

Birinci gruba (serum fizyolojik, n=5) dört gün boyunca, günde iki kere, intra peritoneal (i.p.) olarak enjekte edildi (0,1 ml/10 g canlı ağırlık).

İkinci gruba (morfin, n=5) dört gün boyunca, günde iki kere, intra peritoneal (i.p.) olarak, 20 mg/kg (1. gün), 40 mg/kg (2. ve 3. gün) ve 80 mg/kg (4. gün) dozunda enjekte edildi (0,1 ml/10 g canlı ağırlık).

Beşinci günde, her fareden izole edilen distal ileum dokuları (her biri 3 cm) aşağıdaki işlemlerden geçirildi:

- 20 ml'lik bir şırınga kullanılarak ileum içeriği soğuk PBS ile temizlendi.
- İleum uzunlamasına kesildi ve steril bir petri kabında soğuk PBS ile üç kez yıkandı.
- Dokular tartıldıktan sonra her biri yaklaşık 1 cm olacak şekilde daha küçük doku parçacıklarına ayrıldı.

- Doku parçacıkları 6'lı bir hücre kültürü plakasında %5 FBS + %1 Antibiyotik- Antimikotik içeren DMEM/F12 hücre kültürü besi yeri ile 2 saat süreyle inkübe (%5 CO₂ ve %95 O₂, 37°C) edildi.
- İnkübasyon periyodunun ardından doku parçacıkları üç kez %5 FBS-DMEM/F12 hücre kültürü besi yeri ile yıkandı.
- Her bir doku parçası, steril bir 12'li hücre kültürü plakasının tek bir oyuğuna aktarıldı.
- Oyuktaki doku parçaları üzerine %5 FBS + %1 Antibiyotik- Antimikotik içeren DMEM/F12 hücre kültürü besi yerleri 100 mg doku başına 1 ml besi yeri olacak şekilde eklendi ve inkübatörde (%5 CO₂ ve %95 O₂, 37°C) gece boyunca (yaklaşık 12 saat) inkübe edildi.
- İnkübasyon sonunda her bir farenin ileumdan elde edilen süzüntüler, deneyin ikinci basamağında kullanılmak üzere, steril bir tüpe toplandı.

Durum ortamı yönteminin ikinci basamağında ise naïve ileum dokularının elde edilmesi için 2 adet ICR erkek fare kullanıldı. Naïve farelerden izole edilen distal ileum dokuları (her biri 15 cm) aşağıdaki işlemlerden geçirildi:

- 20 ml'lik bir şırınga kullanılarak ileum içeriği soğuk PBS ile temizlendi.
- İleum uzunlamasına kesildi ve steril bir petri kabında soğuk PBS ile üç kez yıkandı.
- 15 cm'lik iki doku parçasından biri, birinci basamaktaki serum fizyolojik, diğeri ise morfin grubundan toplanan supernatantlarda kullanılmak üzere 5'er eşit parçaya bölündü.
- Dokular tartıldıktan sonra her biri yaklaşık 1 cm olacak şekilde daha küçük doku parçacıklarına ayrıldı.
- Doku parçacıkları 6'lı bir hücre kültürü plakasında %5 FBS + %1 Antibiyotik- Antimikotik içeren DMEM/F12 hücre kültürü besi yeri ile 2 saat süreyle inkübe (%5 CO₂ ve %95 O₂, 37°C) edildi.

- İnkübasyon periyodunun ardından doku parçacıkları üç kez %5 FBS-DMEM/F12 hücre kültürü besi yeri ile yıkandı.
- Her bir doku parçası, steril bir 12'li hücre kültürü plakasının tek bir oyuğuna aktarıldı.
- Oyuktaki doku parçaları üzerine %5 FBS + %1 Antibiyotik- Antimikotik içeren DMEM/F12 hücre kültürü besi yerleri 100 mg doku başına 1 ml besi yeri olacak şekilde eklendi
- Deney setinin bu kısmında, birinci basamaktan farklı olarak, birinci basamakta toplanan ileum süpernatatları 0,5 ml hücre kültürü besi yerlerine eklendi ve ve inkübatörde (%5 CO₂ ve %95 O₂, 37°C) gece boyunca (yaklaşık 12 saat) inkübe edildi.
- Total RNA izolasyonu, inkübasyon bitimi takiben yapıldı.

3.4. Longitudinal Muscle Myenteric Plexus (LMMP) İzolasyonu

Bu yöntem IL-18 salınımındaki artışın enterik nöronlar aracılı olup olmadığını test etmek için kullanıldı. Longitudinal Muscle Myenteric Plexus, “durum ortamı” deneyinde kullanılan ICR erkek farelerden distal ileum (3 cm) ayrıldıktan sonra, arta kalan ince bağırsak dokusu alınarak izole edildi.

Longitudinal Muscle Myenteric Plexus İzolasyonunda (LMMP) daha önce yayınlanan protokollerden yararlanıldı (Smith, Ngwainmbi, Grider, Dewey, & Akbarali, 2013). Kısaca:

- İzole edilen ince bağırsak hemen soğuk Krebs (118 mMol NaCl; 4,6 mMol KCl; 1,3 mMol NaH₂PO₄; 1,2 mMol MgSO₄; 25 mMol NaHCO₃; 11 mMol glukoz; 2,5 mMol CaCl₂) solüsyonuna aktarıldı.
- Solüsyonun pH'sını dengede tutmak için izolasyon süresince Krebs solüsyonu sürekli olarak havalandırıldı (%95 O₂, %5 CO₂).
- Bağırsak içeriği iyice temizlenen dokular 1'er cm uzunluğunda parçalara ayrıldı.

- LMMP'yi içeren en dıştaki uzunlamasına kas tabakası, pamuklu çubuklar kullanılarak ayrıldı.
- İzole edilen LMMP dokuları soğuk Krebs solüsyonunda santrifüj (Beckman coulter allerga 6R refrigerated centrifuge; 350 x g, 30 s) edildi.
- Bu LMMP şeritleri daha sonra PCR analizi için RNA izolasyonuna alındı.

3.5. RNA İzolasyonu ve Nicel Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Real-Time qPCR)

İleum ve Longitudinal Muscle Myenteric Plexus'taki IL-18 mRNA miktar tayini için qPCR yöntemi kullanıldı.

Total RNA, TRIzol reaktifi (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA) kullanılarak ekstre edildi. Olası DNA kontaminasyonunu elimine etmek için, qPCR öncesi DNase I (RNase içermeyen) (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA) uygulandı. Nicel gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (qRT-PCR), bir Mini-Opticon RT-PCR sistemi ile (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) iTaq Universal SYBR Green One-Step kiti (Bio-Rad, Hercules) kullanılarak gerçekleştirildi (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Reaksiyon karışımı (20 µl), 300 nmol ileri (forward) primer, 300 nmol ters (reverse) primer, 10 µl 2X SYBR Green iTaq, 0,25 µl RT (reverse transkriptaz), 0,10 µg RNA numunesi ve 7.55 µl DEPC (RNase-DNase free water) içeriyordu.

Reverse transkriptaz işlemi 50 °C'de 10 dakikada yapıldı. DNA polimeraz enzimi 95°C'de 1 dakika da aktive edildi. PCR protokolü, denatürasyon (95°C'de 10 saniye) ve bağlanma/uzama (60°C'de 15-30 saniye) basamaklarını içeren 40 döngü ile tamamlandı. GAPDH internal kontrol olarak kullanıldı. IL-18 ifadesinin GAPDH'ye nispi ifadesi, $\Delta\Delta C_t$ yöntemi kullanılarak hesaplandı ve değerler, kontrol hayvanlarından kat değişimi olarak ifade edildi. Bu çalışmada kullandığımız primerler Tablo 2'de gösterilmiştir.

Tablo.2. Real-time PCR da kullanılan hedef gen ve dizilimi tablosu.

Hedef Gen	Gen Dizilimi
IL-18	Forward: 5'-CAGGCCTGACATCTTCTGCAA-3'
	Reverse: 5'-TCTGACATGGCAGCCATTGT-3'
GAPDH	Forward: 5'-CCATGGAGAAGGCTGGGG-3'
	Reverse: 5'-CAAAGTTGTCATGGATGACC-3'

3.6. İstatiksel Analiz

Çalışmada elde edilen veriler GraphPad Prism 8.3.0 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA) isimli program kullanıldı. Data setlerinin istatistiksel analizi yapılmadan önce normalite testi uygulandı ve normalite testini geçemeyen verilerin analizinde non-parametrik, normalite testini geçen verilerin analizinde ise parametrik testler kullanıldı. İki grup arası farklılıkların tayininde t-testleri kullanılırken ikiden fazla grupların analizinde One-way ANOVA testi kullanıldı. Tekrarlı ölçümlerin yapıldığı grup karşılaştırılmalarında ise Two-way ANOVA testinden faydalanıldı. İstatiksel anlam içeren “Yuva Yapma Davranış” parametrelerinde, hangi gruplar arası fark olduğunu belirlemek amacıyla Post hoc Sidak ya da Tukey’s testlerinden yararlanıldı. Yapılan değerlendirmelerde $P < 0,05$ anlamlılık düzeyinin istatistiki farkı temsil ettiği kabul edildi.

4. BULGULAR

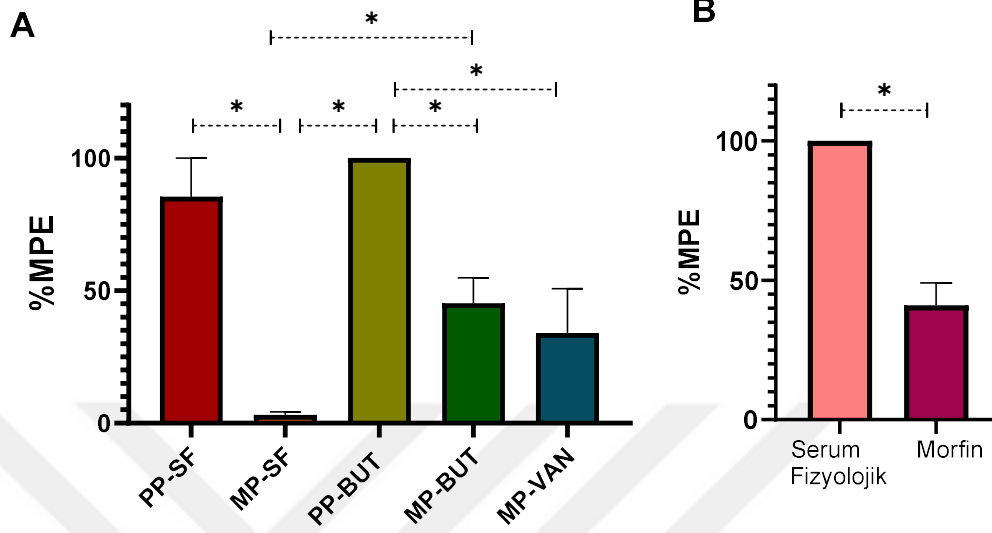
4.1. Morfine Karşı Gelişen Antinosiseptif Toleransın Değerlendirilmesi

Kronik morfine karşı gelişen antinosiseptif toleransın değerlendirilebilmesi için hem pelet (Şekil 13A) hem de artan doz i.p. morfin uygulaması (Şekil 13B) sonucu, plasebo pelet (PP) ve serum fizyolojik i.p. uygulaması yapılan farelerle karşılaştırıldığında, tolerans geliştiği gözlemlendi (PP-SF/ MP-SF, $P<0,0001$; Serum fizyolojik/ Morphine, $P=0,0003$).

4.2. Morfine Karşı Gelişen Antinosiseptif Toleransın Bütirik asit ve Vankomisin Uygulamaları ile Değerlendirilmesi

Oral gavaj yöntemiyle vankomisin (VAN) uygulamasının, morfine karşı gelişen antinosiseptif tolerans üzerine bir etkisi olmadı (Şekil 13A).

Öte yandan, oral gavaj yöntemiyle bütirik asit (BUT) uygulaması yapılan farelerin, serum fizyolojik oral gavaj uygulanan farelere (MP-SF) göre kuyruklarını sudan çekme sürelerinde (%MPE) uzama olduğu tespit edildi (MP-SF/ MP-BUT, $P=0,0003$; Şekil 13A).



Şekil.13. Bağırsak mikrobiyotasının antinosiseptif tolerans gelişimine etkisi.

Plasebo pelet - serum fizyolojik oral gavaj [PP- SF (n=5)]; Morfin pelet - serum fizyolojik oral gavaj [MP- SF (n=8)]; Plasebo pelet – bütirik asit oral gavaj [PP- BUT (n=10)]; Morfin pelet – bütirik asit oral gavaj [MP-BUT (n=15)]; Morfin pelet – vankomisin oral gavaj [MP- VAN (n=5)]; Serum fizyolojik (n=10); Morfin (n=25).

Veriler ortalama± standart hata olarak sunulmuştur

* P<0,05

4.3. Morfin Uygulamasının Yuva Yapma Davranışına Etkisi

4.3.1. Günlük Morfin Uygulaması

Günlük, s.c. 10 mg/kg morfin uygulamasının yuva yapma skorunu, birinci günden yedinci güne kadar, 100 dakikalık toplam deney süresinin ilk 30 dakikasında azalttığı görüldü. Toplamda yedi gün süren test günlerine (G) ilişkin yuva yapma davranış skorları Şekil 14’de (G1-G7) gösterilmiştir. Morfin uygulanan grup, serum fizyolojik uygulanan grupla karşılaştırıldığında zaman x ilaç etkileşiminde anlamlı farklılık olduğu tespit edildi [1. gün (F (4, 32) = 9,010, P< 0,001), 2. gün (F (4, 32) = 12,29, P< 0,001), 3. gün (F (4, 32) = 7,573, P< 0,001), 4. gün (F (4, 32) = 5,574, P= 0,0016), 5. gün (F (4, 32) = 3,839, P= 0,0117) , 6. gün (F (4, 32) = 8,271, P= 0,001), 7. gün (F (4, 32) = 6,933, P= 0,004)].

4.3.2. Morfin Pelet Uygulaması

Pelet yöntemi kullanılarak oluşturulan kronik morfin uygulamasının, yuva yapma skorunu, pelet implantasyonundan sonraki dördüncü güne kadar azalttığı gözlemlendi. Toplamda yedi gün süren test günlerine (G) ilişkin yuva yapma davranış skorları Şekil 15'te (G1-G7) gösterilmiştir. Morfin pelet uygulanan grup (MP), plasebo pelet uygulanan (PP) grupla karşılaştırıldığında zaman x ilaç etkileşiminde anlamlı farklılık olduğu tespit edildi [(1. gün $F(4, 24) = 15,83, P < 0,001$), 2. gün ($F(4, 24) = 16,53, P < 0,001$), 4. gün ($F(4, 24) = 6,789, P = 0,0008$)]. Pelet implantasyonunun dördüncü gününden sonra ise MP ve PP grupları yuva yapma davranış skorları arasındaki farkın istatistiksel önem düzeyinde olmadığı görüldü [(5. gün $F(8, 68) = 0,1463, P = 0,9965$), 6. gün ($F(8, 68) = 0,2656, P = 0,9749$)].

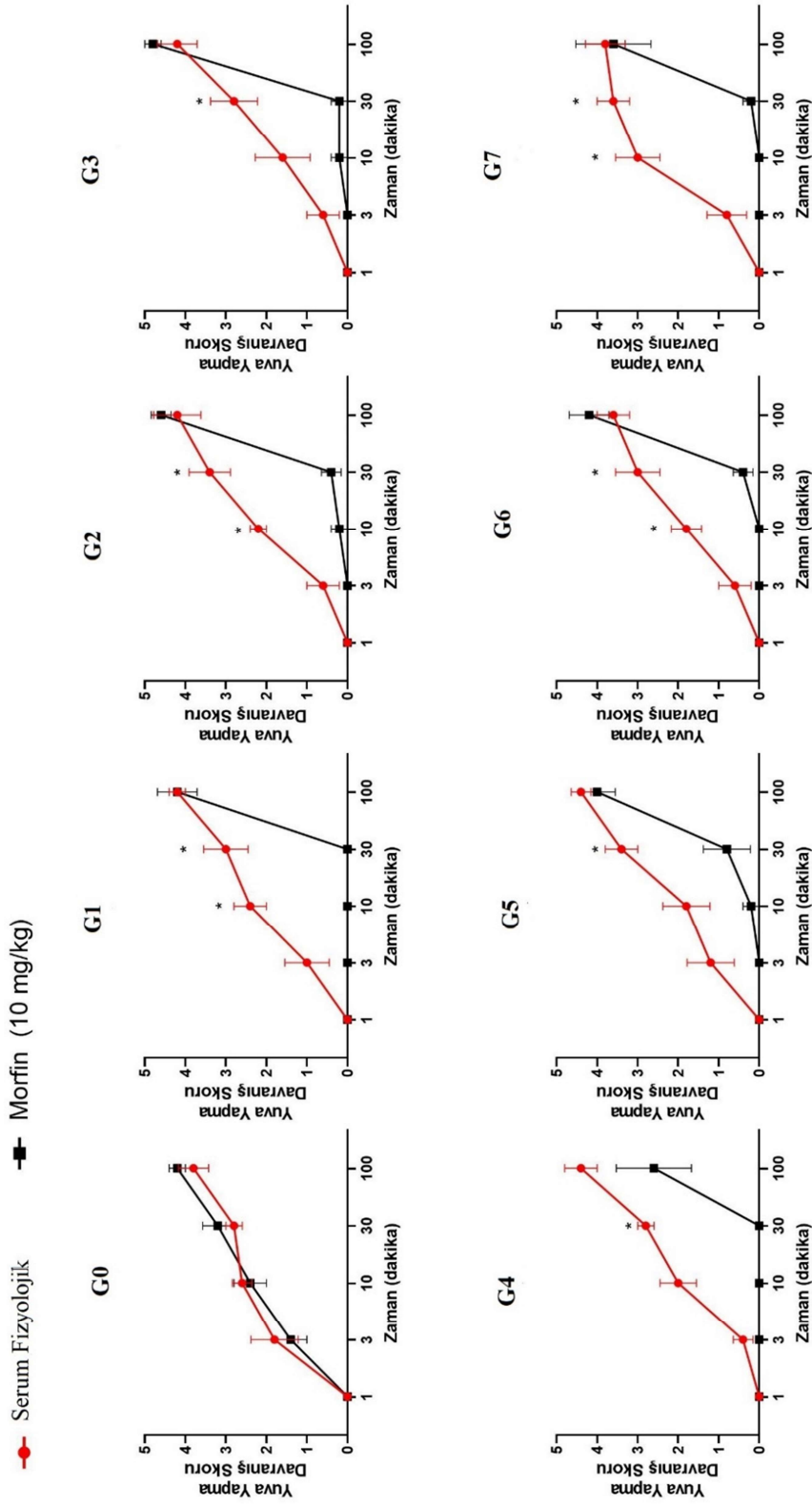
Deneyin yedinci gününde, deney başlangıcından 30 dakika öncesinde, tüm farelere yapılan ek doz s.c. 10 mg/kg morfin uygulaması, PP grubundaki farelerin yuva yapma davranış skorlarında düşüş oluşturdu. MP grubu, PP grubu ile karşılaştırıldığında, zaman x ilaç etkileşiminde anlamlı farklılık olduğu tespit edildi [$F(4, 24) = 3,904, P = 0,0140$]; Şekil 15H)].

4.4. Yuva Yapma Davranışının Bütirik asit ve Vankomisin Uygulamaları ile Değerlendirilmesi

Oral gavaj yöntemiyle vankomisin (MP-VAN) uygulamasının, yuva yapma davranış skoru üzerine bir etkisi olmadı (Şekil 16B-H).

Oral gavaj yöntemiyle bütirik asit (BUT) uygulaması, pelet implantasyonundan sonraki ikinci günde yuva yapma davranış skorunda artışa neden oldu. Morfin pelet uygulanan farelerde, oral gavaj bütirik asit uygulaması (MP-BUT), oral gavaj vankomisin uygulaması (MP-VAN) ile karşılaştırıldığında zaman x ilaç etkileşiminde anlamlı farklılık olduğu tespit edildi ($P = 0,0128$; Şekil 16C).

Deneyin yedinci gününde, deney başlangıcından 30 dakika öncesinde, tüm farelere yapılan ek doz s.c. 10 mg/kg morfin uygulaması, gruplar arasında yuva yapma davranış skorunda istatistiksel önem düzeyinde fark oluşturmadı (Şekil 16H).



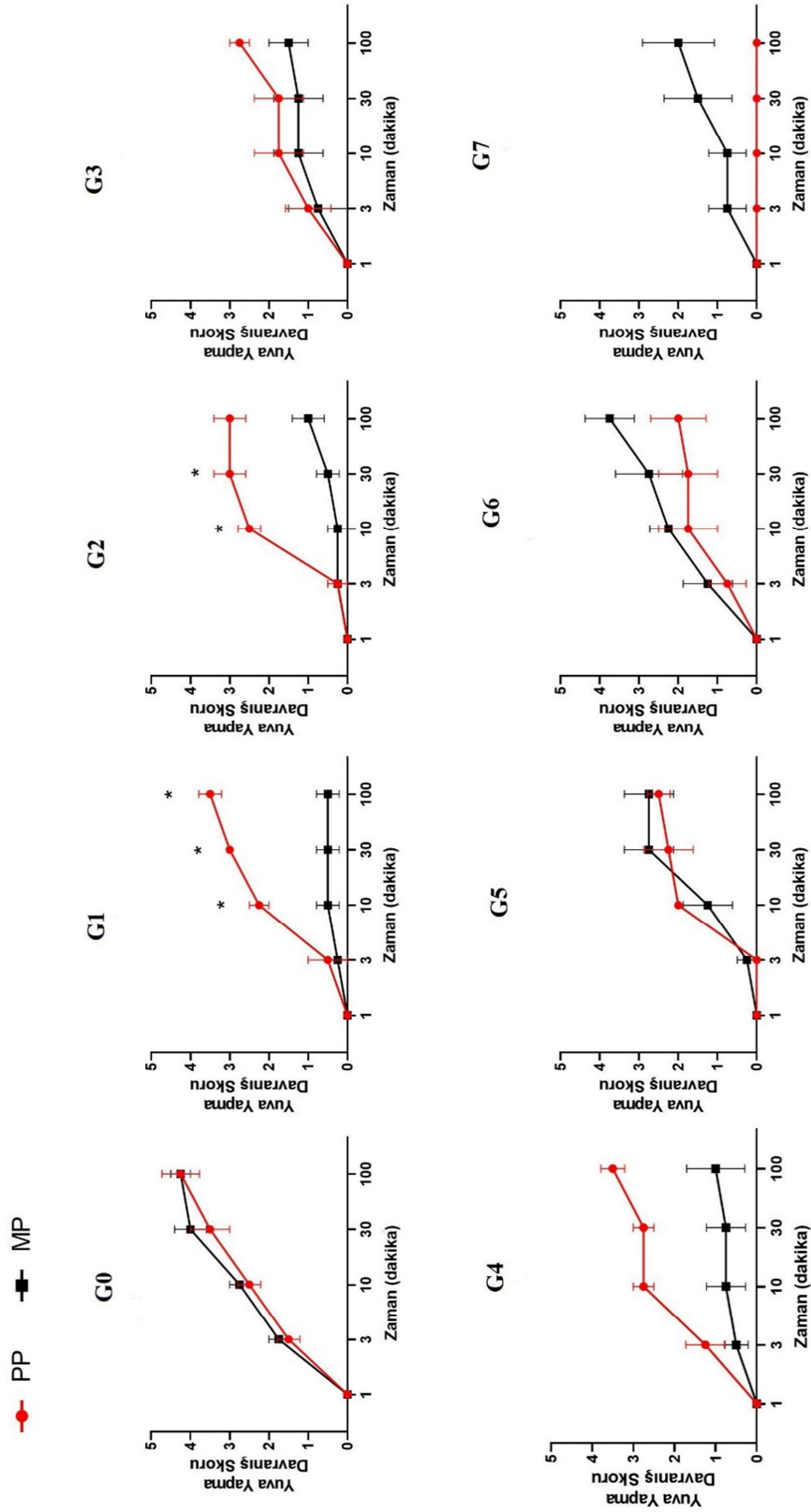
Şekil.14. Günlük morfin uygulamasının yuva yapma davranışına etkisi.

G0 herhangi bir ilaç/cerrahi işlem öncesindeki yuva yapma davranış skoru (baseline); G1-G7 ameliyat veya enjeksiyondan sonraki yuva yapma davranış skorlarını göstermektedir.

Serum Fizyolojik (n=5); Morfin (n=5)

Veriler ortalama± standart hata olarak sunulmuştur.

* P<0,05



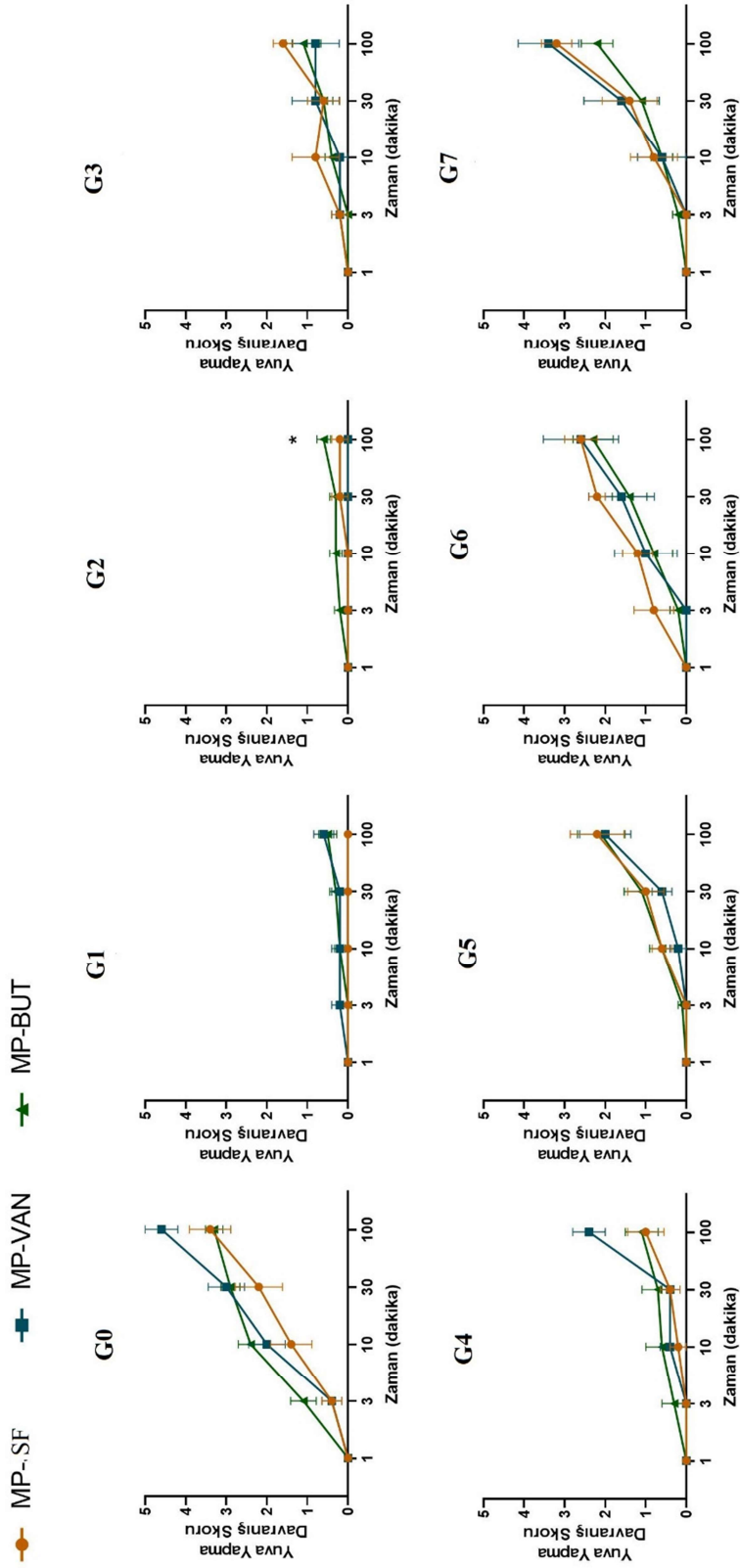
Şekil.15. Kronik morfin uygulamasının yuva yapma davranışına etkisi.

G0 herhangi bir ilaç/cerrahi işlem öncesindeki yuva yapma davranış skorunu (baseline); G1-G6 ameliyat veya enjeksiyondan sonraki yuva yapma davranış skorlarını; G7 ise 10 mg/ kg morfin uygulaması (challenge) sonrası yuva yapma davranış skorunu göstermektedir.

Plasebo pelet [PP (n=4)]; Morfin pelet [MP (n=4)]

Veriler ortalama± standart hata olarak sunulmuştur.

* P<0,05



Şekil.16. Bağırsak mikrobiyotasının yuva yapma davranışına etkisi.

G-0 herhangi bir ilaç/cerrahi işlem öncesindeki yuva yapma davranış skorunu (baseline); G1-G6 ameliyat veya enjeksiyondan sonraki yuva yapma davranış skorlarını; G7 ise 10 mg/ kg morfin uygulaması (challenge) sonrası yuva yapma davranış skorunu göstermektedir.

Morfin pelet - Serum fizyolojik oral gavaj [MP- SF (n=5)]; Morfin pelet – butirik asit oral gavaj [MP-BUT (n=10)]; Morfin pelet – vankomisin oral gavaj [MP- VAN (n=5)]

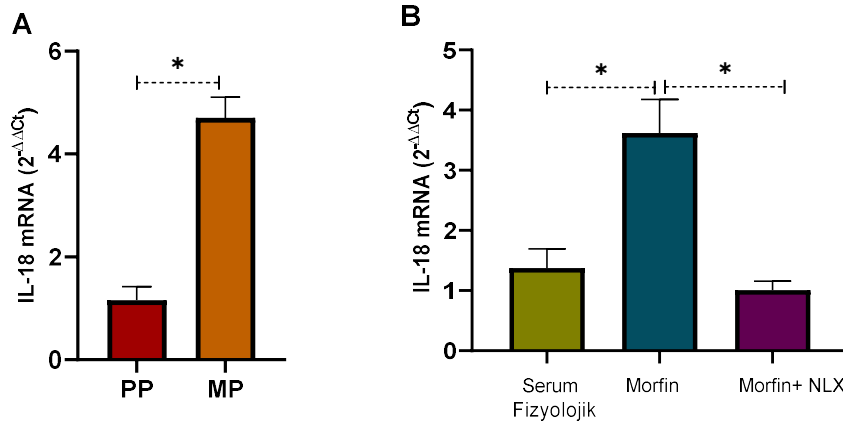
Veriler ortalama± standart hata olarak sunulmuştur.

* P<0,05

4.5. Kronik Morfin Uygulamasının IL-18 Salınımına Etkisi

Kronik morfin uygulamasının, distal ileumdaki IL-18 salınımını hem pelet (Şekil 17A) hem de artan doz i.p. morfin uygulaması yapılan farelerde (Şekil 17B), arttırdığı gözlemlendi (PP/ MP, $P<0,0001$; Serum fizyolojik/ Morphine, $P=0,0021$).

Artan doz i.p. morfin uygulamasından 10 dakika önce, s.c. Nalokson uygulaması ise IL-18 salınımındaki morfinin etkisi tersine çevirdi ($P=0,0030$; Şekil 17B).



Şekil.17. Kronik morfin uygulamasının IL-18 salınımına etkisinin qPCR metoduyla ortaya konulması.

Plasebo pelet [PP (N=9)]; Morfin pelet [MP (n=9)]; Serum fizyolojik (n=10); Morfin (n=9) ve Morfin+ Nalokson [NLX] (n=5).

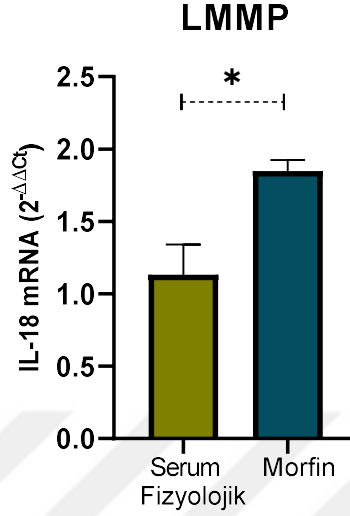
Veriler ortalama± standart hata olarak sunulmuştur

* $P<0,05$

4.6. Morfin Aracılı IL-18 Salınımının Etki Mekanizması

4.6.1. Longitudinal Muscle Myenteric Plexus (LMMP) İzolasyonu ile Değerlendirilmesi

Artan doz i.p. morfin uygulamasının, Longitudinal Muscle Myenteric Plexus (LMMP)'daki IL-18 salınımını arttırdığı gözlemlendi (Serum fizyolojik/ Morfin; $P=0,0119$; Şekil 18).



Şekil.18. Morfin uygulamasının longitudinal muscle myenteric plexus (LMMP)'daki IL-18 salınımına etkisi

Serum fizyolojik (n=5); Morfin (n=5);

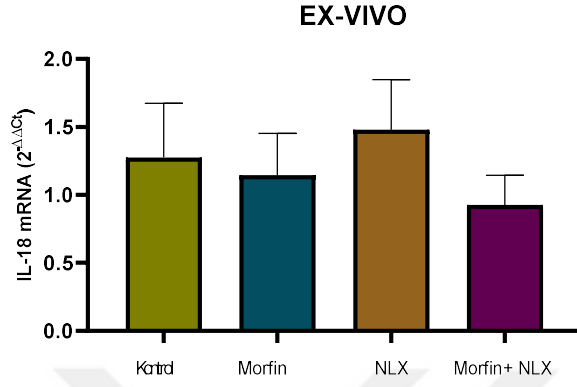
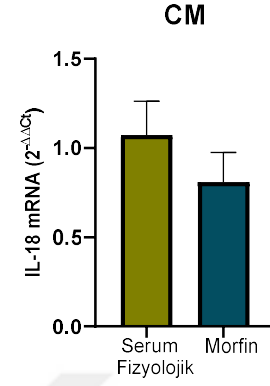
Veriler ortalama $\pm$ standart hata olarak sunulmuştur.

* P<0,05

4.6.2. Lantin Square ve Condition Media Methodları ile Değerlendirilmesi

Herhangi bir ilaç uygulaması yapılmamış olan (naïve) farelerden toplanan ileum dokusunun 12 saat boyunca morfin içeren hücre besisi kültürü ile [Kontrol, Morfin (10 μ M/ml), NLX (1 μ M/ml) ve Morfin (10 μ M/ml) + NLX (1 μ M/ml)] hücre kültürü ortamında inkübasyonunun IL-18 salınımına etki göstermediği gözlemlendi (Şekil 19A).

Naïve ileum dokusunun 12 saat boyunca artan dozlarda kronik morfin uygulanan farelerden toplanan ileum süzüntüleri (%5 FBS + %1 Antibiyotik- Antimikotik içeren DMEM/F12 hücre kültürü besiyeri + 0,5 ml serum fizyolojik süpernatant; %5 FBS + %1 Antibiyotik- Antimikotik içeren DMEM/F12 hücre kültürü besiyeri + 0,5 ml morfin süpernatant) ile hücre kültürü ortamında inkübasyonunun IL-18 salınımına etki göstermediği gözlemlendi (Şekil 19B).

A**B**

Şekil.19. Morfin uygulamasının IL-18 salınımındaki aracılığının ortaya konulması.

Serum fizyolojik (n=5); Morfin (n=5);

ex-vivo; Kontrol (n=8); Morfin (n=8); Nalokson [NLX (n=8)] ve Morfin+ Nalokson [NLX] (n=8)

Veriler ortalama± standart hata olarak sunulmuştur.

* P<0,05

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Opioidlere karşı gelişen tolerans mekanizmalarını aydınlatabilmek için yapılan bu çalışmanın sonunda,

- i) kronik morfin uygulaması yuva yapma davranış skorunda azalmaya neden olduğu gösterildi. Bu etki ağrı uyaranlı davranış testleri ile de doğrulandı.
- ii) vankomisin (antibiyotik) ve bütirik asit (SCFA) kullanılarak oluşturulan bağırsak mikrobiyota değişikliğinin morfine karşı gelişen nosiseptif toleransı azalttığı ancak MSS’nde gelişen toleransa etkili olmadığı gösterildi.
- iii) kronik morfin uygulamasının ileum dokusunda IL-18 salınımını mü-opioid reseptör aracılı arttırdığı gözlemlendi.
- iv) bağırsak bariyer bütünlüğünün korunmasında rol oynayan IL-18 salınımının ise enterik nöronlar aracılı olabileceği gözlemlendi.

Yapılmış olan araştırmalar, opioid analjeziklerin İnflamatuvar Bağırsak Hastalığı (IBD)’nın patofizyolojisini kötüleştirebileceğini ve hastalarının yaşam kalitesini önemli ölçüde azaltabileceğini öne sürmektedir (Banerjee ve ark., 2016; Roy ve ark., 2011; Sharma ve ark., 2020; Targownik, Nugent, Singh, Bugden, & Bernstein, 2014). Hayvanların doğal davranışlarından olan, uyaransız oluşan davranışlar, insanlarda depresyonun klinik öncesi göstergesi olarak kullanılabilir (Cheatham ve ark., 2021). Fareler, doğal ortamlarında avcılardan ve olumsuz çevre koşullarından korunmak için yuva yapma davranışı sergilerler (Latham, & Mason, 2004). Laboratuvar ortamında barındırılan fareler de içgüdüsel olarak yuva yapma davranışı sergilerler ve bu skor, ağrı ve hayvan refahının göstergesi olarak kullanılabilir (Cheatham ve ark., 2021; Gaskill, & Pritchett-Corning, 2016). Günlük s.c uygulanan 1 ve 3,2 mg/kg dozlarındaki morfin enjeksiyonunun, yedi günlük test süresince, birinci günden dördüncü güne kadar yuva yapma davranış skorunu azalttığı gözlenmiştir (Cheatham ve ark., 2021). Yapılan

çalışmada ağrı uyaranlı deneylerde maksimum etkiyi oluşturan 10 mg/kg morfin dozu, yuva yapma davranış skoruna etkisini gözlemek için uygulandı. Günlük 10 mg/kg morfin uygulaması tüm test günlerinde, yuva yapma davranış skorunu ilk otuz dakika boyunca azalttı. Bu sonuç, morfin uygulamasının yuva yapma davranışını geçici olarakta olsa baskıladığını göstermektedir. Bu sonuç, morfin uygulamasının merkezi sinir sisteminde baskılayıcı bir etki oluşturabileceğini kanıtlar niteliktedir.

Opioid toleransın birçok hücreyel yolağın modülasyonunu da içeren karmaşık bir fenomen olduğu bilinmektedir. Çeşitli dokularla yapılan çalışmalar tolerans gelişiminin sadece bir mekanizma ile açıklanamayacağını ortaya çıkarmıştır (Kang ve ark., 2017) Pelet yöntemiyle oluşturulan kronik morfin uygulaması ile gerçekleştirdiğimiz yuva yapma davranış testinde birinci, ikinci ve dördüncü günlerde morfin pelet (MP) yerleştirilen farelerde, plasebo pelet (PP) yerleştirilenlere oranla, yuva yapma davranış skorlarının istatistiksel olarak düşük olduğu gözlemlendi. Dördüncü günden sonra yuva yapma davranış skorunun tekrar yükseldiği görüldü. Yedinci gündeki ek morfin (s.c. 10 mg/kg morfin) uygulaması PP grubunda yuva yapma davranışını baskılamakta, MP grubuna etki göstermedi. Çalışmada elde edilen bu bulgu, morfine karşı gelişen opioid toleransının sadece ağrı-uyaranlı davranış testi ile değil aynı zamanda ağrı-uyaransız davranış testleri ile de ortaya çıkarılabilmesi açısından orijinallik arz etmektedir.

Bağırsak mikrobiyotasının Bağırsak-Beyin Aksı aracılı MSS ile de bağlantılı olduğu ve mental bozuklukların prognozu üzerinde etkin bir rol oynadığı bilinmektedir (Bravo ve ark., 2012; Sharon ve ark., 2016). Kronik morfin uygulamasının sindirim kanalındaki yerleşik mikrobiyal kompozisyonu değiştirebildiği hatta bakterilerin bağırsak epiteliyal bariyerini geçebilmelerine neden olduğu bilinmektedir (Banerjee ve ark., 2016; Kang ve ark., 2017; Mischel ve ark., 2018; Muchhala ve ark., 2021). Kronik morfine karşı gelişen toleransın bağırsak mikrobiyotasında oluşan disbiyozis kaynaklı olabileceği rapor edilmiştir (Akbarali, & Dewey, 2017; Banerjee ve ark., 2016; Kang ve ark., 2017). Bu çalışmada, yuva yapma davranış testinin, opioidlere karşı merkezi sinir sisteminde gelişen toleransın ve Bağırsak-Beyin Aksı bağlantısının göstergesi olabileceği düşünülmüştür.

Yapılan literatür taramasında farelerde kronik morfin uygulamasının bağırsak mikrobiyom kompozisyonu ve sayısını değiştirebildiği, geniş spektrumlu antibiyotik

uygulamasının ise bağırsak mukozal bariyer tahribatı, geçirgenliği ve yangısından oluşan patolojiyi engelleyebildiği görülmüştür (Kang ve ark., 2017). Bağırsak mikrobiyom kompozisyon ve sayısının gram pozitif bakterilere etkili bir antibiyotik olan vankomisin ile değiştirilmesinin, morfine karşı gelişen antinositeptif tolerans gelişimini kısmen azalttığı ağrı-uyaranlı davranış testleri (Kang ve ark., 2017; Mischel ve ark., 2018) ile ortaya konulmuştur. Ancak, vankomisin uygulamasının opioid tolerans gelişimine etkisini ortaya koyan ağrı uyaransız davranış test verileri ile ilgili yeterli literatüre rastlanılmamıştır.

Bağırsak mikrobiyotası tarafından üretilen mikrobiyal metabolitler, beyin fonksiyonları ve davranış üzerine etkilidir. Mikrobiyal metabolitlerin en önemlilerinden kısa zincirli bir yağ asidi olan bütirik asit, diyet yoluyla alındığında bağırsak mikroçevresinde değişimlere neden olabilmektedir. Bütirik asit çoğunlukla bağırsak epitel hücreleri için enerji kaynağı olarak kullanılsa da, bir kısmının genel dolaşıma katıldığı düşünülmektedir (Stilling ve ark., 2016). Bağırsak mikrobiyotasının kokain-aracılı davranışlara etkisinin araştırıldığı çalışmada, vankomisinin de yer aldığı antibiyotik uygulamasının bakteri çeşitliliğini azaltarak kokaine yönelme davranışını arttırdığı gösterilmiştir. Diyetle kısa zincirli yağ asitleri takviyesinin ise antibiyotik uygulaması sonucu ortaya çıkan kokaine yönelme davranışını tersine çevirdiği bildirilmiştir (Kiraly ve ark., 2016).

Bu çalışmada, kronik morfin ile birlikte uygulanan vankomisin ve bütirik asidin, merkezi opioid toleransı üzerine etkisinin, ağrı uyaransız davranış testleriyle ortaya konulması hedeflendi. Çalışmaya aynı zamanda, ağrı uyaralı davranış testleri de kronik morfine karşı gelişen toleransın gösterilmesi ve bağırsak mikrobiyota değişikliğinin tolerans gelişimindeki etkinliğini doğrulayabilmek için dahil edildi. Şekil 13A incelendiğinde vankomisinin ek doz morfin (challenge) uygulamasına karşı oluşan, kuyruğun sudan çekme süre artışını ifade eden maksimum potansiyel etkiyi (%MPE) istatistiksel anlam düzeyinde olmasa da arttırdığı görülmektedir. Aynı yöntem kullanılarak yine farelerde yapılan bir çalışmada (Mischel ve ark., 2018) vankomisin uygulamasının

kuyruk çekme süresinde gecikmeye neden olduğu bildirilmiştir. Çalışmada elde ettiğimiz artış verisinin istatistiksel düzeyde anlamlı bulunmamasının nedeni daha az sayıda denek kullanılması olabileceği düşünülmektedir.

Bütirik asit uygulamasının ağrı uyaranlı davranış testindeki etkisinin gösterildiği Şekil 13A daki bulgular incelendiğinde, bütirik asidin kronik morfin uygulamasına bağlı kuyruğun sudan çekme süre artışını ifade eden, maksimum potansiyel etkideki düşüşü tersine çevirdiği bulundu. Çalışmanın orijinal yönlerinden biri olan, kronik morfine karşı gelişen opioid toleransının merkezi sinir sistemi üzerindeki etkisinin ortaya konulması amaçlı yapılan ağrı uyarsız (yuva yapma) davranış testinde bütirik asit, kronik morfinin yuva yapma davranış skorunda, ağrı uyaranlı davranış testinden farklı olarak, artışa neden olmadığı saptandı. Bu bulgu opioidlere karşı gelişen tolerans mekanizmasındaki karmaşıklığın anlaşılmasında, ağrı uyarsız davranış testlerinin, kronik morfinin merkezi sinir sistemi üzerindeki etkilerinin araştırılması için kullanılabilecek önemli bir yöntem olduğunun ispatı niteliğindedir.

Bağırsak bariyeri, alınan besinlerin sindirilmesi sonucu elde edilen metabolitlerin dolaşıma katılması, hemostazın korunması ve bağırsakta bulunan patojenik bakterilerin etkilerini engellemede rol oynar (Bischoff ve ark., 2014; Tan ve ark., 2014). Bağırsak bariyer bütünlüğünün korunması, kronik gastrointestinal hastalıkların prognozundaki etkileri keşfedilmesinden bu yana, moleküler farmakoloji ve ilaç araştırmalarında hedef haline gelmiştir (Vancamelbeke, & Vermeire, 2017).

Kronik opioid kullanımı sonucu bağırsak bariyer bütünlüğünün hasara uğradığı ve buna bağlı olarak gelişen disbiyoz ve bakteriyel translokasyonun, sistemik inflamasyon oluşturduğu bilinmektedir (Banerjee ve ark., 2016; Kang ve ark., 2017). Ancak, bahsi geçen hasarın oluşum mekanizması ve dolayısıyla tedavisi ile ilgili önemli literatür eksikliği bulunmaktadır. Çalışmada hasarın oluşum mekanizmasının aydınlatılmasına ilişkin, bağırsak homeostazisinin ve mukozal bariyerin korunmasında rol oynayan IL-18'in kronik morfin uygulamasına bağlı salınımı değerlendirilmiştir.

IL-18 salınım düzensizliğinin epitel bariyer hasarı, mukus ve antimikrobiyal peptit (defensin ve RegIII gibi) salınımında aksaklıklara neden olduğu bilinmektedir (Jarret ve ark., 2020; Nowarski ve ark., 2015). Farelerde yapılan çalışmalar, bağırsak iltihabı ile

bağırsak geçirgenliğinin artmasının IL-18 salınımının artışına bağlı olması ile ilişkilendirilmiştir (Williams, O'Callaghan, & Corr, 2019). IL-18 salınımındaki artışın bağırsak bariyeri üzerinde oluşturduğu olumsuz etkilerin bir benzerinin de, kronik morfin uygulamasına bağlı da gözlemlendiği bilinmektedir (Banerjee ve ark., 2016; Kang ve ark., 2017; Meng ve ark., 2013; Wang ve ark., 2018). Ancak, kronik morfin uygulamasının bağırsak bariyer bütünlüğünde oluşturduğu hasarın, IL-18 aracılı olup olmadığı ile ilgili yeterli veri bulunmamaktadır.

Çalışmada hem pelet hem de artan dozlarda i.p. morfin uygulamasının, ileumda IL-18 salınımını arttırdığı tespit edildi. Artan doz morfin uygulaması öncesinde mü-opioid reseptörlerinin (MOR) bloke edilmesi (s.c. Nalokson) ise IL-18 salınımındaki artışı tersine çevirdi. Elde edilen veriler IL-18 salınımındaki artışın mü-opioid reseptör aracılı olabileceğini kanıtlamaktadır. Mü-opioid reseptörlerinin enterik nöronlarda lokalize olduğu bilgisi göz önüne alındığından (DiCello ve ark., 2020; Muchhala ve ark., 2021) çalışmanın bir sonraki basamağı olarak, kronik morfin uygulamasının ileum enterik nöronların yer aldığı longitudinal muscle myenteric plexus (LMMP)'taki IL-18 salınımına etkisinin ortaya konulması hedeflendi. Artan doz i.p. morfin uygulamasının longitudinal muscle myenteric plexusdaki IL-18 salınımını arttırdığı bulundu. Çalışmanın gerçekleştirildiği laboratuarda kronik morfin uygulamasının IL-18 salınımı arttırdığı bu çalışmada kullanılan qPCR yöntemine ek olarak immünoreaktivite deneyleri ile de doğrulanmıştır (Muchhala ve ark., 2022). Bulgularımız doğrultusunda kronik morfin aracılı IL-18 salınımının, enterik nöronların kontrolünde olduğunun gösterilmesi çalışmanın bir diğer orijinal yönüdür.

Gastrointestinal hastalıkların prognoz ve patofizyolojisine bağırsak mikrobiyotası değişimlerinin etkili olduğu ortaya konulmasının ardından çeşitli hastalıkların tedavisinde klinik öncesi deney basamaklarının tamamlanarak probiyotiklerin kullanılması önem kazanmıştır. Deney basamaklarından bir tanesi de güvenilir *ex-vivo* doku kültürü modellerinin oluşturulmasıdır. Bu modeller çoğunlukla gastrointestinal hastalıklarda, hastalardan biyopsi örneklerinin alınması ile gerçekleştirilmektedir (Udden, Waliullah, Harris, & Zaki, 2017; Wildenberg, & van den Brink, 2012). Ancak, bu modeller hastalıkların etki mekanizmalarının anlaşılması ve tedavi yöntemlerinin geliştirilmesinde

yetersiz kalabilmektedir. Çalışmada kullanılan *ex-vivo* Latin Square modelinin, moleküler farmakoloji ve ilaç araştırmaları alanında, ilaç etki yollarının ortaya çıkarılmasında yeni bir model olarak kullanılabileceği düşünülmüştür.

Latin Square modeli, her biri t kez tekrarlanan t sayıda işlemin, bir işlemin her satır ve sütunda yalnızca bir kez yer aldığı sistematik hataları azaltmaya yardımcı olacak şekilde tasarlanan ve *ex-vivo* doku kültür modellerine uyumlanabilecek bir deney setidir (Springer, 2008). Çalışmanın orijinal yönlerinden birisi de *ex-vivo* doku kültür yöntemi kullanılarak izole edilen herhangi bir ilaç uygulaması yapılmamış olan (naïve) ileum dokularına, morfin ve morfin antagonist etkisinin bağırsak mikrobiyotasından kaynaklanabilecek etkileri devre dışı bırakılarak ortaya konulmasıdır. Bu amaçla naïve ileum dokusunun 12 saat boyunca morfin ve morfin antagonist içeren hücre besisi kültürü [Kontrol, Morfin (10 µM/ml), NLX (1 µM/ml) ve Morfin (10 µM/ml) + NLX (1 µM/ml)] ile inkübe edildi. Gruplar arasında IL-18 salınımında farklılık olmadığı görüldü. Bulgular *in-vitro* hayvan modelleri kullanılarak kronik morfin uygulamasının IL-18 salınımında oluşturduğu artışın, kronik morfin aracılı mikrobiyota değişiminden kaynaklı olabileceğini göstermektedir.

Çalışmanın bir önceki basamağında, kronik morfin uygulamasının IL-18 salınımına olan etkisinin mikrobiyota kaynaklı olabileceğini ortaya koyduktan sonra, bu etkinin mikrobiyota aracılı salınan metabolitlerden (antimikrobiyal peptid, kısa zincirli yağ asitler, sitokinler gibi) köken alıp almadığı araştırıldı. Bu amaçla da bağırsak mikroçevresinde, mikrobiyota aracılı salınan metabolitlerden kaynaklı değişikliklerin ortaya konulması amacıyla, bir başka etkili *ex-vivo* deney modeli (Barbara ve ark., 2004; Cenac ve ark., 2007; Mischel ve ark., 2018) olan “Durum Ortamı” kullanıldı. Kronik morfin uygulanarak elde edilen kolon süzüntülerinin, naïve farelerden izole edilen dorsal root ganglia (DRG) nöronları ile inkübe edilmesi sonucu, DRG nöronlarında hipersensitivitenin indüklendiği rapor edilmiştir (Mischel ve ark., 2018). Bir başka çalışmada ise IBD’ye sahip hastalardan biyopsi yöntemiyle toplanan kolon dokularından elde edilen süzüntülerin, naïve farelerin kolonu ile inkübe edildiğinde, aşırı duyarlılık semptomlarına neden olduğu bildirmiştir (Cenac ve ark., 2007). Yapılan çalışmada ise, naïve ileum dokusunun artan dozlarda kronik morfin uygulanan farelerden toplanan ileum

süzüntüleri ile hücre kültürü ortamında inkübasyonunun da IL-18 salınımına etki göstermediği saptandı. Her iki *ex-vivo* deney modelinden elde edilen bulgular göstermektedir ki; morfin uygulamasına bağlı IL-18 salınımındaki artışın ne direk morfin ne de morfinin bağırsak mikroçevresinde oluşturduğu değişikliklerden kaynaklanmamaktadır. *In-vivo* deney modelinde elde edilen artışın ise farelerin bağırsak mikrobiyotasında kronik morfin uygulaması sonucu oluşan disbiyozise bağlı olabileceğini kanıtlar niteliktedir.

Sonuç olarak, kronik morfin uygulamasının hem ağrı uyaranlı hem de ağrı uyaransız davranış testlerine verilen yanıtta azalmaya neden olduğu; bağırsak mikrobiyotasının vankomisin ve bütirik aside bağlı değişiminin, ağrı uyaranlı davranış testlerinde morfinin etkisini tersine çevirdiği, ağrı uyaransız testlerde ise etki göstermediği; bağırsak bariyer bütünlüğünün korunmasında rol oynayan IL-18'in, mü-opioid reseptör aracılı ve enterik nöronlardan salındığı; ancak kronik morfin uygulamasına bağlı IL-18 salınımındaki artışının direk morfin ya da morfin aracılı değişen bağırsak mikroçevresinden kaynaklanmadığı gösterildi.

Çalışmayı gerçekleştirirken, sonuçlarını gerek sosyolojik gerekse ekonomik olarak halen hissetmekte olduğumuz COVID-19 pandemisi kaynaklı, çalışma süre ve olanaklarının kısıtlanması, planlanan bazı deney setlerinin tamamlanamamasına neden olmuştur. Ayrıca doktora eğitimim sırasında kazandığım bilimsel yetilerin ışığında, çalışmanın; morfin uygulamasının ağrı uyaranlı ve uyaransız davranış testleri ile ortaya konulmasında sadece birer adet davranış testi kullanılabilmesi; çalışmanın moleküler yöntemler kullanılarak elde edilen verilerinin sadece bir yöntem kullanılarak elde edilebilmesi ve transgenik fare modellerinde yapılamaması; ileum dokusundan elde edilen süzüntü içeriğinin maliyetleri nedeniyle analiz ettirilememesi gibi eksik yönlerinin de olduğu fark edilmiştir.

Moleküler farmakoloji ve ilaç araştırmaları alanlarına temel oluşturarak yeni konu başlıkları açabileceğini düşündüğümüz tez çalışması gelecek perspektifinde değerlendirildiğinde ise; opioidlerin merkezi sinir sistemindeki etkilerinin ağrı uyaransız yeni davranış modelleri oluşturularak ortaya çıkarılmasını; bağırsak bariyer bütünlüğünün korunmasında önemli olan IL-18 salınım yollarının moleküler düzeyde ortaya

konulmasını; opioid toleransının bağırsak- beyin aksı ve mikrobiyomu üzerinde etkilerinin metagenomik analizlerinin insan mikrobiyom mühendisliğinin de yardımıyla destekleyebileceği ön görülmektedir.



6. KAYNAKLAR

- Akbarali, H. I., & Dewey, W. L. (2017). The Gut-Brain Interaction in Opioid Tolerance. *Current Opinion in Pharmacology*, 37, 126–130. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2017.10.012>
- Akbarali, H. I., & Dewey, W. L. (2019). Gastrointestinal motility, dysbiosis and opioid-induced tolerance: Is there a link? *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 16(6), 323–324. <https://doi.org/10.1038/s41575-019-0150-x>
- Akbarali, H. I., Inkisar, A., & Dewey, W. L. (2014). Site and mechanism of morphine tolerance in the gastrointestinal tract. *Neurogastroenterology and Motility : The Official Journal of the European Gastrointestinal Motility Society*, 26(10), 1361–1367. <https://doi.org/10.1111/nmo.12443>
- Allen, J. M., Berg Miller, M. E., Pence, B. D., Whitlock, K., Nehra, V., Gaskins, H. R., White, B. A., Fryer, J. D., & Woods, J. A. (2015). Voluntary and forced exercise differentially alters the gut microbiome in C57BL/6J mice. *Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md.: 1985)*, 118(8), 1059–1066. <https://doi.org/10.1152/japplphysiol.01077.2014>
- Bäckhed, F., Roswall, J., Peng, Y., Feng, Q., Jia, H., Kovatcheva-Datchary, P., Li, Y., Xia, Y., Xie, H., Zhong, H., Khan, M. T., Zhang, J., Li, J., Xiao, L., Al-Aama, J., Zhang, D., Lee, Y. S., Kotowska, D., Colding, C., Tremaroli, V., Yin, Y., Bergman, S., Xu, X., Madsen, L., Kristiansen, K., Dahlgren, J., Jun, W. (2015). Dynamics and Stabilization of the Human Gut Microbiome during the First Year of Life. *Cell Host & Microbe*, 17(5), 690–703. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2015.04.004>
- Banerjee, S., Sindberg, G., Wang, F., Meng, J., Sharma, U., Zhang, L., Dauer, P., Chen, C., Dalluge, J., Johnson, T., & Roy, S. (2016). Opioid-induced gut microbial disruption and bile dysregulation leads to gut barrier compromise and sustained systemic inflammation. *Mucosal Immunology*, 9(6), 1418–1428. <https://doi.org/10.1038/mi.2016.9>
- Barbara, G., Stanghellini, V., De Giorgio, R., Cremon, C., Cottrell, G. S., Santini, D., Pasquinelli, G., Morselli-Labate, A. M., Grady, E. F., Bunnett, N. W., Collins, S. M., & Corinaldesi, R. (2004). Activated mast cells in proximity to colonic nerves

- correlate with abdominal pain in irritable bowel syndrome. *Gastroenterology*, 126(3), 693–702. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2003.11.055>
- Benarroch, E. E. (2012). Periaqueductal gray: An interface for behavioral control. *Neurology*, 78(3), 210–217. <https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e31823fcdee>
- Bielefeldt, K., Davis, B., & Binion, D. G. (2009). Pain and inflammatory bowel disease: *Inflammatory Bowel Diseases*, 15(5), 778–788. <https://doi.org/10.1002/ibd.20848>
- Bischoff, S. C. (2011). “Gut health”: A new objective in medicine? *BMC Medicine*, 9(1), 24. <https://doi.org/10.1186/1741-7015-9-24>
- Bischoff, S. C., Barbara, G., Buurman, W., Ockhuizen, T., Schulzke, J.-D., Serino, M., Tilg, H., Watson, A., & Wells, J. M. (2014). Intestinal permeability – a new target for disease prevention and therapy. *BMC Gastroenterology*, 14. <https://doi.org/10.1186/s12876-014-0189-7>
- Bravo, J. A., Dinan, T. G., & Cryan, J. F. (2011). Alterations in the central CRF system of two different rat models of comorbid depression and functional gastrointestinal disorders. *The International Journal of Neuropsychopharmacology*, 14(5), 666–683. <https://doi.org/10.1017/S1461145710000994>
- Bravo, J. A., Julio-Pieper, M., Forsythe, P., Kunze, W., Dinan, T. G., Bienenstock, J., & Cryan, J. F. (2012). Communication between gastrointestinal bacteria and the nervous system. *Current Opinion in Pharmacology*, 12(6), 667–672. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2012.09.010>
- Brownstein, M. J. (1993). A brief history of opiates, opioid peptides, and opioid receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90(12), 5391–5393.
- Carmody, R. N., Gerber, G. K., Luevano, J. M., Gatti, D. M., Somes, L., Svenson, K. L., & Turnbaugh, P. J. (2015). Diet dominates host genotype in shaping the murine gut microbiota. *Cell Host & Microbe*, 17(1), 72–84. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2014.11.010>
- Cenac, N., Andrews, C. N., Holzhausen, M., Chapman, K., Cottrell, G., Andrade-Gordon, P., Steinhoff, M., Barbara, G., Beck, P., Bunnett, N. W., Sharkey, K. A., Ferraz, J. G. P., Shaffer, E., & Vergnolle, N. (2007). Role for protease activity in visceral pain in irritable bowel syndrome. *Journal of Clinical Investigation*, 117(3), 636–647. <https://doi.org/10.1172/JCI29255>
- Cheatham, S. M., Muchhala, K. H., Koseli, E., Jacob, J. C., Komla, E., Negus, S. S., & Akbarali, H. I. (2021). Morphine Exacerbates Experimental Colitis-Induced Depression of Nesting in Mice. *Frontiers in Pain Research*, 2, 105. <https://doi.org/10.3389/fpain.2021.738499>

- Clapp, M., Aurora, N., Herrera, L., Bhatia, M., Wilen, E., & Wakefield, S. (2017). Gut microbiota's effect on mental health: The gut-brain axis. *Clinics and Practice*, 7(4), 987. <https://doi.org/10.4081/cp.2017.987>
- Collins, S. M., & Bercik, P. (2009). The relationship between intestinal microbiota and the central nervous system in normal gastrointestinal function and disease. *Gastroenterology*, 136(6), 2003–2014. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2009.01.075>
- Cooney, O. D., Nagareddy, P. R., Murphy, A. J., & Lee, M. K. S. (2021). Healthy Gut, Healthy Bones: Targeting the Gut Microbiome to Promote Bone Health. *Frontiers in Endocrinology*, 11. <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fendo.2020.620466>
- Dantzer, R., O'Connor, J. C., Freund, G. G., Johnson, R. W., & Kelley, K. W. (2008). From inflammation to sickness and depression: When the immune system subjugates the brain. *Nature Reviews Neuroscience*, 9(1), 46–56. <https://doi.org/10.1038/nrn2297>
- David, L. A., Maurice, C. F., Carmody, R. N., Gootenberg, D. B., Button, J. E., Wolfe, B. E., Ling, A. V., Devlin, A. S., Varma, Y., Fischbach, M. A., Biddinger, S. B., Dutton, R. J., & Turnbaugh, P. J. (2014). Diet rapidly and reproducibly alters the human gut microbiome. *Nature*, 505(7484), 559–563. <https://doi.org/10.1038/nature12820>
- Deacon. (2006). Assessing nest building in mice. *Nature Protocols*, 1(3), 1117–1119. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.170>
- Deacon, R. M. J., Croucher, A., & Rawlins, J. N. P. (2002). Hippocampal cytotoxic lesion effects on species-typical behaviours in mice. *Behavioural Brain Research*, 132(2), 203–213. [https://doi.org/10.1016/S0166-4328\(01\)00401-6](https://doi.org/10.1016/S0166-4328(01)00401-6)
- Deuis, J. R., Dvorakova, L. S., & Vetter, I. (2017). Methods Used to Evaluate Pain Behaviors in Rodents. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 10. <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fnmol.2017.00284>
- DiCello, J. J., Carbone, S. E., Saito, A., Rajasekhar, P., Ceredig, R. A., Pham, V., Valant, C., Christopoulos, A., Veldhuis, N. A., Canals, M., Massotte, D., & Poole, D. P. (2020). Mu and Delta Opioid Receptors Are Coexpressed and Functionally Interact in the Enteric Nervous System of the Mouse Colon. *Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology*, 9(3), 465–483. <https://doi.org/10.1016/j.jcmgh.2019.11.006>
- Dominguez-Bello, M. G., Costello, E. K., Contreras, M., Magris, M., Hidalgo, G., Fierer, N., & Knight, R. (2010). Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborns.

- Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(26), 11971–11975.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1002601107>
- Dowell, D., Haegerich, T. M., & Chou, R. (2016). CDC Guideline for Prescribing Opioids for Chronic Pain—United States, 2016. *MMWR. Recommendations and Reports*, 65. <https://doi.org/10.15585/mmwr.rr6501e1er>
- Elinav, E., Strowig, T., Kau, A. L., Henao-Mejia, J., Thaiss, C. A., Booth, C. J., Peaper, D. R., Bertin, J., Eisenbarth, S. C., Gordon, J. I., & Flavell, R. A. (2011). NLRP6 inflammasome regulates colonic microbial ecology and risk for colitis. *Cell*, 145(5), 745–757. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.04.022>
- European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction (EMCDDA). (2020). *European drug report: Trends and developments*. Publications office of the European Union.
- Frank, D. N., Amand, A. L. S., Feldman, R. A., Boedeker, E. C., Harpaz, N., & Pace, N. R. (2007). Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(34), 13780–13785.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0706625104>
- Galligan, J. J., & Akbarali, H. I. (2014). Molecular Physiology of Enteric Opioid Receptors. *American Journal of Gastroenterology Supplements (Print)*, 2(1), 17–21. <https://doi.org/10.1038/ajgsup.2014.5>
- Gaskill, B. N., & Pritchett-Corning, K. R. (2016). Nest building as an indicator of illness in laboratory mice. *Applied Animal Behaviour Science*, 180, 140–146.
<https://doi.org/10.1016/j.applanim.2016.04.008>
- Goodrich, J. K., Davenport, E. R., Waters, J. L., Clark, A. G., & Ley, R. E. (2016). Cross-species comparisons of host genetic associations with the microbiome. *Science (New York, N.Y.)*, 352(6285), 532–535.
<https://doi.org/10.1126/science.aad9379>
- Groschwitz, K. R., & Hogan, S. P. (2009). Intestinal barrier function: Molecular regulation and disease pathogenesis. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 124(1), 3–20. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2009.05.038>
- Gutstein, H. B., Akil, H. 2006. "Opioid Analgesics". Goodman & Gilman's the Pharmacological Basis of Therapeutics. Editör: Brunton, L. L., Lazo, J.S., Parker, K.L. New York: McGraw-Hill Companies.
- Hansell, M. (2005). *Animal Architecture*. İngiltere: Oxford University Press.

- Hedegaard, H., & Warner, M. (2021). *Drug Overdose Deaths in the United States, 1999–2020*. 428, 8.
- Holzer, P. (2007). Treatment of opioid-induced gut dysfunction. *Expert Opinion on Investigational Drugs*, 16(2), 181–194. <https://doi.org/10.1517/13543784.16.2.181>
- Holzer, P. (2014). Pharmacology of Opioids and their Effects on Gastrointestinal Function. *The American Journal of Gastroenterology Supplements*, 2, 9–16. <https://doi.org/10.1038/ajgsup.2014.4>
- Hooper, L. V., & Gordon, J. I. (2001). Commensal host-bacterial relationships in the gut. *Science (New York, N.Y.)*, 292(5519), 1115–1118. <https://doi.org/10.1126/science.1058709>
- Huang, R., Ning, H., Yang, L., Jia, C., Yang, F., Xu, G., & Tan, H. (2017). Efficacy of Probiotics on Anxiety: A Meta-analysis of Randomized Controlled Trials. *Neuropsychiatry*, 7(6), 862–871. <https://doi.org/10.4172/Neuropsychiatry.1000291>
- Jarret, A., Jackson, R., Duizer, C., Healy, M. E., Zhao, J., Rone, J. M., Bielecki, P., Sefik, E., Roulis, M., Rice, T., Sivanathan, K. N., Zhou, T., Solis, A. G., Honcharova-Biletska, H., Vélez, K., Hartner, S., Low, J. S., Qu, R., de Zoete, M. R., Palm, N. W., R'ng, A.M., Weber, A., Moor, A.E., Kluger, Y., Nowarski, R., Flavell, R. A. (2020). Enteric Nervous System-Derived IL-18 Orchestrates Mucosal Barrier Immunity. *Cell*, 180(1), 50-63.e12. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.12.016>
- Kang, Jeraldo, P. R., Kurti, A., Miller, M. E. B., Cook, M. D., Whitlock, K., Goldenfeld, N., Woods, J. A., White, B. A., Chia, N., & Fryer, J. D. (2014). Diet and exercise orthogonally alter the gut microbiome and reveal independent associations with anxiety and cognition. *Molecular Neurodegeneration*, 9(1), 36. <https://doi.org/10.1186/1750-1326-9-36>
- Kang, M., Mischel, R. A., Bhawe, S., Komla, E., Cho, A., Huang, C., Dewey, W. L., & Akbarali, H. I. (2017). The effect of gut microbiome on tolerance to morphine mediated antinociception in mice. *Scientific Reports*, 7(1), 42658. <https://doi.org/10.1038/srep42658>
- Kiraly, D. D., Walker, D. M., Calipari, E. S., Labonte, B., Issler, O., Pena, C. J., Ribeiro, E. A., Russo, S. J., & Nestler, E. J. (2016). Alterations of the Host Microbiome Affect Behavioral Responses to Cocaine. *Scientific Reports*, 6(1), 35455. <https://doi.org/10.1038/srep35455>
- Komla, E., Stevens, D. L., Zheng, Y., Zhang, Y., Dewey, W. L., & Akbarali, H. I. (2019). Experimental Colitis Enhances the Rate of Antinociceptive Tolerance to Morphine via Peripheral Opioid Receptors. *Journal of Pharmacology and*

- Experimental Therapeutics*, 370(3), 504–513.
<https://doi.org/10.1124/jpet.119.256941>
- Lara-Tejero, M., Sutterwala, F. S., Ogura, Y., Grant, E. P., Bertin, J., Coyle, A. J., Flavell, R. A., & Galán, J. E. (2006). Role of the caspase-1 inflammasome in *Salmonella typhimurium* pathogenesis. *Journal of Experimental Medicine*, 203(6), 1407–1412. <https://doi.org/10.1084/jem.20060206>
- Latham, N., & Mason, G. (2004). From house mouse to mouse house: The behavioural biology of free-living *Mus musculus* and its implications in the laboratory. *Applied Animal Behaviour Science*, 86(3–4), 261–289.
<https://doi.org/10.1016/j.applanim.2004.02.006>
- Ley, R. E., Hamady, M., Lozupone, C., Turnbaugh, P. J., Ramey, R. R., Bircher, J. S., Schlegel, M. L., Tucker, T. A., Schrenzel, M. D., Knight, R., & Gordon, J. I. (2008). Evolution of Mammals and Their Gut Microbes. *Science*, 320(5883), 1647–1651. JSTOR.
- Liu, B., He, Y., Wang, M., Liu, J., Ju, Y., Zhang, Y., Liu, T., Li, L., & Li, Q. (2018). Efficacy of probiotics on anxiety-A meta-analysis of randomized controlled trials. *Depression and Anxiety*, 35(10), 935–945. <https://doi.org/10.1002/da.22811>
- Louis, P., & Flint, H. J. (2009). Diversity, metabolism and microbial ecology of butyrate-producing bacteria from the human large intestine. *FEMS Microbiology Letters*, 294(1), 1–8. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2009.01514.x>
- Maguma, H. T., Dewey, W. L., & Akbarali, H. I. (2012). Differences in the characteristics of tolerance to μ -opioid receptor agonists in the colon from wild type and β -arrestin2 knockout mice. *European Journal of Pharmacology*, 685(1–3), 133–140. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2012.04.001>
- Mainwaring, M. C., Barber, I., Deeming, D. C., Pike, D. A., Roznik, E. A., & Hartley, I. R. (2017). Climate change and nesting behaviour in vertebrates: A review of the ecological threats and potential for adaptive responses. *Biological Reviews*, 92(4), 1991–2002. <https://doi.org/10.1111/brv.12317>
- Martin-Gallausiaux, C., Marinelli, L., Blottiere, H. H., Larraufie, P., & Lapaque, N. (2021). Short Chain Fatty Acids – mechanisms and functional importance in the gut. *Proceedings of the Nutrition Society*, 80(1), 37–49.
<https://doi.org/10.1017/S0029665120006916>
- Mayer, E. A., & Tillisch, K. (2011). The Brain-Gut Axis in Abdominal Pain Syndromes. *Annual Review of Medicine*, 62. <https://doi.org/10.1146/annurev-med-012309-103958>

- Meng, J., Yu, H., Ma, J., Wang, J., Banerjee, S., Charboneau, R., Barke, R. A., & Roy, S. (2013). Morphine induces bacterial translocation in mice by compromising intestinal barrier function in a TLR-dependent manner. *PloS One*, 8(1), e54040. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0054040>
- Mischel, R. A., Dewey, W. L., & Akbarali, H. I. (2018). Tolerance to Morphine-Induced Inhibition of TTX-R Sodium Channels in Dorsal Root Ganglia Neurons Is Modulated by Gut-Derived Mediators. *IScience*, 2, 193–209. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2018.03.003>
- Mischel, R. A., Muchhala, K. H., Dewey, W. L., & Akbarali, H. I. (2020). The “culture” of pain control: A review of opioid-induced dysbiosis (OID) in antinociceptive tolerance. *The Journal of Pain : Official Journal of the American Pain Society*, 21(7–8), 751–762. <https://doi.org/10.1016/j.jpain.2019.11.015>
- Mogil, J. S. (2009). Animal models of pain: Progress and challenges. *Nature Reviews. Neuroscience*, 10(4), 283–294. <https://doi.org/10.1038/nrn2606>
- Muchhala, K. H., Jacob, J. C., Kang, M., Dewey, W. L., & Akbarali, H. I. (2021). The Guts of the Opioid Crisis. *Physiology (Bethesda, Md.)*, 36(5), 315–323. <https://doi.org/10.1152/physiol.00014.2021>
- Muchhala, K. H., Koseli, E., Gade, A. R., Woods, K., Minai, S., Kang, M., McQuiston, A. R., Dewey, W. L., & Akbarali, H. I. (2022). Chronic Morphine Induces IL-18 in Ileum Myenteric Plexus Neurons Through Mu-opioid Receptor Activation in Cholinergic and VIPergic Neurons. *Journal of Neuroimmune Pharmacology: The Official Journal of the Society on NeuroImmune Pharmacology*. <https://doi.org/10.1007/s11481-021-10050-3>
- Nakanishi, K. (2018). Unique Action of Interleukin-18 on T Cells and Other Immune Cells. *Frontiers in Immunology*, 0. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00763>
- Negus, S. S., Neddenriep, B., Altarifi, A. A., Carroll, F. I., Leidl, M. D., & Miller, L. L. (2015). Effects of Ketoprofen, Morphine, and Kappa Opioids On Pain-Related Depression of Nesting in Mice. *Pain*, 156(6), 1153–1160. <https://doi.org/10.1097/j.pain.0000000000000171>
- Nishida, A., Inoue, R., Inatomi, O., Bamba, S., Naito, Y., & Andoh, A. (2018). Gut microbiota in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Clinical Journal of Gastroenterology*, 11(1), 1–10. <https://doi.org/10.1007/s12328-017-0813-5>
- Noonan, S., Zaveri, M., Macaninch, E., & Martyn, K. (2020). Food & mood: A review of supplementary prebiotic and probiotic interventions in the treatment of anxiety and depression in adults. *BMJ Nutrition, Prevention & Health*, 3(2), 351–362. <https://doi.org/10.1136/bmjnp-2019-000053>

- Nowarski, R., Jackson, R., Gagliani, N., de Zoete, M. R., Palm, N. W., Bailis, W., Low, J. S., Harman, C. C. D., Graham, M., Elinav, E., & Flavell, R. A. (2015). Epithelial IL-18 Equilibrium Controls Barrier Function in Colitis. *Cell*, 163(6), 1444–1456. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.10.072>
- Okamura, H., Tsutsi, H., Komatsu, T., Yutsudo, M., Hakura, A., Tanimoto, T., Torigoe, K., Okura, T., Nukada, Y., & Hattori, K. (1995). Cloning of a new cytokine that induces IFN-gamma production by T cells. *Nature*, 378(6552), 88–91. <https://doi.org/10.1038/378088a0>
- Ostaff, M. J., Stange, E. F., & Wehkamp, J. (2013). Antimicrobial peptides and gut microbiota in homeostasis and pathology. *EMBO Molecular Medicine*, 5(10), 1465–1483. <https://doi.org/10.1002/emmm.201201773>
- Pappagallo, M. (2001). Incidence, Prevalence, and Management of Opioid Bowel Dysfunction. *The American Journal of Surgery*, 182(5), S11–S18. [https://doi.org/10.1016/S0002-9610\(01\)00782-6](https://doi.org/10.1016/S0002-9610(01)00782-6)
- Peterson, D. A., Frank, D. N., Pace, N. R., & Gordon, J. I. (2008). Metagenomic Approaches for Defining the Pathogenesis of Inflammatory Bowel Diseases. *Cell Host & Microbe*, 3(6), 417–427. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2008.05.001>
- Pilat, D., Piotrowska, A., Rojewska, E., Jurga, A., Ślusarczyk, J., Makuch, W., Basta-Kaim, A., Przewlocka, B., & Mika, J. (2016). Blockade of IL-18 signaling diminished neuropathic pain and enhanced the efficacy of morphine and buprenorphine. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 71, 114–124. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2015.12.013>
- Prossin, A. R., Koch, A. E., Campbell, P. L., McInnis, M. G., Zalcman, S. S., & Zubietta, J.-K. (2011). Association of Plasma Interleukin-18 Levels with Emotion Regulation and μ -Opioid Neurotransmitter Function in Major Depression and Healthy Volunteers. *Biological Psychiatry*, 69(8), 808–812. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2010.10.014>
- Ramabadran, K., & Bansinath, M. (1986). A critical analysis of the experimental evaluation of nociceptive reactions in animals. *Pharmaceutical Research*, 3(5), 263–270. <https://doi.org/10.1023/A:1016355200944>
- Ramabadran, K., Bansinath, M., Turndorf, H., & Puig, M. M. (1989). Tail immersion test for the evaluation of a nociceptive reaction in mice: Methodological considerations. *Journal of Pharmacological Methods*, 21(1), 21–31. [https://doi.org/10.1016/0160-5402\(89\)90019-3](https://doi.org/10.1016/0160-5402(89)90019-3)
- Rampelli, S., Schnorr, S. L., Consolandi, C., Turrone, S., Severgnini, M., Peano, C., Brigidi, P., Crittenden, A. N., Henry, A. G., & Candela, M. (2015). Metagenome

- Sequencing of the Hadza Hunter-Gatherer Gut Microbiota. *Current Biology: CB*, 25(13), 1682–1693. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2015.04.055>
- Raupach, B., Peuschel, S.-K., Monack, D. M., & Zychlinsky, A. (2006). Caspase-1-Mediated Activation of Interleukin-1 β (IL-1 β) and IL-18 Contributes to Innate Immune Defenses against *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Infection. *Infection and Immunity*, 74(8), 4922–4926. <https://doi.org/10.1128/IAI.00417-06>
- Rausch, T., & Jansen, T., (2012). *Gastrointestinal Side Effects of Opioid Analgesics*. <https://www.uspharmacist.com/article/gastrointestinal-side-effects-of-opioid-analgesics>
- Ross, G. R., Gabra, B. H., Dewey, W. L., & Akbarali, H. I. (2008). Morphine tolerance in the mouse ileum and colon. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 327(2), 561–572. <https://doi.org/10.1124/jpet.108.143438>
- Roy, S., & Trinchieri, G. (2017). Microbiota: A key orchestrator of cancer therapy. *Nature Reviews. Cancer*, 17(5), 271–285. <https://doi.org/10.1038/nrc.2017.13>
- Roy, S., Ninkovic, J., Banerjee, S., Charboneau, R. G., Das, S., Dutta, R., Kirchner, V. A., Koodie, L., Ma, J., Meng, J., & Barke, R. A. (2011). Opioid drug abuse and modulation of immune function: Consequences in the susceptibility to opportunistic infections. *Journal of Neuroimmune Pharmacology: The Official Journal of the Society on NeuroImmune Pharmacology*, 6(4), 442–465. <https://doi.org/10.1007/s11481-011-9292-5>
- Ruest, L.-B., Dager, M., Yanagisawa, H., Charité, J., Hammer, R. E., Olson, E. N., Yanagisawa, M., & Clouthier, D. E. (2003). Dhand-cre transgenic mice reveal specific potential functions of dHAND during craniofacial development. *Developmental Biology*, 257(2), 263–277. [https://doi.org/10.1016/S0012-1606\(03\)00068-X](https://doi.org/10.1016/S0012-1606(03)00068-X)
- Sağlıklı Yaşam ve Bağımlılıkla Mücadele Çalışma Grubu Raporu. 2018. "Bağımlılıkla Mücadele Alt Çalışma Grubu Raporu (11. Kalkınma Raporu)". Ankara.
- Scriven, M., Dinan, T. G., Cryan, J. F., & Wall, M. (2018). Neuropsychiatric Disorders: Influence of Gut Microbe to Brain Signalling. *Diseases*, 6(3). <https://doi.org/10.3390/diseases6030078>
- Sharma, U., Olson, R. K., Erhart, F. N., Zhang, L., Meng, J., Segura, B., Banerjee, S., Sharma, M., Saluja, A. K., Ramakrishnan, S., Abreu, M. T., & Roy, S. (2020). Prescription Opioids induce Gut Dysbiosis and Exacerbate Colitis in a Murine Model of Inflammatory Bowel Disease. *Journal of Crohn's & Colitis*, 14(6), 801–817. <https://doi.org/10.1093/ecco-jcc/jjz188>

- Sharon, G., Sampson, T. R., Geschwind, D. H., & Mazmanian, S. K. (2016). The Central Nervous System and the Gut Microbiome. *Cell*, 167(4), 915–932. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.10.027>
- Silva, Y. P., Bernardi, A., & Frozza, R. L. (2020). The Role of Short-Chain Fatty Acids From Gut Microbiota in Gut-Brain Communication. *Frontiers in Endocrinology*, 11, 25. Hemo
- Smith, T. H., Ngwainmbi, J., Grider, J. R., Dewey, W. L., & Akbarali, H. I. (2013). An in-vitro preparation of isolated enteric neurons and glia from the myenteric plexus of the adult mouse. *Journal of Visualized Experiments: JoVE*, 78. <https://doi.org/10.3791/50688>
- Sokol, H., Pigneur, B., Watterlot, L., Lakhdari, O., Bermúdez-Humarán, L. G., Gratadoux, J.-J., Blugeon, S., Bridonneau, C., Furet, J.-P., Corthier, G., Grange, C., Vasquez, N., Pochart, P., Trugnan, G., Thomas, G., Blottière, H. M., Doré, J., Marteau, P., Seksik, P., & Langella, P. (2008). *Faecalibacterium prausnitzii* Is an Anti-Inflammatory Commensal Bacterium Identified by Gut Microbiota Analysis of Crohn Disease Patient. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(43), 16731–16736.
- Springer. (2008). Latin Square. In *The Concise Encyclopedia of Statistics* (pp. 297–297). Springer. https://doi.org/10.1007/978-0-387-32833-1_222
- Stilling, R. M., van de Wouw, M., Clarke, G., Stanton, C., Dinan, T. G., & Cryan, J. F. (2016). The neuropharmacology of butyrate: The bread and butter of the microbiota-gut-brain axis? *Neurochemistry International*, 99, 110–132. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2016.06.011>
- Sudo, N., Chida, Y., Aiba, Y., Sonoda, J., Oyama, N., Yu, X.-N., Kubo, C., & Koga, Y. (2004). Postnatal microbial colonization programs the hypothalamic–pituitary–adrenal system for stress response in mice. *The Journal of Physiology*, 558(Pt 1), 263–275. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2004.063388>
- Sudo, N., Sawamura, S., Tanaka, K., Aiba, Y., Kubo, C., & Koga, Y. (1997). The requirement of intestinal bacterial flora for the development of an IgE production system fully susceptible to oral tolerance induction. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 159(4), 1739–1745.
- Swegle, J. M., & Logemann, C. D. (2006). Management of Common Opioid-Induced Adverse Effects. *American Family Physician*, 74(8), 1347–1354.
- Tappe-Theodor, A., & Kuner, R. (2014). Studying ongoing and spontaneous pain in rodents—Challenges and opportunities. *The European Journal of Neuroscience*, 39(11), 1881–1890. <https://doi.org/10.1111/ejn.12643>

- Tan, J., McKenzie, C., Potamitis, M., Thorburn, A. N., Mackay, C. R., & Macia, L. (2014). Chapter Three—The Role of Short-Chain Fatty Acids in Health and Disease. In F. W. Alt (Ed.), *Advances in Immunology* (Vol. 121, pp. 91–119). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800100-4.00003-9>
- Tannock, G. W. 1999. "The normal microflora: an introduction". Medical Importance of the Normal Microflora. Editör: Tannock, G. W. Boston: Springer US.
- Targownik, L. E., Nugent, Z., Singh, H., Bugden, S., & Bernstein, C. N. (2014). The prevalence and predictors of opioid use in inflammatory bowel disease: A population-based analysis. *The American Journal of Gastroenterology*, 109(10), 1613–1620. <https://doi.org/10.1038/ajg.2014.230>
- Tsutsui, H., Kayagaki, N., Kuida, K., Nakano, H., Hayashi, N., Takeda, K., Matsui, K., Kashiwamura, S., Hada, T., Akira, S., Yagita, H., Okamura, H., & Nakanishi, K. (1999). Caspase-1-independent, Fas/Fas ligand-mediated IL-18 secretion from macrophages causes acute liver injury in mice. *Immunity*, 11(3), 359–367. [https://doi.org/10.1016/s1074-7613\(00\)80111-9](https://doi.org/10.1016/s1074-7613(00)80111-9)
- Türkiye Bilimler Akademisi (TÜBA). 2017. Mikrobiyota ve İnsan Sağlığı Sempozyumu (10 nisan 2017) Raporu (24. Rapor). Ankara: Ses Reklam Matbaacılık.
- Türkiye Uyuşturucu Raporu (2021). Ankara: EGM Yayın
- Udden, S. M. N., Waliullah, S., Harris, M., & Zaki, H. (2017). The Ex Vivo Colon Organ Culture and Its Use in Antimicrobial Host Defense Studies. *Journal of Visualized Experiments*, 120, 55347. <https://doi.org/10.3791/55347>
- Vancamelbeke, M., & Vermeire, S. (2017). The intestinal barrier: A fundamental role in health and disease. *Expert Review of Gastroenterology & Hepatology*, 11(9), 821–834. <https://doi.org/10.1080/17474124.2017.1343143>
- Wang, F., Meng, J., Zhang, L., Johnson, T., Chen, C., & Roy, S. (2018). Morphine induces changes in the gut microbiome and metabolome in a morphine dependence model. *Scientific Reports*, 8(1), 3596. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-21915-8>
- Wildenberg, M. E., & van den Brink, G. R. (2012). A major advance in ex vivo intestinal organ culture. *Gut*, 61(7), 961–962. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2012-302021>
- Williams, M. A., O’Callaghan, A., & Corr, S. C. (2019). IL-33 and IL-18 in Inflammatory Bowel Disease Etiology and Microbial Interactions. *Frontiers in Immunology*, 10, 1091. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01091>

Yatsunenko, T., Rey, F. E., Manary, M. J., Trehan, I., Dominguez-Bello, M. G., Contreras, M., Magris, M., Hidalgo, G., Baldassano, R. N., Anokhin, A. P., Heath, A. C., Warner, B., Reeder, J., Kuczynski, J., Caporaso, J. G., Lozupone, C. A., Lauber, C., Clemente, J. C., Knights, D., ... Gordon, J. I. (2012). Human gut microbiome viewed across age and geography. *Nature*, 486(7402), 222–227. <https://doi.org/10.1038/nature11053>



7. SİMGELER VE KISALTMALAR

CA	California
CaCl ₂	Kalsiyum klorür
CDC	Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezi
cm	Cantimetre
CM	Durum Ortamı/ Condition Media
CO ₂	Karbondioksit
DNA	Deoxyribonucleic acid
DNase I	Deoxyribonuclease I
DMEM/F12	Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12
DOR	Delta opioid reseptörü
DRG	Dorsal root ganglia
EMCDDA	Avrupa İlaç ve İlaç Bağımlılığı Gözlem Merkezi
<i>E. Coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
F. prausnitzii	Faecalibacterium prausnitzii
FBS	Fetal bovine serum
FIT-C	Fluorescein isothiocyanate
FFAR2	Free fatty acid receptor2/ Serbest yağ asidi reseptörü 2
FFAR3	Free fatty acid receptor3/ Serbest yağ asidi reseptörü 3
g	Gram
GAPDH	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
GBA	Bağırsak-Beyin Aksı
GI	Gastrointestinal
GIS	Gastrointestinal Sistem
GPCR	G-protein aracılı reseptör
GPR109a	Hidrokarboksilik asit reseptörü
GPR164	G-protein aracılı reseptör
H+	Hidrojen iyonu
HCAR2	Hidrokarboksilik asit reseptörü
HPA	Hipotalamik Hipofiz Eksen
IBD	İnflamatuvar Bağırsak Hastalığı
IFN-γ	İnterferon gamma
IL	İnterlökin
IL-18R1	İnterlökin 18 reseptörü
IASP	International Association for the Study of pain
i.p	intaperitoneal
iTaq	PCR mixture solüsyonu

K	Kappa opioid reseptörü
kg	Kilogram
KOR	Kappa opioid reseptörü
KCl	Potasyum klorür
LMMP	Longitudinal Muscle Myenteric Plexus/ Uzunlamasına kas myenterik pleksusunda
m ²	Metrekare
MA	Massachusetts
MCT	Monokarboksilat taşıyıcıları
Mg	Magnezyum
mg	Milligram
MgSO ₄ ,	Magnesium sulfate
MI	Michigan
ml	mililitre
Mmol	Milimolar
MO	Missouri
MOR	Mü-opioid reseptörü
MP	Morfin pelet
MPE	Maximum Potensial Effect
MSS	Merkezi Sinir Sistemi
n	Denek sayısı
N	Denek sayısı
NaCl	Sodyum klorür
NaHCO ₃	Sodium bicarbonate
NaH ₂ PO ₄	Monosodium phosphate
NJ	New Jersey
NLX	Nalokson
nmol	Nanomol
O ₂	Oksijen
OID	Opioid induced Dysbiosis
<i>P. acnes</i>	<i>Propionibacterium acnes</i>
PAG	Periaqueductal gray; Periaqueductal gri
PBS	Fosfat Tamponlu Tuz Çözeltisi
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
Ph	Potential of hydrogen
PP	Plasebo pelet
pro-IL-18	Aktif olmayan bir halde IL-18
qRT-PCR	Nicel gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu
Reg3	Regenerating islet-derived protein
RNA	Ribonucleic acid
Rnase	Ribonuclease
RT	Reverse transkriptaz
s	saniye

s.c.	subcutan
SAL	Serum fizyolojik
SCFAs	Kısa zincirli yağ asitleri
SEM	Standard error of mean
SMCT	Sodyum bağımlı monokarboksilat taşıyıcılar
SYBR	Moleküler biyolojide nükleik asit boyası olarak kullanılan asimetric bir siyanin boyası
SW	Swiss Webster
Th1	Tip 1 T yardımcı hücresi
TJs	Tight junctions
Treg	T hücre regülatörü
TRIzol	RNA izolasyon solüsyonu
TÜBA	Türkiye Bilimler Akademisi
VAN	Vankomisin
μ	Mü-opioid reseptörü
μ l	Mikrolitre
μ M	mikromol
Δ	Delta opioid reseptörü
β	Beta
β -ARR2	Beta arrestin2
$^{\circ}$ C	Celcius
Ct	Threshold cycle
3R	Deney hayvanları refahındaki 3R kuralı (Reduction/ Replacement/ Refinement).

8. TEŞEKKÜR

Öncelikle doktora çalışmalarım boyunca öngörülerini ve deneyimleri ile yol gösteren danışman hocam Prof. Dr. Cenk Aydın'a saygı ve teşekkürlerimi sunarım. Doktora öncesi ve süresince hiç bir zaman desteklerini esirgemeyen Doç. Dr. Nilay Seyidoğlu'na ve değerli komite üyelerim Prof. Dr. Fahrünisa Cengiz, Prof. Dr. Recep Çıbık ve Prof. Dr. Murat YALÇIN'a; aynı danışmanı paylaştığımız Rovshan Gurbanlı'ya; Bursa Uludağ Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Fizyoloji Anabilim Dalı çalışanlarına teşekkürü borç bilirim.

TÜBİTAK 2214-A Doktora Sırası Yurt Dışı Araştırma Bursu kapsamında Amerika Birleşik Devletleri, Virginia Commonwealth Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalında bulunan laboratuvarını bana açan, tezimi laboratuvarında tamamlamama izin veren ve bu süreçte yol göstericim olan Amerikan danışmanın Prof. Dr. Hamid Akbarali'ye; bu süreçte bana bildiğim tüm teknikleri öğreten Dr. Minho Kang'a; deneylerimde yardımcı olan Kareem Woods ve Suha Minai' ye ve diğer lab üyeleri Dr. Karan Muchhala, Stanley Cheatham, Donald Jessup ve David Stevens'a teşekkürü borç bilirim.

Virginia Commonwealth Üniversitesi'ne gitmeden önce bana kapılarını açan başta Prof. Dr. Ferah BUDAK olmak üzere, Bursa Uludağ Üniversitesi, Tıp Fakültesi, İmmünoloji Anabilim Dalı çalışanlarına teşekkürü borç bilirim.

Bir dönem ERASMUS öğrenim hareketliliği ile Macaristan, Budapeşte de bulunduğum Eötvös Loránd Üniversitesi, Etoloji Anabilim Dalına, en başta beni bölümlerine kabul ettikleri için Prof. Dr. Ádám Miklósi, Macar danışmanım Dr. Enikő Kubinyi ve Dr. Borbála Turcsán'a ya ve tüm etoloji departmanına teşekkürü borç bilirim.

Lisans eğitimimin başından bu yana profesyonel hayatımın her basamağına şahitlik eden, her derdimi dinleyen ve destek olan başta Emre Koçel, Canel Ocakdan, Elif İnci, Marife Polatkan, Uğur Yokuş, Gül Tunadurur ve Nergis Mutlu Keleş'e; Amerika da yapmış olduğum değişimi mümkün kılan Erica Golden başta olmak üzere, proje yazımında çeviri kısımlarında destek olan İpek Cihan'a, Amerika da geçirdiğim iki yıl içerisinde sahip olduğum tüm güzel şeyler ile tanışmama/ karşılaşmama neden olan Esad Ülker, Katherine Contreras, Martial Caillaud, Jayden Elmer, Dr. Imad Damaj'a ve laboratuvar üyelerine teşekkürü borç bilirim.

Doktora eğitimimin en karanlık döneminde farkındalığımı arttıran, hayata bakış açımın değişmesini sağlayan Klinik Psikolog Enise Öziç'e minnettarlığımı sunarım.

Son olarak hayatımın her döneminde desteklerini hiçbir zaman üzerinden eksik etmeyen, gelişimime yardımcı olan, bugünlere gelmemde büyük emekleri olan anne ve babam Vildan-Ali Köşeli'ye; ablam-eniştem Elif-Onur Seksenlik ve yeğenim Eylül Seksenlik'e minnettarlığımı sunarım.

Bu doktora tezi YÖK 100-2000 Öncelikli Alanlar Doktora Bursu (Moleküler Farmakoloji ve İlaç Araştırmaları), TÜBİTAK 2211-C Öncelikli Alanlar (İlaç Araştırmaları- 2019/2) ve TÜBİTAK 2214-A Doktora Sırası Yurt Dışı Araştırma Bursu (2019/1) tarafından desteklenmiştir.

10. ÖZGEÇMİŞ

Lise eğitimini Halit Armay Anadolu Lisesi'nde tamamlamıştır. 2009 yılında, Bursa Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesinde başladığı lisans eğitimini 2014 yılında tamamlamıştır. Lisans eğitimi süresince ERASMUS öğrenim hareketliliği ile bir dönem University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno-Çekya da okumuş, yaz stajını ise ERASMUS staj hareketliliği ile gittiği Alma Mater Studiorum-Universita di Bologna, Bologna- İtalya da yapmıştır.

Lisans eğitiminin ardından kısa bir süreliğine Türkiye ve Amerikada vahşi yaşamın korunması ve vahşi hayvanların rehabilitasyonu ile ilgili projelerde gönüllü olarak çalışmıştır. 2015-2017 yılları arasında İstanbul'da özel bir klinikte Veteriner Hekim olarak çalışmıştır. 2016 yılında Bursa Uludağ Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Veteriner Fizyoloji Anabilim Dalı'nda doktora eğitimine başlamıştır. Doktora eğitimi süresince ERASMUS öğrenim hareketliliği ile bir dönem Eötvös Lorand (ELTE) Üniversitesi, Etoloji departmanında bulunmuştur. Doktora eğitimi süresince yurt içi YÖK 100-2000 Öncelikli Alanlar Doktora Bursu (Moleküler Farmakoloji ve İlaç Araştırmaları/ 2017-2021), TÜBİTAK 2211-C Öncelikli Alanlar (İlaç Araştırmaları/ 2019-2022) ve TÜBİTAK 2214-A Doktora Sırası Yurt Dışı Araştırma Bursu (2020-2022) alarak doktora çalışmalarını Virginia Commonwealth Üniversitesi, Amerika Birleşik Devletleri, Virginia da tamamlamıştır.