



**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ-CERRAHPAŞA
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ**



DOKTORA TEZİ

**DEPRESYON MODELİ OLUŞTURULAN SIÇANLARDA ALAMANDİNİN
KOGNİTİF FONKSİYONLARA VE NÖROİNFLAMASYONA ETKİSİ**

AYSU KILIÇ

**DANIŞMAN
Prof. Dr. NURAN DARIYERLİ**

Fizyoloji Anabilim Dalı

Fizyoloji, Doktora Programı

Şubat, 2024

TEZ KABUL VE ONAYI

Aysu KILIÇ tarafından, **Prof. Dr. Nuran DARIYERLİ** danışmanlığında hazırlanan " **Depresyon Modeli Oluşturulan Sıçanlarda Alamandinin Kognitif Fonksiyonlara ve Nöroinflamasyona Etkisi** " başlıklı bu çalışma, jürimiz tarafından **20/02/2024** tarihinde yapılan sınav sonucunda **oy birliği** ile başarılı bulunarak **Doktora Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi

	İmza	Sonuç
DANIŞMAN	Prof. Dr. Nuran DARIYERLİ	☒
	İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa	Kabul
	Fizyoloji Anabilim Dalı	☐ Ret
ÜYE	Prof. Dr. Nermin YELMEN	☒
	İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa	Kabul
	Fizyoloji Anabilim Dalı	☐ Ret
ÜYE	Prof. Dr. Semra ÖZDEMİR	☒
	İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa	Kabul
	Biyofizik Anabilim Dalı	☐ Ret
ÜYE	Prof. Dr. Emine Gülderen ŞAHİN	☒
	İstanbul Aydın Üniversitesi	Kabul
	Fizyoloji Anabilim Dalı	☐ Ret
ÜYE	Prof. Dr. Gökhan METİN	☒
	İstanbul Üniversitesi	Kabul
	Spor Hekimliği Anabilim Dalı	☐ Ret

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün aşamalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve bilimsel etik kuralları içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını ve her türlü hukuki sorumluluğu aldığımı kabul ederim.

Aysu KILIÇ



Aileme ve rahmetli dedem Müfit VAROL’a ithaf ediyorum...

BÜTÇE DESTEKLERİ

DEPRESYON MODELİ OLUŞTURULAN SIÇANLARDA ALAMANDİNİN KOGNİTİF FONKSİYONLARA VE NÖROİNFLAMASYONA ETKİSİ

Bu tez çalışması, Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu'nun (TÜBİTAK)

222S775 numaralı 1002-A projesi ile desteklenmiştir.

TEŞEKKÜR

Doktora eğitim sürecimin her adımında sevgisini, ilgisini ve desteğini benden esirgemeyen sayın danışman hocam Prof. Dr. Nuran DARIYERLİ'ye,

Ders dönemimde bilgi ve deneyimleriyle yol gösteren değerli hocalarım; anabilim dalı başkanımız Prof. Dr. Gönül ŞİMŞEK'e, Prof. Dr. Nermin YELMEN'e, Prof. Dr. Gülderen ŞAHİN'e, Prof. Dr. Hakkı Oktay SEYMEN'e, Prof. Dr. Sibel AKYOL'a ve Dr. Öğr. Üyesi Muhittin Onur YAMAN'a,

Tez sürecimin her anında bana destek olan hocalarım Doç. Dr. Fatmahan ATALAR'a, Doç. Dr. Savaş ÜSTÜNOVA'ya, Doç. Dr. Huri DEDEAKAYOĞULLARI'na, Doç. Dr. Birsan ELİBOL'a ve Doç. Dr. Aslı KANDİL'e,

Doktora eğitim sürecimde birlikte ders aldığımız sayın hocam Prof. Dr. Kerem ERKALP'e ve yanımda olan asistan ve uzman arkadaşlara,

Deneysel çalışmalarım esnasında yanımda olan ve manevi desteğini esirgemeyen arkadaşlarım Arş. Gör. Betül Esra İPEK'e, Arş. Gör. Yasin Ali ÇİMEN'e, İdari Uzm. Mert YILMAZ'a, Suzin TATONYAN'a, Arş. Gör. Seda SÜSGÜN'e, Arş. Gör. Hande İpek YETKE'ye, Öğr. Gör. Beyza MENDEŞ'e ve Arş. Gör. Özlem TOLUK'a,

Hayatımın her anında beni destekleyen sevgili aileme ve kardeşim Kübra KILIÇ'a

Teşekkür ederim.

Bezmialem Vakıf Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı'nda görev yaptığım süre boyunca bölüm başkanlığı yapmış ve beni her aşamada desteklemiş olan merhum hocam Prof. Dr. İsmail MERAL'e sonsuz saygılarımı sunuyorum ve rahmetle anıyorum.

Şubat 2024

Aysu KILIÇ

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

TEZ KABUL VE ONAYI.....	ii
BEYAN	iii
BÜTÇE DESTEKLERİ	v
TEŞEKKÜR.....	vi
İÇİNDEKİLER.....	vii
ŞEKİL LİSTESİ	x
TABLO LİSTESİ.....	xiii
SİMGE VE KISATLMA LİSTESİ	xiv
ÖZET	xvii
ABSTRACT	xix
1. GİRİŞ.....	1
2. KAVRAMSAL ÇERÇEVE	3
2.1. DEPRESYON	3
2.2. DEPRESYONUN EPİDEMİYOLOJİSİ	3
2.3. DEPRESYONUN PATOFİZYOLOJİSİ	4
2.3.1. Biyolojik Nedenler	4
2.3.2. Çevresel Stres Faktörleri	4
2.3.3. Genetik Faktörler.....	4
2.3.4. Monoamin Hipotezi ve Diğer Nörotransmitterler	4
2.3.5. Endokrin faktörler	9
2.3.6. İmmünolojik Faktörler: Sitokinlerin rolü	10
2.3.7. Nöroinflamasyon.....	11
2.3.8. Oksidatif Stres Hipotezi	13
2.3.9. Nöroplastisite	14
2.4. HİPOKAMPUS	16
2.4.1. ÖĞRENME VE BELLEK MEKANİZMASI	18
2.4.2. Depresyon, Hipokampus ve Prefrontal Korteks İlişkisi.....	24
2.5. DENEYSEL DEPRESYON MODELLERİ	25
2.5.1. Deney Hayvanlarında Depresyon Doğrulama Testleri	25
2.5.2. Kronik Öngörülemez Hafif Stres Modeli.....	26
2.6. RENİN-ANJİYOTENSİN SİSTEMİ.....	27

2.6.1. Anjiyotensin Tip 1 Reseptörü	28
2.6.2. Anjiyotensin Tip 2 Reseptörü	29
2.6.3. Alternatif Renin Anjiyotensin Sistemi	29
2.6.4. ACE2/Anjiyotensin-(1-7) /MasR Ekseni	31
2.6.5. Anjiyotensin A/Alamandin/MrgD Ekseni.....	32
2.6.6. Alamandin	33
2.6.7. Mas ile İlişkili G-Proteinine Bağlı D Tip Reseptör.....	34
3. YÖNTEM	36
3.1. DENEY HAYVANLARI	36
3.2. DENEYDE KULLANILAN KİMYASALLAR	36
3.3. DENEY GRUPLARI.....	36
3.4. DEPRESYON MODELİNİN OLUŞTURULMASI	38
3.4.1. Kronik Öngörülemez Hafif Stres Modeli.....	38
3.5. DAVRANIŞ TESTLERİ	40
3.5.1. Sükroz Tercih Testi	40
3.5.2. Açık Alan Testi	41
3.5.3. Yükseltilmiş Artı Labirent Testi	42
3.5.4. Zorunlu Yüzme Testi	42
3.5.5. Kuyruktan Asma Testi	43
3.5.6. Morris Su Labirenti Testi	44
3.6. BİYOKİMYASAL ÇALIŞMALAR.....	45
3.6.1. Total Protein Tayini	46
3.6.2. ELISA Protokolü.....	47
3.7. GEN EKSPRESYON ANALİZLERİ.....	49
3.7.1. Doku Homojenizasyonu	49
3.7.2. Total RNA İzolasyonu	49
3.7.3. Total RNA Miktarı ve Saflığının Belirlenmesi	50
3.7.4. cDNA Sentezi.....	50
3.7.5. Kantitatif Eş Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu	52
3.8. İSTATİSTİKSEL ANALİZLER	56
4. BULGULAR	57
4.1. AĞIRLIK BULGULARI	57
4.2. DAVRANIŞ TESTLERİ BULGULARI	57
4.2.1. SÜKROZ TERCİH TESTİ BULGULARI	57

4.2.2. AÇIK ALAN TESTİ BULGULARI.....	59
4.2.3. YÜKSELTİLMİŞ ARTI LABİRENT TESTİ BULGULARI.....	61
4.2.4. ZORUNLU YÜZME TESTİ BULGULARI.....	64
4.2.5. KUYRUKTAN ASMA TESTİ BULGULARI.....	65
4.2.6. MORRİS SU LABİRENTİ TESTİ BULGULARI	65
4.2.7. HİPOKAMPUS DOKUSU ELISA BULGULARI.....	68
4.2.8. PREFRONTAL KORTEKS DOKUSU ELISA BULGULARI	70
4.2.9. SERUM ELISA BULGULARI.....	71
4.3. GEN EKSPRESYON ANALİZLERİ.....	73
4.3.1. NMDAR2A ve GABAAR α 1 Ekspresyon Düzeyi	73
4.3.2. AGT, ACE2 ve MrgD Ekspresyon Düzeyi.....	73
5. TARTIŞMA.....	75
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	88
7. KAYNAKLAR.....	89
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI	104
ETİK KURUL İZİN YAZISI	105
KURUM İZNİ YAZILARI.....	106
ÖZGEÇMİŞ.....	107

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

Şekil 2-2-1: Stres, beyin ve inflamatuvar sitokinler arasındaki bağlantılar. HPA, hipotalamik-hipofiz-adrenal eksen; SSS, sempatik sinir sistemi [80].	12
Şekil 2-2-2: Kronik öngörülemez hafif stres (KÖHS), oksidatif stres ve inflamasyon ilişkisi [86].	13
Şekil 2-2-3: Sinaptik plastisitenin düzenlenmesinde BDNF etkisi ve stres maruziyeti sonrasında sinaptik diken oluşumunda azalma [92].	15
Şekil 2-2-4: Hipokampusun anatomisi [94].	17
Şekil 2-2-5: Hipokampusun anatomisi [97].	17
Şekil 2-2-6: Polarite proteinleri: Dendritik dikenlerin yapısı [102].	19
Şekil 2-2-7: LTP'nin morfojenik etkileri. Dendritik dikenler aktiviteye bağlı bir şekilde filizlenir ve morfolojilerini değiştirir [103].	19
Şekil 2-2-8: Düşük frekanslı iletim sırasında glutamat, NMDA, AMPA ve metabotropik reseptörlerle etkileşime girer [94].	21
Şekil 2-2-9: Sinaptik plastisite [99].	21
Şekil 2-2-10: Yüksek frekanslı uyarım ile LTP oluşumu [94].	22
Şekil 2-2-11: Geç LTP oluşumu için protein sentezinde değişiklikler ve yeni sinaptik bağlantıların oluşumu da gereklidir [94].	23
Şekil 2-2-12: Renin-Anjiyotensin Sistemi [122].	29
Şekil 2-2-13: Klasik ve Alternatif RAS Eksenleri [124].	30
Şekil 2-2-14: Renin-Anjiyotensin Sistemi [134].	32
Şekil 2-2-15: Anjiyotensin A/Alamandin/MrgD Ekseni [135].	33
Şekil 2-2-16: Anjiyotensin A/Alamandin/MrgD Ekseni: Anjiyotensin sistem reseptörleri ve etkileri [135].	35
Şekil 3-1 Deney Protokolü KÖHS: Kronik Öngörülemez Hafif Stres; STT: Sükroz Tercih Testi; AAT: Açık Alan Testi; Yükseltilmiş Artı Labirent Testi; ZYT: Zorunlu Yüzme Testi; KAT: Kuyruktan Asma Testi; MWM: Morris Su Labirenti Testi.	37

Şekil 3-2: KÖHS Modeli	39
Şekil 3-3: Sükroz Tercih Testi.....	40
Şekil 3-4: Açık Alan Testi	41
Şekil 3-5: Yükseltilmiş Artı Labirent Testi	42
Şekil 3-6: Zorunlu Yüzme Testi	43
Şekil 3-7: Kuyruktan Asma Testi	44
Şekil 3-8: Morris Su Labirenti Testi.....	45
Şekil 3-9:ELISA Test Kiti ve Reaksiyon Oluşumu.....	48
Şekil 3-10:Total RNA Miktarının Belirlenmesi	50
Şekil 3-11: Döngü Cihazı	52
Şekil 4-1:Kontrol (K), Depresyon (D), Depresyon+alamandin (D+ALA), Depresyon+A779 (D+A779), Depresyon+alamandin+A779 (D+ALA+A779) gruplarının haftalara göre vücut ağırlıklarındaki değişim.	57
Şekil 4-2: Deney gruplarının 13. Gün (A), 36. Gün 1 saatlik (B) ve 36. gün 24 saatlik (C) sükroz tercih değerlerinin yüzde değişimi.	58
Şekil 4-3: Deney gruplarının açık alan testinde toplam katettikleri mesafe (A), orta alanda geçirdikleri süre (B) ve orta alandan geçme sıklıkları (C).	59
Şekil 4-4: Deney gruplarının açık alan testinde katettikleri toplam mesafenin iz haritası.	60
Şekil 4-5: Deney gruplarının açık alan testinde harekete başlama latansları (A), şaşlanma sayıları (B), temizlenme sayıları (C) ve temizlenme süreleri (D).	61
Şekil 4-6: Deney gruplarının yükseltilmiş artı labirent testinde platformun açık kolunda (A), kapalı kolunda (B), orta alanda (C) geçirdikleri sürenin ve açık kola geçme sıklıklarının (D) yüzde değişimi.	62
Şekil 4-7: Deney gruplarının yükseltilmiş artı labirent testinin açık ve kapalı kollarında geçirdikleri toplam mesafenin iz haritası.....	63
Şekil 4-8: Deney gruplarının zorunlu yüzme testindeki hareketsizlik latansı (A) ile toplam hareketsiz kalma süreleri (B).	64
Şekil 4-9: Deney gruplarının kuyruktan asma testinde toplam hareketsiz kaldıkları süre **p<0.01, ***p<0.001, kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlılık; ++p<0.01, +++p<0.001, D grubuna göre istatistiksel anlamlılık.	65
Şekil 4-10: Deney gruplarının Morris su labirenti testinin öğrenme periyodundaki platformu bulma süreleri (A), toplam katettikleri mesafe (B) ve yüzme hızları (C).	66

Şekil 4-11: Deney gruplarının Morris su labirenti testinin test periyodunda platform bölgesinde geçirdikleri sürenin tankta toplam geçirdikleri süreye oranının yüzde değişimi (A), deney hayvanlarının platform bölgesine ulaşma latansı (B).	67
Şekil 4-12: Deney gruplarının Morris su labirenti testinin test periyodunda platform bölgesinden geçme sıklığının iz haritası.....	68
Şekil 4-13: Deney gruplarında hipokampus NMDAR2A (A) ve GABAAR α 1 (B) reseptörlerinin rölatif gen ekspresyon seviyeleri.	73
Şekil 4-14: Deney gruplarında hipokampus AGT (A), ACE-2 (B) ve MrgD reseptörünün (C) rölatif gen ekspresyon seviyeleri.	74



TABLO LİSTESİ

Tablo 3-1: KÖHS Modeli ve Uygulama Günleri	39
Tablo 3-2: cDNA reaksiyonu için eklenen bileşenler ve miktarları	51
Tablo 3-3: Deneyde kullanılan primer dizileri	53
Tablo 3-4: PZR karışımına eklenen bileşenler ve miktarları.....	54
Tablo 3-5: PZR'de kullanılan döngü koşulları.....	55
Tablo 4-1: Hipokampus dokusundan elde edilen süpernatantlarda NMDA, GABA, CREB, BDNF, ANG, MrgD, NF- κ B, IL-6, IL-1 β , TNF- α , SOD, MDA ve CAT'ın ortalama $\pm$ standart sapma değerleri (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlılık; +p<0.05, ++p<0.01, +++p<0.001, D grubuna göre istatistiksel anlamlılık; #p<0.05, ##p<0.01, ###p<0.001, D+A779 grubuna göre istatistiksel anlamlılık)	69
Tablo 4-2: Prefrontal korteks dokusundan elde edilen süpernatantlarda NMDA, GABA, CREB, BDNF, ANG, MrgD, NF- κ B, IL-6, IL-1 β , TNF- α , MDA ve CAT $\pm$ standart sapma değerleri (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlılık; +p<0.05, ++p<0.01, +++p<0.001, D grubuna göre istatistiksel anlamlılık; #p<0.05, ##p<0.01, ###p<0.001, D+A779 grubuna göre istatistiksel anlamlılık; £p<0.05, ££p<0.001, D+ALA grubuna göre istatistiksel anlamlılık)	71
Tablo 4-3: Serum epinefrin, kortizol, ANG, IL-6, IL-1 β , TNF- α , SOD, MDA, CAT ve COX-2 $\pm$ standart sapma değerleri (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlılık; +p<0.05, ++p<0.01, +++p<0.001, D grubuna göre istatistiksel anlamlılık; #p<0.05, ##p<0.01, ###p<0.001, D+A779 grubuna göre istatistiksel anlamlılık; £p<0.05, D+ALA grubuna göre istatistiksel anlamlılık).	72

Sayfa No

SİMGE VE KISATLMA LİSTESİ

Kısaltmalar	Açıklama
5HT	: Serotonin (5-hidroksitriptamin)
AGT	: Anjiyotensinojen
ACE	: Anjiyotensin dönüştürücü enzim
ACE2	: Anjiyotensin dönüştürücü enzim 2
Ang I	: Anjiyotensin I
Ang II	: Anjiyotensin II
AMPA	: α -amino-3-hidroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic asit reseptör
ANP	: Atrial natriüretik peptid
ARB	: Anjiyotensin reseptör blokerleri
AT1R	: Anjiyotensin tip 1 reseptörü
AT2R	: Anjiyotensin tip 2 reseptörü
Ang-(1-7)	: Anjiyotensin (1-7)
BDNF	: Beyin kaynaklı nörotrofik faktör
BOS	: Beyin omurilik sıvısı
CA	: Cornu ammonis
CaM kinaz II	: Ca^{2+} /kalmodulin bağımlı protein kinaz II
cAMP	: Siklik adenosin monofosfat
COX-2	: Siklooksijenaz-2
CAT	: Katalaz
CRH	: Kortikotropin salgılatıcı hormon
CREB	: cAMP cevap elemanı bağlayıcı protein
CRP	: C-reaktif protein
DA	: Dopamin
DG	: Dentat girus
EC	: Entorhinal kortkes
eNOS	: Endotelyal nitrik oksit sentaz
EPSP	: Eksitatör post sinaptik potansiyel
GABA	: Gama-amino-bütirik asit

GABA_AR	: GABA _A reseptör
GABA_BR	: GABA _B reseptör
GAPDH	: Gliseraldehit 3-fosfat dehidrogenaz
GH	: Büyüme hormonu
HPA	: Hipotalamus-hipofiz-adrenal
IL-6	: İnterlökin 6
IL-1β	: İnterlökin 1 β
INF	: İnterferon
IP	: İntraperitoneal
JGH	: Jukstaglomerüler hücreler
IP	: İntraperitoneal
LTP	: Uzun süreli güçlenme
LTD	: Uzun süreli baskılama
KÖHS	: Kronik öngörüleemeyen hafif stres
MAPK	: Mitojenle etkinleşen protein kinaz
MDA	: Malondialdehid
MrgD	: Mas ile ilişkili G-proteinine bağlı D tip reseptör
MWM	: Morris su labirenti
mTORC1	: Mammalian target of rapamycin complex 1- Rapamisinin mekanik hedefi
MWM	: Morris su labirenti
NADPH	: Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat
NMDAR	: N-metil-D-aspartat reseptör
NADPH	: Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat
NE	: Norepinefrin
NF-κB	: Nükleer faktör kappa B
PI3K	: Fosfoinositid-3 Kinaz
PKC	: Protein kinaz C
PLC	: Fosfolipaz C
PFK	: Prefrontal korteks
RAS	: Renin-anjiyotensin sistemi
ROT	: Reaktif oksijen türevleri
SSRI'lar	: Serotonin geri alım inhibitörleri
SOD	: Süperoksit dismutaz
TrkB	: Tropomiyozin ile ilişkili reseptör kinaz B

TNF- α : Tümör nekroz faktörü alfa
ROT : Reaktif oksijen türevleri
qRT-PCR-PZR : Kantitatif e zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu



ÖZET

[DOKTORA TEZİ]

[DEPRESYON MODELİ OLUŞTURULAN SIÇANLARDA ALAMANDİNİN KOGNİTİF FONKSİYONLARA VE NÖROİNFLAMASYONA ETKİSİ]

[Aysu KILIÇ]

İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü

Fizyoloji Anabilim Dalı

Fizyoloji, Doktora Programı

[Danışman: Prof. Dr. Nuran DARIYERLİ]

Depresyon dikkat, bellek, psikomotor fonksiyonlar ve yönetici işlevleri içeren bilişsel işlevlerde bozukluklara neden olabilen bir hastalıktır. Yapılan çalışmalar majör depresyonun patofizyolojisinde renin-anjiyotensin sistemin (RAS) de rolü olduğunu düşündürmektedir. Alamandin, RAS'ın koruyucu eksenini ile ilişkilendirilmiş en yeni komponenttir. Çalışmamızın amacı, depresyon ve buna bağlı meydana gelen kognitif fonksiyon bozukluğunun patofizyolojisinde, potansiyel bir tedavi aracı olarak, kognitif fonksiyonlara, nöroinflamasyona ve oksidatif stres üzerine RAS ailesinin yeni bir üyesi olan alamandinin etkilerini incelemektir.

Çalışmada 3 aylık, ağırlıkları 300-350 g arasında değişen 35 adet erkek Sprague dawley cinsi sıçan kullanıldı. Depresyon modeli kronik öngörülemez hafif stres yöntemi ile oluşturuldu. Deney hayvanları kontrol (K), depresyon (D), alamandin (50 µg/kg,i.p.) tedavisi uygulanan grup (D+ALA), A779 (300 µg/kg,i.p.) uygulanan grup (D+A779) ve alamandin ile A779'un birlikte uygulandığı grup (D+ALA+A779) olmak üzere 5 gruba ayrıldı. Çalışmamızda depresyon gelişimi davranış testleri ile doğrulandıktan sonra Morris su labirenti testi ile hayvanların öğrenme-bellek performansları ölçüldü. Deney sonunda hayvanların prefrontal korteks, hipokampus ve kan örnekleri biyokimyasal çalışmalar ve gen ekspresyon analizleri için izole edildi.

Araştırmamızda anksiyete düzeyinin belirlenmesi için yapılan sükroz tercih testi, açık alan testi, yükseltilmiş artı labirent testi, kuyruktan asma ve zorunlu yüzme testlerinde D grubu ile A779 uygulanan grupta belirgin bir şekilde anksiyete gelişimi olduğu, alamandinin ise anksiyolitik etki gösterdiği tespit edildi. Morris su labirent testinde D ve D+A779 gruplarının platform bölgesinde geçirdiği süre anlamlı olarak ($p<0.001$) azalmışken, alamandin uygulanan gruplarda ise kontrol grubuna benzer sonuçlar elde edildi. Davranış testleriyle paralel olarak alamandin; depresyonla azalan hipokampal beyin kaynaklı nörotrofik faktör (BDNF), N-metil-D-aspartat (NMDA) reseptörü, cAMP cevap elemanı bağlayıcı protein (CREB) gibi öğrenme belirteçlerinde anlamlı bir artışa sebep oldu. Bunlara ek olarak hem doku hem de serumda depresyon gelişimiyle paralel olarak artan inflamatuvar belirteçler olan tümör nekroz faktörü alfa ($\text{TNF-}\alpha$), interlökin 1 β ve 6 ile oksidatif stres belirteçleri de alamandin tedavisi ile önemli ölçüde azaldı.

Bu bulgulara dayanarak alamandinin depresyon üzerinde anksiyolitik etkiye sahip olduğu ve depresyona bağlı bozulan uzamsal hafızayı düzelttiği saptanmıştır. Bu etkileri muhtemelen nöroinflamasyonu ve oksidatif stresi azaltarak gerçekleştirdiğini söyleyebiliriz. |

Şubat 2024, 129 sayfa.

Anahtar kelimeler: Alamandin, depresyon, kognitif fonksiyonlar, nöroinflamasyon, renin-anjiyotensin sistem. |

ABSTRACT

[Ph.D. THESIS]

[THE EFFECTS OF ALAMANDIN ON COGNITIVE FUNCTIONS AND NEUROINFLAMMATION IN RAT MODEL OF DEPRESSION]

[Aysu KILIÇ]

İstanbul University-Cerrahpaşa

Institute of Graduate Studies

Department of Physiology

Physiology, PhD Program

[Supervisor: Prof. Dr. Nuran DARIYERLİ]

Depression is a disease that can cause impairments in cognitive functions, including attention, memory, psychomotor functions and executive functions. Studies suggest that the renin-angiotensin system (RAS) also plays a role in the pathophysiology of major depression. Alamandine is the newest component associated with the protective axis of the RAS. The aim of our study is to determine the effects of alamandine, a new member of the RAS family, on cognitive functions, neuroinflammation and oxidative stress as a potential teropathic target in the pathophysiology of depression and related cognitive dysfunction.

35 male Sprague dawley rats, 3 months old and weighing between 300-350 g, were used. The chronic unpredictable mild stress model of depression was performed. Experimental animals divided into 5 groups of control (C), depression (D), alamandine (50 µg/kg, i.p.) treatment group (D+A), A779 (300 µg/kg, i.p.) treatment group (D+A779), both alamandine and A779 treatment group (D+ALA+A779). After the development of depression was confirmed by behavioral tests, the learning-memory performances of the animals were measured with the Morris water maze test. At the end of the experiment, prefrontal cortex, hippocampus and blood samples of the animals were isolated for biochemical studies and gene expression analyses.

The sucrose preference test, open field test, elevated plus maze test, tail suspension and forced swimming tests performed to determine the anxiety levels of animals. There was a significant development of anxiety in the D group and the A779 treated group, and alamandine showed an anxiolytic effect. The time spent in the platform area significantly ($p < 0.001$) decreased in both D and D+A779 groups compared to the controls while similar results with the control group were obtained in the alamandine-treated groups in Morris water maze test. The learning-memory markers such as hippocampal brain-derived neurotrophic factor (BDNF), N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor, and cAMP response element binding protein (CREB) significantly increased with alamandine treatment. In addition, tumor necrosis factor alpha (TNF- α), interleukin 1 β and 6, and oxidative stress markers, which are inflammatory markers that increase in parallel with the development of depression in both tissue and serum, were also significantly decreased with alamandin treatment.

Based on these findings, it was concluded that alamandine has an anxiolytic effect on depression and has a positive effect on impaired spatial memory mechanism via reducing neuroinflammation and oxidative stress.]

February 2024 129 pages.

Keywords: [Alamandin, depression, cognitive functions, neuroinflammation, renin-angiotensin system.]

1. GİRİŞ

Depresif bozukluk, sıklıkla bilişsel işlev bozukluğunun eşlik ettiği, oldukça yaygın bir psikiyatrik hastalıktır. Bilişsel eksiklikler, hastalar klinik remisyona eriştiğinde bile devam edebilir [1]. Depresyonun patofizyolojisi anlaşılması güç bir mekanizmadır ve depresyonda geleneksel yollara (monoamin değişiklikleri) odaklanan güncel tedaviler kısmen etkilidir. Depresyon tedavisindeki remisyon oranları, geleneksel farmakoterapi ile tedavi edilenler için sadece %30 civarındadır ve yeterli bir iyileşme düzeyine ulaşmak için sıklıkla birden fazla ajan gerekir [2]. Depresyon ile ilgili yapılan çalışmalar, depresyonda nöroinflamasyon, oksidatif ve nitrostatif stres yolakları, mitokondriyal disfonksiyon ve nörotrofik sinyalizasyonun yer aldığına işaret etmektedir [3].

İnflamasyon; stres, enfeksiyon ve yaralanma durumlarında homeostazı yeniden sağlamak için gereklidir. Hormonlar ve dolaşımdaki proinflamatuvar sitokinler, nöronal hasarın ürünleri ve bakteriyel endotoksinler, transkripsiyon faktörlerini aktive eder ve buna inflamasyon kaskadının aktifleşmesi eşlik eder. Merkezi inflamatuvar zincirinin düzenlenmesi homeostazı yeniden sağlamak için esastır, eğer düzenlenmezse, kronik inflamasyon, nöronal hasar ve beyin kaynaklı nörotrofik faktörde (BDNF) azalma meydana gelebilir [4]. Bu nedenle, inflamatuvar yanıtın aşırı veya sürekli aktivasyonu, hassas bireylerde hastalık riskini artırır ve birçok nörolojik, psikiyatrik ve bilişsel bozukluğun patofizyolojisinde önemli olabilir.

Renin-anjiyotensin sistemi (RAS) vücut sıvı homeostazının ve kan basıncının ana düzenleyicisi olarak kabul edilir. Ancak, son yirmi yılda yapılan araştırmalarda RAS'ın inflamatuvar hastalıkların ve oksidatif stres gelişiminin en önemli modülatörlerinden biri olduğu ve kognitif fonksiyon bozukluğuna da neden olduğu ileri sürülmüştür [5]. Preklinik çalışmalar anjiyotensin II (Ang II) aktivitesinde azalma ile antidepresan etki arasında bir bağlantı olduğunu düşündürmektedir [6]. Klasik RAS eksenini olan anjiyotensin dönüştürücü enzim (ACE)/Ang II/ anjiyotensin tip 1 reseptör (AT1R) ekseninin birçok fizyolojik etkisini dengeleyen anjiyotensin dönüştürücü enzim 2 (ACE2) /anjiyotensin-(1-7) [Ang-(1-7)] /Mas ekseninin keşfi, bu sistemin karmaşıklığını bir kez daha vurgulamıştır. Ang II'nin ACE2 ile ileri seviyede yıkımıyla oluşan Ang (1-7)'nin antioksidan, antiinflamatuvar etkilerinin yanı sıra kognitif fonksiyonlar ve depresyon üzerine olumlu etkileri olduğu yapılan çalışmalarca ileri

sürülmüştür [7]. RAS ailesinin en yeni üyesi olan alamandin ise ACE2'nin katalitik etkisi ile anjiyotensin A'dan veya doğrudan aspartik asidin enzimatik dekarboksilasyonu yoluyla Ang-(1-7)'den üretilir ve biyolojik etkilerinin büyük bir çoğunluğu benzerlik gösterir [8].

Alamandinin etkileri Ang-(1-7)'nin etkilerine benzese de bu iki peptidin reseptörleri farklıdır. Ang-(1-7) Mas reseptörü için endojen ligand iken, alamandin Mas ile ilişkili G-proteinine bağlı D tip reseptör (MrgD) ile etkileşime girer.

Majör depresyonun klasik RAS yolağı olan ACE/AngII/AT1R eksenini hedefleyen ajanlar depresyondaki patolojik belirteçler olan oksidatif ve inflamatuvar stresi azaltmakta ve nörojenezi artırmaktadır. Mevcut prelinik ve klinik çalışmalar anjiyotensin dönüştürücü enzim inhibitörleri (ACEI'ler) ve anjiyotensin reseptör blokerlerinin (ARB'ler) potansiyel antidepresan özelliklerini vurgulamaktadır. Fakat ARB kullanımı ile meydana gelen bu olumlu etkilerin, ortamda biriken Ang II'nin kalsik olmayan ACE2/Anjiyotensin-(1-7) /Mas eksenine dönüşümü ile meydana gelip gelmediği belirsizliğini korumaktadır. Bu bilgilere ek olarak Ang-(1-7) /alamandin-MrgD sinyalleme kaskadının tanımlanması, RAS'ın karmaşıklığını gösteren ve bunun fizyolojik ve patolojik süreçlerdeki rolünü anlamamıza katkı sağlayan en son adımdır. Bu sinyal yolu, hem “zararlı” hem de “koruyucu” RAS eksenini ile ilişkilidir. Ang-(1-7)'nin merkezi sinir sistemi ve kognitif fonksiyonlardaki düzenleyici etkilerini doğrudan mı yoksa alamandine metabolize olduktan sonra, dolaylı olarak mı gösterdiği belirsizliğini korumaktadır.

Günümüzde Alamandin ile ilgili yapılan çalışmaların kardiyovasküler sisteme odaklandığı görülmektedir. Merkezi sinir sistemi ile ilgili çalışmalar ise kısıtlıdır ve henüz alamandinin kognitif fonksiyonlar üzerindeki etkisini gösteren bir çalışmaya rastlanmamıştır. Alamandin, ACE2/Ang (1-7) /Mas ekseninin merkezi molekülü olarak kabul edilebilir. Çalışmamızda Mas reseptör antagonisti olan A-779 kullanılarak yalnızca alamandinin etkilerine odaklanmak hedeflenmiştir. Bu bilgiler ışığında çalışmamızda depresyon ve buna bağlı meydana gelen kognitif fonksiyon bozukluğunun patofizyolojisinde, potansiyel bir tedavi aracı olarak, kognitif fonksiyonlara, nöroinflamasyona ve oksidatif stres üzerine RAS ailesinin yeni bir üyesi olan alamandinin etkilerini incelemeyi hedefledik.

2. KAVRAMSAL ÇERÇEVE

2.1. DEPRESYON

Depresyon; üzüntü, ilgi kaybı, anhedoni, iştahsızlık, suçluluk duygusu, düşük özgüven, yorgunluk hissi ve zayıf konsantrasyon gibi spesifik semptomlarla karakterize edilen bir duygudurum bozukluğudur. Depresyona maruz kalan bireyler, değişen derecelerde çaresizlik ve umutsuzluk, konsantre olamama, uykusuzluk, iştahsızlık, genellikle zevkli buldukları şeylere ilgi kaybı, aşırı üzüntü ve suçluluk duygularını tanımlar ve bunlara ölüm düşünceleri de eşlik edebilir [1]. Depresyon, düzenli ruh hali değişikliklerinden ve günlük hayata ilişkin duygulardan farklıdır. Aile, arkadaşlar ve toplulukla ilişkiler de dahil olmak üzere yaşamın tüm yönlerini etkileyebilir. Okuldaki ve işteki sorunlardan kaynaklanabilir veya bu sorunlara yol açabilir. Depresyon tekrarlayıcı veya uzun süreli olabilir ve işlevsellik yeteneğinde ciddi bozulmaya yol açabilir.

2.2. DEPRESYONUN EPİDEMİYOLOJİSİ

Geniş vadede depresyon, insanları yaş, ırk, etnik köken ve cinsiyetten bağımsız olarak etkileyen, fiziksel sağlık, insan ilişkileri ve bilişsel işlevler üzerinde olumsuz etkilere neden olan bir zihinsel bozukluktur [2]. Dünya Sağlık Örgütü'nün verilerine göre; yetişkinlerin %5'i (erkeklerde %4 ve kadınlarda %6) ve 60 yaşın üzerindeki yetişkinlerin %5,7'si dahil olmak üzere nüfusun tahminen %3,8'i depresyonu deneyimlemektedir. 2023 yılı verilerine göre, dünyada yaklaşık 280 milyon kişi depresyon hastasıdır. Depresyon kadınlarda erkeklere göre yaklaşık %50 daha yaygındır. Dünya çapında hamile kadınların ve yeni doğum yapmış kadınların %10'undan fazlası depresyon yaşamaktadır. Her yıl 700.000'den fazla kişi intihar nedeniyle ölmektedir. İntihar, 15-29 yaş arası gençler arasında dördüncü önde gelen ölüm nedenidir [3].

Depresyon ve diğer hastalıklarla ilişkisi üzerine yapılan araştırmaların büyük çoğunluğu, depresyonun diğer hastalıkların gelişme riskini arttırdığını, prognozu kötüleştirdiğini ve mortaliteyi artırdığını ileri sürmektedir [4,5]. Çoklu klinik örneklerden ve epidemiyolojik araştırmalardan elde edilen veriler, depresyonun hipertansiyon, diyabet, astım, artrit, kronik

solunum bozuklukları, kronik ağrı ve kardiyovasküler hastalıklar gibi kronik fiziksel hastalıkların gelişimi için önemli bir risk faktörü olduğunu göstermiştir [6-8].

2.3. DEPRESYONUN PATOFİZYOLOJİSİ

2.3.1. Biyolojik Nedenler

Depresyonun patofizyolojisi; genetik veya çevresel faktörleri, endokrin bozuklukları, hipotalamus-hipofiz-adrenal (HPA) eksenin değişimini, nörotransmitter salınımında veya reseptör düzeyinde değişiklikleri, inflamasyon mekanizmalarını, oksidatif stresi ve pek çok bilinmeyenini içinde barındıran, kompleks bir mekanizmadır. Depresyon, monoaminler (serotonin, norepinefrin ve dopamin), gama-amino-bütirik asit (GABA) ve glutamat gibi nörotransmitterlerin işlevlerindeki bozuklukla karakterize edilmektedir.

2.3.2. Çevresel Stres Faktörleri

Çevresel stresin, depresyonun klinik seyrini hızlandırmada ve etkilemede önemli bir role sahip olduğu bilinmektedir [9]. Stresin yokluğu, depresyon gelişimine karşı bir miktar koruma sağlayabilir, dolayısıyla depresyon, stres yanıt sisteminin düzensizliğinin olası bir sonucu olarak açıklanabilir. Deneysel hayvan çalışmalarından elde edilen kanıtlar, stresin beyinde yapısal ve işlevsel değişikliklere neden olduğunu göstermektedir. Çeşitli stres etkenlerine maruz kalmanın ardından prefrontal korteks (PFK), amigdala, hipokampus ve nukleus akumbensin yapısal değişikliklerin depresyon gelişimine katkıda bulunduğu gösterilmiştir [10-12].

2.3.3. Genetik Faktörler

Aile ve ikizlerle yapılan çalışmalar, genetik faktörlerin depresyon riskini arttırdığını öne sürmektedir. Örneğin, ikiz araştırma verilerinin meta-analizi, depresyonun kalıtsallık oranının %37 olduğunu ve depresyonlu hastaların birinci derece çocuklarında depresyon riskinin iki ila üç kat arttığını göstermektedir [13]. Bir dizi gen depresyon gelişimiyle ilişkilendirilmiş olsa da yalnızca birkaç genetik polimorfizmin depresyonla anlamlı ilişkisi vardır [14]. Bu genlerden bazıları apolipoprotein E, guanin nükleotid bağlayıcı protein, metilentetrahidrofolat redüktaz, dopamin taşıyıcı, serotonin taşıyıcı ve dopamin reseptör genini içerir [15,16].

2.3.4. Monoamin Hipotezi ve Diğer Nörotransmitterler

Depresyon, monoaminler (serotonin, norepinefrin ve dopamin), GABA ve glutamat nörotransmitterlerin işlevlerindeki bozuklukla ilişkilendirilmektedir. Beyin çok sayıda

noradrenerjik, serotonerjik ve dopaminerjik nöron içerir. Noradrenerjik nöronlar beyin sapından hemen hemen tüm beyin bölgelerine yayılır. Norepinefrin (NE) PFK'nin fonksiyonunu, çalışma belleğinin işlenmesini modüle eder ve davranış ve dikkati düzenler. NE ayrıca duygusal anıların edinilmesinde de rol oynar. Serotonin (5-hidroksitriptamin: 5HT) libido, iştah, kognitif fonksiyonların modülasyonu, duygudurum ve uykunun düzenlenmesinden sorumludur. Dopamin (DA) ise ödül ve motivasyon işlevlerini, çalışma belleğini ve dikkati modüle eder [17-19].

Monoaminerjik sistemlerin, düşük ruh hali, azalmış motivasyon, yorgunluk ve psikomotor gerileme gibi depresyonun birçok davranışsal semptomunda etkili olduğu ortaya konmuştur. Bu hipotez aynı zamanda "monoamin hipotezi" olarak da bilinir ve monoamin nörotransmitterlerinin (5HT, NE ve DA) azalmasına ve depresyona yol açabilecek bilişsel performansın bozulmasına yol açtığını öne sürer [20]. Monoamin teorisi, rezerpin isimli antihipertansif ajanın monoaminlerde azalmaya sebep olarak depresyon belirtilerine yol açması ve monoamin oksidaz inhibitörlerinin depresyon belirtilerini düzelttiğinin fark edilmesi ile ortaya çıkmıştır [21]. Depresyonda görülen monoaminlerin fonksiyonel eksikliği aynı zamanda protein taşıyıcı fonksiyonlarının azalmasından ve nörotransmitter reseptör fonksiyonundaki anormalliklerden de kaynaklanabilir [1]. Serebral 5HT seviyelerindeki değişiklikler, depresyonda görülen davranışsal ve somatik işlevlerdeki (iştah, uyku, cinsiyet, ağrı tepkisi, vücut ısı ve sirkadiyen ritim dahil) değişikliklerle ilişkilendirilmiştir ve çeşitli çalışmalar depresyonlu hastaların beyinlerinde, depresyonlu olmayan hastalara kıyasla düşük 5HT düzeyleri olduğunu göstermiştir [22]. Benzer şekilde DA anormallikleri motivasyon, konsantrasyon bozukluğu ve saldırganlıkla ilişkilendirilmiştir [19]. Ayrıca düşük NE seviyeleri iştah kaybı, saldırganlık, konsantrasyon bozukluğu, ilgi ve motivasyon kaybı gibi depresyon belirtileri ile ilişkilendirilmiştir [23].

Monoamin hipotezinde, monoaminlerin fonksiyonel eksikliği, sinaptik yarıktaki monoamin oksidazların bozucu etkileri yoluyla ortaya çıkar. Bu, depresyonlu bireylerde artan monoamin oksidaz enzim aktivitesinin deneysel bulgularıyla desteklenmektedir [24]. Bu enzim sistemlerinin sürekli eylemleri, biyojenik aminlerin mevcudiyetinde önemli bir azalmaya neden olur, dolayısıyla depresyonda görülen nörotransmisyonun azalmasına neden olur. Bu hipotez, monoamin nörotransmitterlerinin düşük düzeylerini eski haline getirmek amacıyla monoamin oksidaz inhibitörlerinin depresif hastalıkların tedavisinde antidepresan ilaçlar olarak uygulanmasının temelini oluşturur [25,26].

Buna ek olarak, taşıyıcı proteinlerin fonksiyon bozukluğu da depresyon gelişimine katkıda bulunur. Taşıyıcı proteinler nörotransmitterlerin yeniden alımını kolaylaştırarak, sinaptik yarıktaki nörotransmitterlerin varlığının azaltılmasına yardımcı olur ve nörotransmitterlerin monoamin oksidaz enzimleri tarafından yıkılma derecesini azaltır [27]. Dolayısıyla azalan taşıma proteini sayısı ve/veya işlevi, depresyonda görülen daha düşük monoamin nörotransmitter düzeylerine katkıda bulunabilir.

Anormal nörotransmitter yıkımı veya taşıyıcı protein fonksiyon bozukluğunun yanı sıra reseptör işlevlerindeki değişiklikler de depresyona yol açabilir [28]. Bu tür değişiklikler, bozulmuş nörotransmitter-reseptör eşleşmesinden (genellikle nörotransmitterlere karşı reseptör afinitesinin azalması veya reseptör sayılarının azalması nedeniyle) veya anormal iletime neden olan reseptörün aşağı-regülasyonu sebebi ile iletim kademesindeki değişikliklerden kaynaklanabilir. Yapılan çalışmalarda depresyonlu bireylerde, beyindeki serotonin reseptörlerinin (5-HT1 ve 5-HT2) sayısı ve afinitesindeki değişiklikler ve presinaptik $\alpha 2$ -adrenoseptörlerin aşırı duyarlılığı rapor edilmiştir [29].

2.3.4.1. Glutamat ve NMDA Reseptörleri

Depresyona, beyindeki temel uyarıcı nörotransmitter olan glutamat ve temel inhibe edici nörotransmitter olan GABA'daki değişikliklerin de yol açtığı gösterilmiştir [30]. Duygudurum bozukluğu olan bireylerin beyinlerindeki glutamat ve GABA sistemlerinde anormalliklerin bulunması, bu bozuklukların patofizyolojisi ve tedavisi konusunda yeni teorilerin ortaya çıkmasına yol açmıştır. Morfolojik çalışmalar, kronik strese maruz kalmanın, glutamat nöronlarının yapısını ve fonksiyonunu azalttığını ve glutamat nöronlarının atrofisinin, depresyonda rol oynayan kortikal ve limbik yapıların hacmindeki azalmaya katkıda bulunduğunu göstermektedir [31].

Yıllar süren araştırmalar, glutamatın depresyon da dahil olmak üzere çeşitli nörolojik ve nöropsikiyatrik bozukluklardaki etkilerini ve rollerini ortaya çıkarmaya devam etti. Daha yakın zamanlarda, özellikle tedaviye dirençli depresyonda bir N-metil-D-aspartat reseptör (NMDAR) antagonisti olan ketaminin antidepresan etkileri bildirilmiştir [32]. Depresyonlu bireylerde glutamerjik aktivite ve NMDAR ekspresyonun beyin değişik bölgelerinde farklı düzeylere sahip olduğu tespit edilmiştir. Akut stresin PFK ve hipokampusta glutamatı arttırdığı ve NMDAR aracılığıyla eksitotoksisite meydana getirerek bu beyin bölgelerindeki nöronların atrofisinden sorumlu olduğu da ileri sürülmektedir [32]. Kronik stres ise glutamat sisteminin bozulmasına ve nöroplastisitenin azalmasına neden olabilir. Kronik stres hipokampusta,

glutamat salınımının artmasına, uzun süreli güçlenmenin (LTP) bozulmasına, apikal dendritlerin atrofisine ve öğrenme ve hafıza eksikliklerine yol açarken; prefrontal kortekste, glutamat salınımının azalmasına, LTP'nin bozulmasına, dendritik dikenlerin azalmasına ve dikkatin bozulmasına yol açar [33]. Amigdalada kronik stres, glutamat salınımının azalmasına, LTP'nin bozulmasına veya artmasına, dendritik hipertrofiye, dendritik dikenlerin artmasına ve kaygıya yol açar [33,34].

NMDA reseptörlerinin alt tiplerinin dağılımı beynin farklı bölgelerinde değişiklik gösterir; bu da sinaptik plastisitenin yönünü etkileyebilir. Glutamat reseptörü (NMDA) alt birimi (GluN1) ve GluN2A-D alt birimi, merkezi sinir sistemindeki en belirgin alt birimlerdir [35]. Kortikal, hipokampal ve striatal nöronlar GluN2A ve GluN2B alt birimleri açısından zengindir [36,37]. GluN2D alt birimi de hipokampusta mevcuttur, ancak yalnızca genç sıçanlarda mevcuttur ve yetişkinlikte tespit edilemez. Buna karşılık, GluN2C alt birimleri serebellumla sınırlıdır [38,39]. NMDAR'ler esas olarak postsinaptik olarak bulunur, ancak bunların önemli bir alt kümesi de ekstrasinaptik olarak bulunur. Sinaptik NMDAR'lerin aktivasyonu genellikle hücre sağkalımını desteklerken, ekstrasinaptik NMDAR'lerin aşırı aktivasyonu nörotoksik olabilir ve hücre ölümüne neden olabilir [40]. GluN2A alt birimlerinin sinapslarda baskın olduğu, buna karşın GluN2B ve GluN2D'nin yalnızca ekstrasinaptik bölgede lokalize olduğu rapor edilmiştir [41,42]. Bu nedenle, GluN2A içeren reseptörlerin sinaptik plastisiteye katkıda bulunduğu, GluN2B seçici antagonistlerin ise nöroprotektif özelliklere sahip olabileceği düşünülmektedir.

Yapılan araştırmalar, depresyonlu kişilerde NMDAR'nin anormal bir gen ekspresyonuna sahip olduğu gösterilmiştir [43,44]. Buna ek olarak başka bir çalışmada stresörlerin depresyon patolojisine yol açabilecek aşırı NMDAR aktivitesini tetiklediği ileri sürülmüştür [45]. Ayrıca ketamin gibi NMDAR blokerleri antidepresan özelliklere sahiptir ve geleneksel antidepresan ilaçlar genellikle NMDAR fonksiyonu üzerinde etkilidir [46]. Anneden ayrılma, yetişkin sıçanların hipokampusunda NMDAR'lerin alt biriminin ekspresyonunun artmasına neden olur [47]. Sonuç olarak bu araştırmalar majör depresyonda NMDAR'lerin aşırı uyarıldığını göstermektedir. Ancak yapılan bazı çalışmaların bulguları ile bu araştırmalardan elde edilen bulgular büyük değişiklik göstermektedir ve bu tutarsızlık muhtemelen incelenen beyin bölümlerinin farklı olması sebebiyledir. Örneğin, ölüm sonrası çalışmalar, majör depresyonda prefrontal ve perirhinal kortekslerde GluN2A ve GluN2B alt birimlerinin seviyelerinin azaldığını, ancak lateral amigdalada GluN2A alt birimlerinin seviyelerinin arttığını ortaya

çıkarmıştır [47,48]. Kronik kısıtlama stresi, BALB/c farelerinde GluN2A ve GluN2B alt birim genlerini önemli ölçüde arttırmış, ancak C57BL/6 farelerinde artırmamıştır [39].

2.3.4.2. GABA ve GABA_A Reseptörleri

Çalışmalar, kronik strese maruz kalmanın, sıçan PFK glutamat ve glutamin döngüsü ve metabolizmasının yanı sıra GABA'yı da azalttığını göstermektedir; bu etkiler, glial metabolizmadaki azalmaya atfedilmektedir. GABA nöronları toplam nöron popülasyonunun glutamata kıyasla yaklaşık yüzde 15-20 oranında daha küçük bir kısmını oluştururken, inhibitör ve eksitator iletimle denge normal beyin fonksiyonu için kritik öneme sahiptir [49]. Daha önce yapılan çalışmalarda depresyonlu hastaların beyin omurilik sıvısında GABA seviyelerinin azaldığı bildirilmiştir [49,50]. Kronik strese ilişkin prelinik çalışmalar medial PFK ve diğer kortikal beyin bölgelerinde GABA sentetik enzimleri ve nöropeptit seviyelerinde azalma olduğunu ileri sürmektedir [50]. Duman ve diğ. (2019) sıçanlarda kronik öngörülemez strese 3 hafta maruz kalmanın, presinaptik ve postsinaptik GABA belirteçlerini azalttığını göstermişlerdir [30]. Ayrıca beyin görüntüleme çalışmaları depresyonlu hastaların kortikal beyin bölgelerinde GABA seviyelerinin azaldığını ve GABA'nın remisyona normale döndüğünü bildirmektedir [51,52]. Buna ek olarak, transkranial manyetik stimülasyon çalışmaları da depresyonlu hastalarda GABA fonksiyonunda bir azalma olduğunu göstermiştir [53]. Ventral hipokampusta ise GABA_A sinaptik iletimi artıran akut stresin aksine, kronik stres, hipokampal internöronların seçici kaybına bağlı olarak GABA_A sinaptik akımlarda azalmalara neden olur. Bu etki, hipokampal piramidal hücrelerden nitrik oksit (NO) salınımını uyaran, membrana bağlı, iyi tanımlanmamış bir reseptör üzerinde etkili olan glukokortikoidlere atfedilmiştir [54].

GABA, etkisini tamamen farklı iki reseptör sınıfının, iyonotropik GABA_A reseptörlerinin (GABA_AR'ler) ve metabotropik GABA_BR'lerin aktivasyonu ile gösterir. Benzodiazepinler, barbitüratlar ve anestezikler dahil olmak üzere klinik açıdan önemli bir dizi ilacın hedef reseptörü GABA_AR'lerdir. Yapılan çalışmalar hem anksiyete hem de duygudurum bozukluklarında GABA_AR sinyal yolağında belirgin değişikliklere işaret etmektedir. Yaygın anksiyete bozukluğu olan hastaların temporal lobunda ve travma sonrası stres bozukluğu görülen hastaların medial PFK'sinde GABA_AR eksiklikleri saptanmıştır [55]. Ayrıca farelerde GABA_BR'lerin farmakolojik ve genetik manipülasyonları anksiyete ve depresyonla ilişkili duygudurum bozukluklarına yol açmıştır [56]. Bununla birlikte, şizofreni ve bipolar bozukluk dahil olmak üzere diğer psikiyatrik hastalıklarda da GABA belirteçlerinde azalmalar

gözlenmektedir, bu da GABA işlev bozukluğunun hastalık için daha genel bir kırılganlık faktörü olduğunu göstermektedir [57]. Strese HPA eksenini yanıtlayan belirleyen kortikotropin salgılayan hormonun kaynağı olan hipotalamusun paraventricüler çekirdeği GABA_Aerjik inhibitör kontrolüne tabidir. Bunu destekleyecek şekilde genetik olarak GABA_AR eksikliği olan farelerin, kronik olarak yüksek HPA eksenini aktivitesi sergilediği ileri sürülmüştür [58].

2.3.5. Endokrin faktörler

Depresyonun etiolojisine endokrin sistem anormallikleri de katkıda bulunabilir. Bunlar arasında değişen büyüme hormonu (GH) seviyeleri, tiroit hormonu anormallikleri ve HPA eksen fonksiyon bozukluğu yer alır.

2.3.5.1. Hipotalamus-Hipofiz-Adrenal Eksenini

Depresyonun patofizyolojisinde anahtar rol oynayan HPA eksenini aktivitesinde artış, kronik stres sırasında ortaya çıkmaktadır. HPA ekseninin aşırı aktivitesi majör depresif bozuklukta ortaya çıkar ve bilişsel işlev bozukluğuna ve ruh halinin azalmasına yol açar. Depresif bireylerde kortikotropin salgılatıcı hormon (CRH) ve kortizol hipersekresyonu, bozulmuş glukokortikoid geri bildirim mekanizması, eksojen glukokortikoid uygulamasına yanıt olarak yetersiz HPA eksenini baskılaması ve bozulmuş kortikosteroid reseptör sinyali yapılan çalışmalarda bildirilmiştir [59,60]. Aşırı kişisel suçluluk ve umutsuzluk, iştah azalması, kilo kaybı, cinsel davranışta azalma, uykunun bozulması, psikomotor aktivitede değişiklik ve psikolojik stres etkenlerine aşırı aktif tepki gibi bazı depresif belirti ve semptomlar HPA eksenini işlev bozukluğuyla ilişkilendirilmiştir. Bu, Cushing sendromu olan hastaların neden sıklıkla depresyon yaşadıklarını kısmen açıklayabilir. Hayvan çalışmalarında CRH'nin merkezi sinir sistemine doğrudan uygulanması ile iştah azalması ve kilo kaybı, cinsel davranışta azalma, uykuda bozulma ve psikomotor aktivitede değişiklik gibi depresyon semptomlarının ortaya çıktığı gösterilmiştir. Depresyondaki hastaların aynı zamanda yüksek beyin omurilik sıvısı (BOS) konsantrasyonlarına sahip olduğu da bulunmuştur [1]. Buna ek olarak depresyonlu hastalarla yapılan çalışmalarda önemli ölçüde yüksek plazma ve tükürük kortizol seviyeleri gösterilmiş ve depresif deneklerde yüksek kortizol seviyelerinin depresyonun yoğunluğu ve ciddiyeti ile ilişkili olduğu bulunmuştur. Kortizol sentezini inhibe etmek için anti-glukokortikoidlerin deneme amaçlı kullanımı hem hayvan hem de insan çalışmalarında olumlu sonuçlara yol açmaktadır [61].

Preklinik çalışmalar, deney hayvanlarına glukokortikoid uygulanmasının dendrit atrofisine ve hipokampus ile PFK'de sinaptik bağlantı sayısının azalmasına neden olduğunu ileri

sürmektedir [62]. Bunu destekleyecek şekilde deney hayvanlarına adrenal glukokortikoid uygulanmasının GABA nörotransmisyonunda eksikliklere yol açabileceğine dair bulgular da vardır [63]. Glukokortikoidlerin bir diğer hedefi de nöronların korunmasına ve hayatta kalmasına katkıda bulunan önemli bir nörotrofik faktör olan beyin kaynaklı nörotrofik faktördür (BDNF). Depresyonlu hastalarla yapılan ölüm sonrası bir çalışmada, deneklerin hipokampusunda ve PFK'de BDNF seviyeleri azalmış olarak bulunmuştur [30].

2.3.6. İmmünolojik Faktörler: Sitokinlerin rolü

Depresyonda hipotalamus-hipofiz-adrenal veya hipotalamus-hipofiz-gonadal eksenlerinin düzensizliği, inflamasyon ve bağışıklık sistemi yanıtları ile birlikte gözlemlenir [64].

Sitokinler, öncelikle yabancı veya istilacı patojenik antijenlere yanıt olarak, lenfoid hücreler tarafından salgılanan kimyasal inflamatuvar araçlardır. Vücuttaki inflamasyon sürecinde yer alan diğer tüm bağışıklık hücrelerinin düzenleyicileri olarak işlev görürler. Sitokinler; interferonları (INF), interlökinleri (IL), koloni uyarıcı faktörleri ve diğerlerini (örn. tümör nekroz faktörü (TNF), C-reaktif protein (CRP) ve serum amiloid proteinleri içerir. Sitokinler genellikle proinflamatuvar (IL-1, IL-6 ve TNF) veya antiinflamatuvar (IL-4, IL-8, IL-10 ve IL-13) olmak üzere iki kategoriye ayrılır. Güncel literatürde, depresyonun patogeneğinde bir takım immünolojik veya inflamatuvar sitokinlerin de katkısı olduğu ileri sürülmüştür [65]. Bunlar arasında interlökinler IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10 ve interferon gama, CRP, TNF- α ve kemokin monosit kemoatraktan protein-1 yer alır. İnflamatuvar sitokinler depresyonu tetikleyebilir, sıklıkla depresyonla ilişkilendirilir ve deney hayvanlarında majör depresyona benzer bazı davranışları ortaya çıkarabilir. Ayrıca bu sitokinler monoaminergic ve glutamaterjik sistemleri etkileyebilir [66].

Depresyonlu bireyler, depresyonda olmayan bireylerle karşılaştırıldığında, inflamatuvar sitokinler ve bunların çözünebilir reseptörleri, akut faz proteinleri, kemokinler, adezyon molekülleri ve prostaglandinler gibi inflamatuvar belirteçlerin periferik kan ve beyin omurilik sıvısı örneklerinde artış gösterdiği bulunmuştur. İnflamatuvar belirteçler ile yorgunluk, bilişsel işlev bozukluğu ve uyku bozukluğu gibi bireysel depresif belirtiler arasındaki ilişkiler de tanımlanmıştır [67]. Örneğin, depresyonlu hastalarda hem düzensiz uyku hem de uyku yoksunluğu, artan IL-6 ile ve ayrıca inflamatuvar yanıtın başlatılmasında birincil transkripsiyon faktörü olan nükleer faktör kappa B'nin (NF- κ B) aktivasyonu ile ilişkilendirilmiştir [68].

Enfeksiyonlara verilen normal immünolojik yanıtın bir parçası olan proinflamatuvar sitokinler (IL-1 β ve TNF- α gibi), hipertermi, bulantı, iştah kaybı, uyku bozuklukları, anhedoni, kolay yorulma ve sosyal ve fiziksel ortamlara ilgi kaybı gibi davranışsal tepkilerin bir kombinasyonunu başlatmak üzere beyindeki çoklu reseptörler üzerinde etki gösterir [233]. Bu bilgiye ek olarak, IL-10 gibi anti-inflamatuvar sitokinler, pro-inflamatuvar sitokinlerin aşırı üretimini ve sinyalini engeller. Dolayısıyla karşıt sitokin gruplarının aktivitelerindeki bir dengesizlik, depresyonun patogeneze katkıda bulunabilir [69]. İnflamatuvar sitokinlerin depresyondaki rolüne ilişkin bazı tutarsız bulgulara rağmen, araştırmaların büyük bir çoğunluğu, inflamatuvar sitokinlerin depresyon patofizyolojisinde önemli bir rol oynadığını ileri sürmektedir [70,71].

2.3.7. Nöroinflamasyon

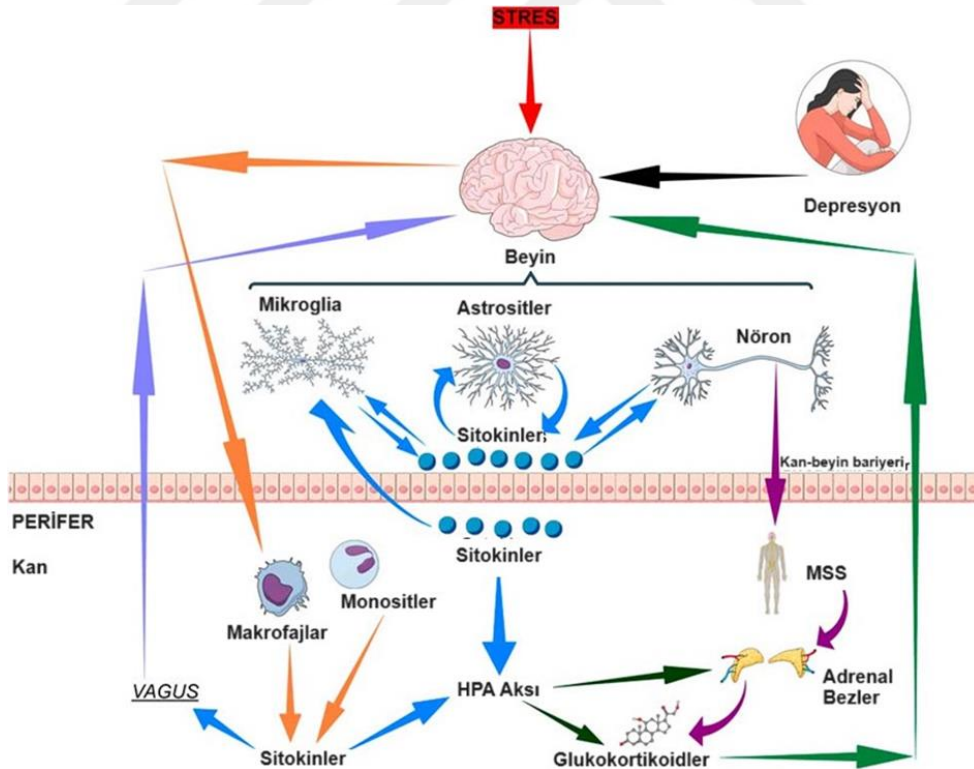
Nöroinflamasyon, sinir dokusunun iltihaplanmasıdır. Enfeksiyon, travmatik beyin hasarı, toksik metabolitler veya otoimmünite gibi çeşitli işaretlere yanıt olarak başlatılabilir. Nöroinflamasyonun bir sonucu olarak, beyindeki doğal bağışıklık hücreleri (mikroglia, astrositler ve oligodendroglia), inflamatuvar uyarıya yanıt olarak sitokinleri, kemokinleri ve prostaglandinler gibi ikincil inflamatuvar araçları serbest bırakmak üzere aktive edilir [72]. Bazı çalışmalar, depresyona kan beyin bariyerini geçen periferik inflamatuvar sitokinlerin sebep olabileceğini ileri sürmektedir. Ancak, tamamen serebral kökenli inflamasyon belirteçlerinin tanımlanması, depresyon patofizyolojisinde nöroinflamasyonun daha merkezi bir role sahip olduğunu göstermektedir [72,73].

Psikolojik ve sosyal stres etkenleri insanlarda inflamatuvar sitokin düzeylerini artırabilir ve sitokin infüzyonları (örneğin interferon) depresyon özelliklerine sahip hastalık davranışlarına neden olabilir. Depresyonlu hastalarda proinflamatuvar sitokinler IL-1 β , IL-6 ve TNF- α 'nın serum seviyeleri artar ve sitokin seviyeleri antidepresan tedavisiyle normalleştirilir [74]. Son çalışmalar stresin etkilerinde inflamatuvar aktivasyonun bir rol oynadığını göstermektedir. Guo ve diğ. (2020), stresin olumsuz etkisinin hem hücre içi hem de hücre dışı sinyal yollarını etkileyen, nöroinflamasyonu tetikleyen mikrogial hücrelerin aktivasyonundan kaynaklanabileceğini öne sürmüştür [75].

İnsanlarda depresyonun patofizyolojisinde rol oynayan inflamatuvar sitokinlerin, depresyon semptomlarına katkıda bulunduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur [76]. Örneğin, inflamasyon biyobelirteci olan CRP'si yüksek olan hastaların TNF- α antagonistine antidepresif yanıt

geliştirdiğini göstermektedir [77]. Ayrıca, normal sitokin seviyelerine sahip hastaların, TNF- α nötralizasyonundan sonra depresyon semptomlarının kötüleştiğine dair bulgular da dikkate değerdir; bu, normal beyin fonksiyonu için sitokinlerin gerekli olduğu fikriyle tutarlıdır.

Sitokinler ayrıca HPA eksenini merkezi modelinde de yer almaktadır. Artan proinflatuar sitokinler, 5HT üretimini azaltarak, beyin nöroplastisitesine ve monoamin aktivitesini değiştirerek doğrudan depresyon semptomlarına neden olur [78]. Pro-inflatuar sitokinler, glukokortikoid reseptör direncini artırır, CRH down-regülasyonunu inhibe eder ve bunun sonucunda kortizolün aşırı salgılanmasını sağlar. Dolayısıyla immünolojik faktörler depresyonu dolaylı olarak HPA eksenini yoluyla modüle eder. Bununla birlikte, psikolojik veya çevresel stres faktörleri, HPA eksenini aracılığıyla, esas olarak hipotalamik CRH üretimini artırarak, ikincil olarak proinflatuar sitokinlerin üretimini artırarak depresyona yol açar. İki durumda da HPA ekseninin strese bağlı hiperaktivitesi, bu katkıda bulunan faktörler ile depresif belirtilerin gelişimi arasındaki ana nörobiyolojik bağlantı gibi görünmektedir [79] (Şekil 2-2-1).



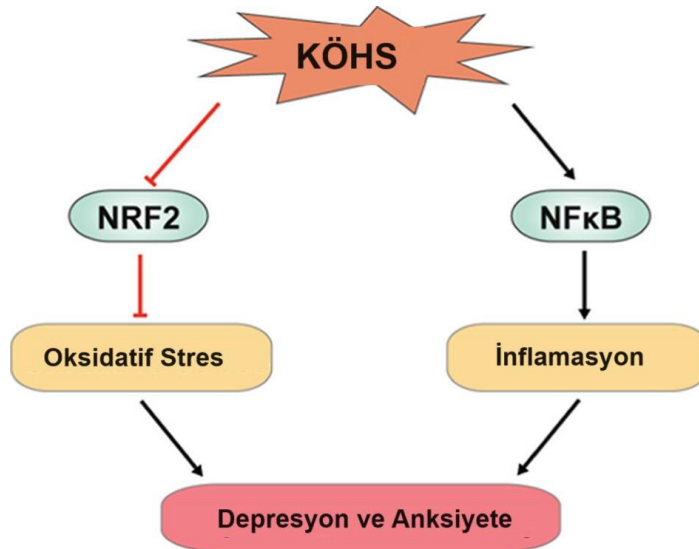
Şekil 2-2-1: Stres, beyin ve inflammatuar sitokinler arasındaki bağlantılar. HPA, hipotalamik-hipofiz-adrenal eksen; SSS, sempatik sinir sistemi [80].

2.3.8. Oksidatif Stres Hipotezi

Elde edilen son bulgulara göre, depresyon beyin fonksiyonundaki değişiklikler, nöronal plastisite ve PFK ve hipokampus hacminin azalmasıyla ilişkilidir [81]. Depresyon sırasında beyin yapısındaki bu yapısal ve işlevsel bozulmaların ana nedenlerinden biri oksidatif strestir. Preklinik ve klinik çalışmalar, değişen beyin yapısından artan reaktif oksijen türevleri (ROT) üretiminin ve antioksidan savunma sistemlerinin tükenmesinin sorumlu olduğunu göstermiştir. Bu hipotez 'depresif bozuklukların oksidatif stres hipotezi' olarak bilinir [82].

BDNF ve NF- κ B dahil olmak üzere nörodejenerasyonu ve nöro korumayı etkileyen çeşitli faktörler arasındaki dengesizliğin yanı sıra, artan oksidatif stresin bir sonucu olarak proinflamatuvar sinyal yollarının aktivasyonu da depresyonun patogeneze katkıda bulunur [83] (Şekil 2-2-2).

ROT, inflamasyon, mitokondri disfonksiyonu, hipoaktif NMDA reseptörleri ve GABA internöronlarının bozulması dahil olmak üzere çeşitli patofizyolojik süreçlerle yakından bağlantılıdır [84]. Parkinson hastalığında ROT, dopaminerjik nöronların bozulmasına katkıda bulunur. Oksidatif stres aynı zamanda mitokondriyal fonksiyon bozukluğu, eksitotoksisite, nitrik oksit toksisitesi ve inflamasyon gibi nörodejenerasyondaki diğer olaylarla da yakından ilişkilidir. Deneysel anksiyete ve depresyon modellerinde artan ROT'un, HPA eksenindeki geri bildirimleri modüle ettiği ve GABA ve serotonerjik iletimi değiştirdiği bilinmektedir [85].



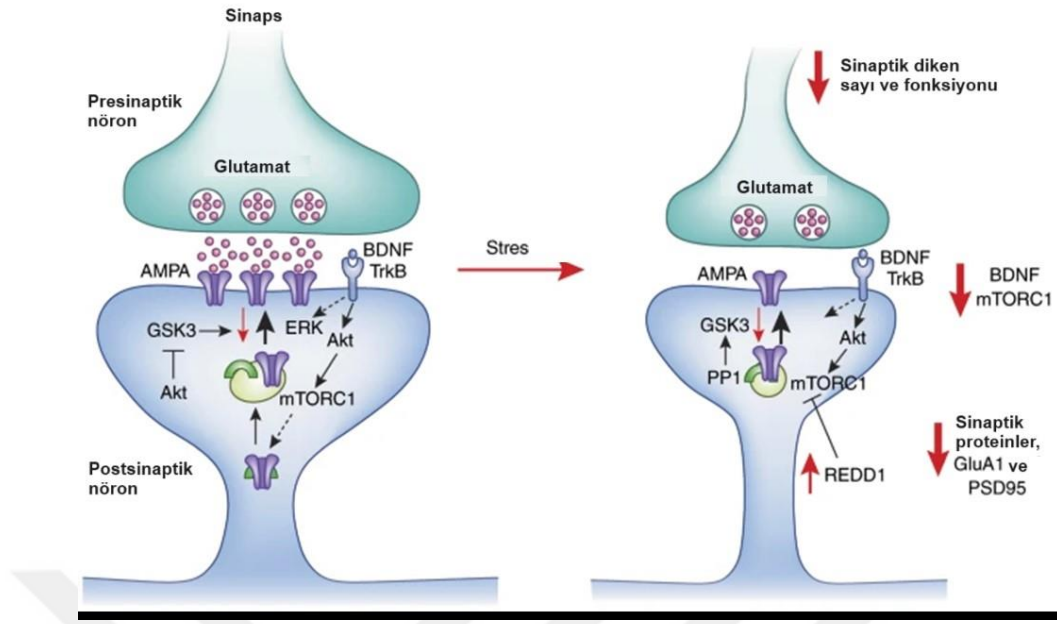
Şekil 2-2-2: Kronik öngörülemez hafif stres (KÖHS), oksidatif stres ve inflamasyon ilişkisi [86].

2.3.9. Nöroplastisite

Sinaptik plastisite, karmaşık bilgileri algılama, değerlendirme, depolama ve uyaranlara uygun yanıtlar verme yeteneği gibi beynin en temel ve önemli işlevlerinden birini temsil eder. Bu kritik beyin fonksiyonu hem kısa hem de uzun süreli hafızada önemli bir role sahiptir ve bu değişikliklerin altında yatan mekanizmalar, depresyon da dahil olmak üzere birçok nörobiyolojik bozukluğun patofizyolojisi ve tedavisi ile ilişkilendirilmiştir [87].

Sinaptogenez, sinyal yollarının karmaşık bir etkileşimi ile düzenlenir ve nörotrofik faktör desteğinin kaybı, östradiol döngüsünün bozulması ve inflamatuvar sitokinlerin yükselmesi dahil olmak üzere birçok temel yolun bozulması depresyona yakınlıkla ilişkilendirilmiştir. Glial hücreler ayrıca glutamatin sentezini ve geri alımını düzenlemede önemli bir role sahiptir ve dolayısıyla sinaptik fonksiyonu ve morfolojiyi etkiler [30].

Depresyon ve tekrarlayan stres ile ilgili önde gelen teorilerden biri, PFK ve hipokampusta nöroplastisite mekanizmalarıyla ilişkili nörotrofik faktörlerin ve sinaptik bağlantının bozulmasıdır. Bu modele göre nörotrofik faktörlerin en önemlisi olan BDNF'nin, depresyonda rol oynadığı ileri sürülmektedir. Ek olarak, tekrarlanan strese maruz kalma, sinaps oluşumu ve nöroplastisite için gerekli olan mTORC1 (*mammalian target of rapamycin complex 1*) sinyalini azaltır. Stres ve depresyonun, depresyonla ilişkili yapılar olan PFK ve hipokampustaki BDNF'nin ekspresyonunu ve fonksiyonunu azalttığı, ayrıca depresyonlu kişilerin kanındaki BDNF düzeylerini de azalttığı gösterilmiştir [88,89]. Tersine, antidepresan tedaviler (seçici serotonin geri alım inhibitörleri (SSRI'lar) gibi) BDNF ekspresyonunu artırır ve stres ve depresyonun neden olduğu büyüme faktörü ekspresyonundaki eksiklikleri bloke eder. Azalan nörotrofik veya büyüme faktörü seviyeleri, stres ve depresyonun neden olduğu yapısal değişikliklerle özellikle ilgili olabilir; çünkü bu faktörler (özellikle BDNF), sinaptik bağlantıların aktiviteye bağlı oluşumu ve bakımı için gereklidir (Şekil 2-2-3). Bu, çevreye yetersiz adaptasyona, öğrenme ve stresle başa çıkmanın zorlaşmasına ve PFK tarafından düzenlenen bazı 'limbik ağ' bölgelerinde aktivite bozukluklarına neden olur. Tedavi ile nöroplastisite güçlendirildiğinde sinaptik bağlantılar ve nöronal yapı stabilizasyonu artar. Bu temel bulgular, zorunlu yüzme testinde umutsuzluk davranışı veya sükroz tercih testinde anhedoni davranışı gibi deneysel hayvan modellerinde direkt olarak depresyon benzeri davranışlarla ilgilidir [90].



Şekil 2-2-3: Sinaptik plastisitenin düzenlenmesinde BDNF etkisi ve stres maruziyeti sonrasında sinaptik diken oluşumunda azalma [92].

Beynin yerleşik bağışıklık hücreleri olan mikroglialardan türeyen inflamatuvar sitokinler, fizyolojik koşullarda sinaptik plastisiteyi etkiler. Özellikle düşük $\text{TNF-}\alpha$ ve $\text{IL-1}\beta$ seviyeleri, PI3K-Akt (fosfatidilinositol 3-kinaz-Akt) sinyalleme sisteminin düzenlenmesi yoluyla sinaptik plastisiteyi destekler. Bununla birlikte, stres, yaşlanma ve inflamasyon, sitokin sinyal yollarında yer alan p38 (*mitogen-activated protein kinases* (p38 MAPKs)) ve $\text{NF-}\kappa\text{B}$ gibi faktörler aracılığıyla inflamatuvar sitokinlerde anormal yükselmelere neden olur [91]. Mikroglialar, gelişim sırasında aktiviteye bağlı sinaptik budama işlemine katılır ve strese maruziyetle budama işlevleri artış gösterebilir. Normal beyin fonksiyonunun düşük seviyelerde inflamatuvar sitokinlere ihtiyaç duyduğu, ancak yüksek seviyelerin stres ve depresyona yanıt olarak omurga sinapsların hasarına, atrofisine ve kaybına sebep olduğu bilinmektedir.

2.3.9.1. Kognitif Fonksiyonlarda Plastisite Bozuklukları

Depresif hastalarda kognisyon bozuklukları göze çarpmaktadır. Bunlardan en önemlisi aşırı genel otobiyografik bellektir. Aşırı genel otobiyografik bellek, kişinin otobiyografik belleğinden belirli anıları geri getirememesidir. Bunun yerine, tekrarlanan olaylar veya geniş dönemlerde meydana gelen olaylar gibi genel anılar hatırlanır. Aşırı genel otobiyografik bellek, azalan problem çözme yeteneği ve gelecekteki olayların hayal edilebilirliği ile ilişkilidir; bu, geçmiş yaşam olaylarını hatırlamadaki spesifiklik eksikliğinin, bilinçli farkındalığın kolayca erişilebileceği uygulanabilir olası eylemlerin 'bilişsel kümesini' kısıtladığını öne sürmektedir [93]. Depresif hastalardaki hafıza eksikliklerinin, hafıza oluşumu ve geri getirilmesindeki

anahtar rolü göz önüne alındığında, hipokampustaki nöroplastisite eksiklikleriyle doğrudan ilişkili olduğu uzun süredir varsayılmaktadır. Bununla birlikte, birden fazla PFK ve limbik bölge arasındaki bağlantıyı etkileyen devre düzeyindeki işlev bozuklukları, depresyonda gözlemlenen bilişsel bozuklukların genişliğini en iyi şekilde açıklayabilir ve toplu olarak bireyin sürekli değişen çevreye yanıt olarak esnek bir şekilde uyum sağlama kapasitesini toplu olarak azaltabilir.

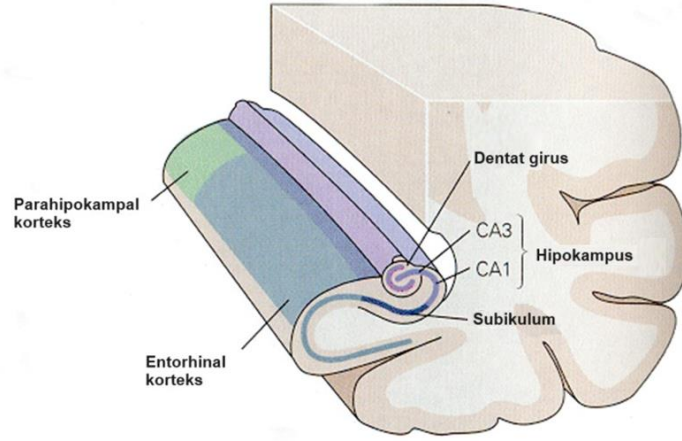
2.4. HİPOKAMPUS

Hipokampus, beynin geçmiş deneyimlerin hatırlanması ve geleceğin hayal edilmesi, öğrenme, hafıza ve mekânsal yön bulmada önemli bir rol oynadığı bilinen bir bölümdür. Hipokampus ayrıca duygusal davranışların düzenlenmesinde limbik sistemin bir parçası olarak da işlev görür. Limbik sistem, beynin derinlerinde yer alan “ilkel bir beyin” olarak kabul edilir. Açlık, motivasyon, cinsel dürtü, ruh hali, acı, zevk, iştah ve hafıza vb. ile ilgilidir. Hipokampus limbik lobun arka kısmıdır, ön kısmı ise amigdaladır. Bu nedenle epilepsi, alzheimer hastalığı ve depresyon gibi çoklu nörolojik bozukluklar hipokampus ile ilişkilidir [94].

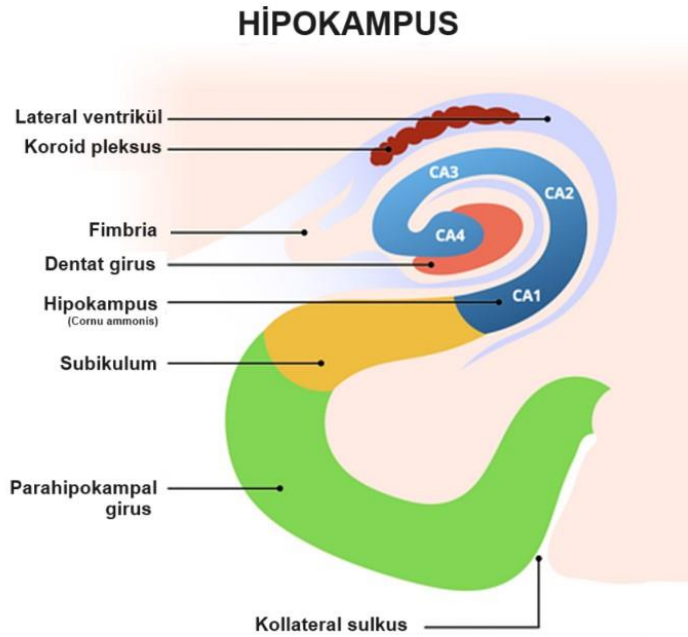
Hipokampus, deklaratif ve uzamsal belleğin işlenmesine ve geri çağırılmasına yardımcı olur. Deklaratif hafıza gerçekler ve olaylarla ilgili olanlardır. Kişinin bilincinde olduğu, başkalarına anlatabildiği, ifade edebildiği ve bildirebildiği bilgileri içermektedir. Uzamsal bellek ise yolları veya rotaları içerir. Ayrıca kısa süreli anılar hipokampusta uzun süreli anılara dönüştürülür. Bunlar daha sonra beynin başka yerlerinde depolanır [95].

Hipokampus iki bölümden oluşur: Cornu ammonis (CA) (gerçek hipokampus) ve dentat girus (DG). Bu parçaların her ikisi de hipokampal sulkus ile ayrılır ve birbirine doğru kıvrılır. Sulkusun altında subikulum bulunur. Hipokampus allokorteksin bir parçası olduğundan onu neokorteksten ayıran bir bölge vardır. Bazı anatomistler bunu hipokampusa uygun CA, DG, subikulum ve entorhinal kortekse (EC) ayırır (Şekil 2-2-4). Setin tamamına hipokampal formasyon denir. Hipokampus baş, gövde ve kuyruğa bölünmüştür; baş kısmı genişlemiş, kuyruk ise ince kavisli bir kısımdır. Histolojiye dayanarak, uygun hipokampus (Cornu ammonis) CA1, CA2 ve CA3 ve CA4'e bölünmüştür. CA1'in hemen karşısında, hipokampusu ventriküldeki entorhinal kortekse bağlayan subikulum bulunur (Şekil 2-2-5). Hipokampal ağ, bir devre oluşturan üç tip sinapstan oluşur. Uzamsal bir sinyal, hipokampusa girdi görevi görür ve dentat girustaki (DG) bir sinaps yoluyla CA3'e ve ardından başka bir sinaps yoluyla CA1'e

iletilir. Doğrudan CA1'e bağlanan paralel bir giriş yolu da mevcuttur. CA3, tekrarlayan (geribildirim) bir bağlantıya sahip farklı bir biyolojik sinir ağı ile karakterize edilir. Bu devrenin geçmiş anıları şimdiki zamana dönüştürdüğü düşünülmektedir [96].



Şekil 2-2-4:Hipokampusun anatomisi [94].



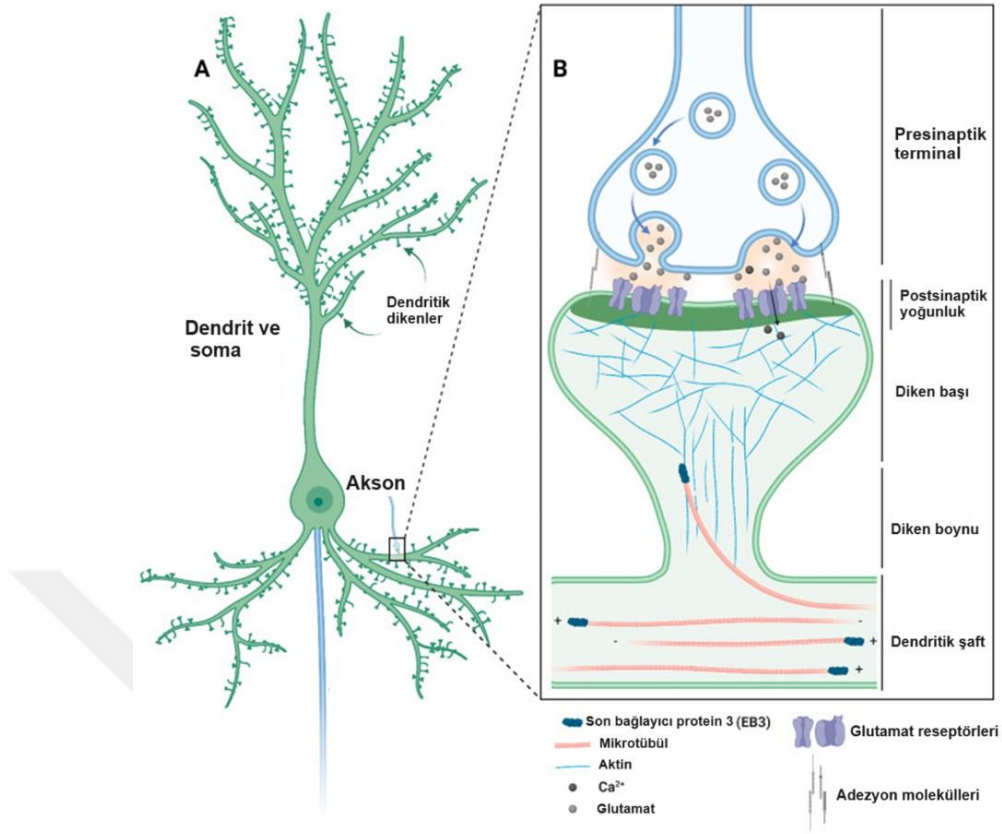
Şekil 2-2-5: Hipokampusun anatomisi [97].

Hipokampus, beyindeki hem anatomik hem de fizyolojik olarak serebral korteksten farklı olan eski bir yapıdır. Farklı hücreler hipokampus katmanlarında düzenlenir ve bu nedenle nörofizyoloji açısından en kapsamlı şekilde beyin incelenen kısmıdır. LTP olarak da bilinen hafızanın sinirsel substratı ilk olarak bu bölgede keşfedilmiştir.

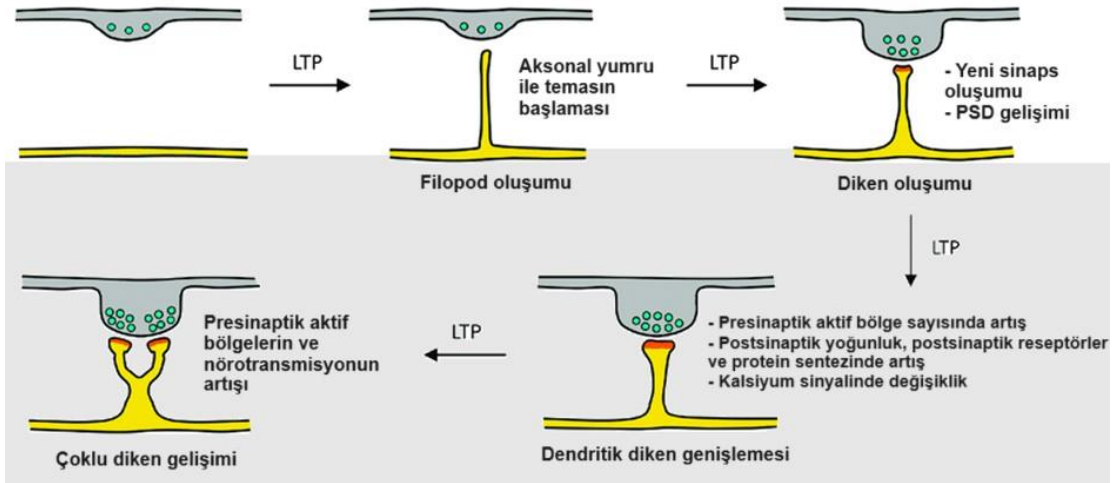
2.4.1. ÖĞRENME VE BELLEK MEKANİZMASI

Sinaptik plastisite çoğunlukla hipokampustaki iki farklı uyarıcı nöron grubunu birbirine bağlayan Schaffer-kollateral yolağın sinapslarından gelen elektriksel yanıtların kaydedilmesiyle incelenir [98]. Bu sinapslarının birkaç saniye boyunca 10 ila 100 Hz arasındaki bir frekansta tekrarlanan aktivasyonu, genellikle LTP olarak adlandırılan ve aktive edilen sinapsların boyutunun arttığı ve postsinaptik membranı etkili bir şekilde depolarize eden bir süreci başlatır. Buna karşılık, bu sinapsların 1 ila 5 Hz arasındaki daha düşük bir frekansta birkaç dakika boyunca aktivasyonu, genellikle uzun süreli baskılama (LTD) adı verilen bir süreci başlatır; burada aktive edilen sinapsların boyutu azalır ve postsinaptik membranı daha az etkili bir şekilde depolarize eder [99]. Sinapsların gücündeki değişiklik, uyarının ne sıklıkta tekrarlandığına bağlı olarak saatlerce veya ömür boyu sürebilir.

Dendritik dikenler, dendritlerin üzerinde yer alan küçük çıkıntılı yapılardır ve sinaptik bağlantılarla ilişkilidir (Şekil 2-2-6). Bu dikenler dendritlerin yüzeyinde çok sayıda bulunur. Örneğin, hipokampal CA1 bölgesindeki tek bir piramidal nöron 30.000 kadar dendritik dikene sahiptir. Uyarıcı sinapsların çoğunluğu bu dendritik dikenlerin yüzeyinde oluşur [100]. Memeli merkezi sinir sisteminde uyarıcı sinaptik etkileşimin birincil bölgelerinin dendritik dikenlerde olduğu görülmektedir. Dendritik dikenlerin LTP için depolama alanları olarak işlev gördüğü ve elektriksel potansiyellerin nöronun hücre gövdesine iletilmesine yardımcı olduğu bilinmektedir. Tek bir nöronun dendritleri yüzlerce hatta binlerce diken içerebilir. Dendritik dikenler genellikle aksonlardan uyarıcı girdi alır, ancak bazen aynı dendritik diken üzerinde hem engelleyici hem de uyarıcı bağlantılar yapılır. Bellek depolama ve sinaptik iletim için potansiyel bir anatomik substrat sağlayan dikenlere ek olarak, nöronlar arasındaki olası temasların sayısını da artırabilirler. Sinaptik plastisite sırasında, dendritik dikenlerin sayısı ve şekilleri radikal yeniden yapılanmalara uğrar. LTP indüksiyonu, yeni dikenlerin oluşumunu ve stabilizasyonunu desteklerken, LTD bunların kaybına neden olur [101] (Şekil 2-2-7).



Şekil 2-2-6: Polarite proteinleri: Dendritik dikenlerin yapısı [102].

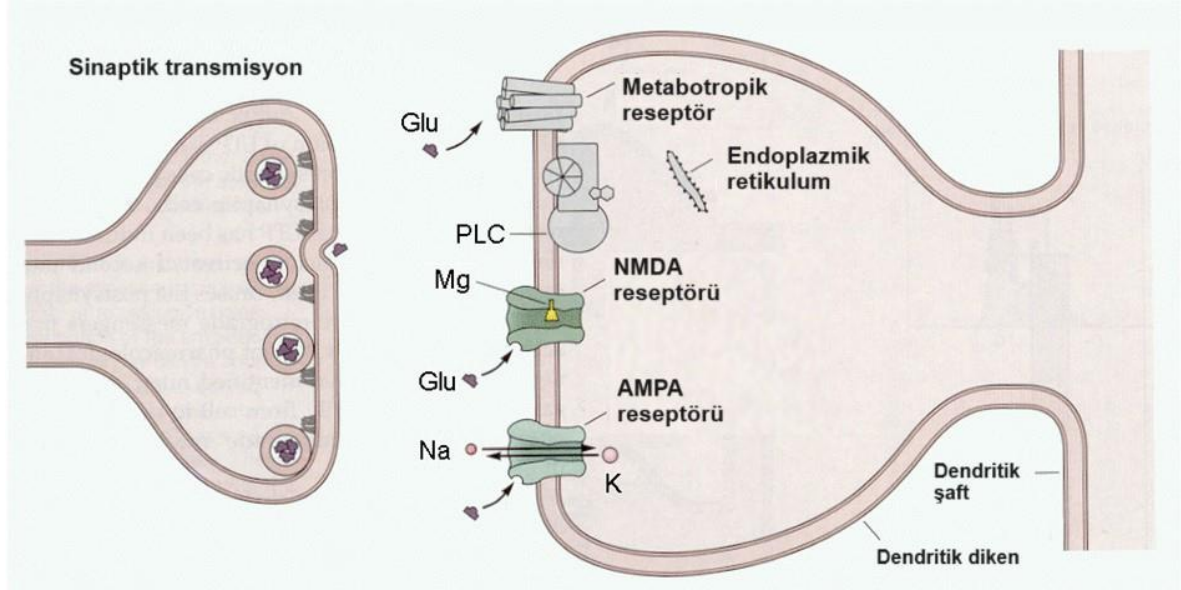


Şekil 2-2-7: LTP'nin morfojenik etkileri. Dendritik dikenler aktiviteye bağlı bir şekilde filizlenir ve morfolojilerini değiştirir [103].

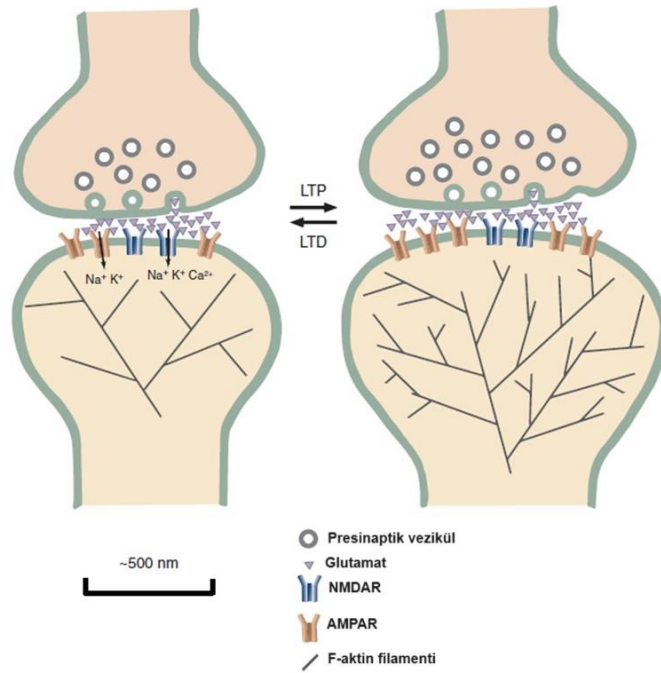
Merkezi sinir sisteminin temel eksitator nörotransmitteri olan glutamat, postsinaptik hipokampal nöron üzerindeki birkaç farklı alt tipteki reseptörlerine bağlanır. Glutamat reseptör alt tiplerinden ikisi, AMPA (α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptor) ve NMDA reseptörleri, LTP için özellikle önemlidir. NMDAR'lar ve AMPAR'lar arasındaki

önemli fark, kanallarından akan iyonların karışımıdır. AMPAR'ların çoğu yalnızca depolarizasyona neden olan sodyum ve potasyum iyonlarının geçişine izin verir. Bunun tersine kalsiyum, sodyum ve potasyum ile NMDAR kanallarından geçer ve ikinci haberci olarak görev yapar [104]. NMDAR'lar, kısmen magnezyumun kanala girip çıkması ve kısmen de herhangi bir protein kanalının açılıp kapanmasının doğası gereği değişken olması nedeniyle, kanalın kısa patlamalarla açıldığı birkaç milisaniye boyunca aktif kalır. Sonuç olarak kalsiyum, onlarca milisaniye boyunca düzensiz patlamalarla nörona akar ve kalsiyum-ATPazlar ve sodyum/kalsiyum değiştiriciler tarafından hızla dışarı pompalanır [94].

NMDA reseptörü aktive edildiğinde kalsiyum iyonlarının postsinaptik hücreye alınmasını sağlar. Ancak hücre dinlenme potansiyelindeyken kalsiyum kanalı magnezyum iyonları (Mg^{2+}) tarafından bloke edilir, böylece glutamat reseptöre bağlansa bile kalsiyum nörona giremez. Bu magnezyum iyonlarının kanaldan çekilmesi için dendritin membran potansiyelinin depolarize olması gerekir. LTP'ye neden olan yüksek frekanslı uyarım sırasında post-sinaptik nöron, AMPA reseptörlerinin sürekli aktivasyonunun ardından depolarize olur. Magnezyum daha sonra NMDA reseptörlerinden çekilir ve çok sayıda kalsiyum iyonunun hücreye girmesine izin verir. Dendritteki bu artan kalsiyum konsantrasyonu, sinapsı uzun bir süre daha verimli hale getiren çeşitli biyokimyasal reaksiyonları başlatır [99] (Şekil 2-2-8). Daha yüksek frekanslı, daha büyük genlikli kalsiyum akışı, sonraki 15-60 saniye içinde dikensi çıkıntılardaki sinapsta iki önemli moleküler değişikliğe yol açar. Postsinaptik membrana daha fazla AMPAR eklenir ve sonraki sinaptik aktivasyon üzerine dikensi çıkıntılardaki eksitator post sinaptik potansiyelin (EPSP) boyutu artar. Aynı zamanda dikensi çıkıntıya şeklini veren aktin hücre iskeleti yeniden şekillenerek daha büyük ve daha dallanmış bir hücre iskeleti üretilir. Buna karşılık, daha düşük frekans, daha düşük genlik, ancak daha uzun süreli kalsiyum akışı omurga üzerinde ters etki yaratır. Postsinaptik membrandaki AMPAR'ların sayısı azalır, bu da daha sonraki aktivasyonda daha küçük bir EPSP ile sonuçlanır ve aktin hücre iskeleti küçülerek daha küçük bir dikensi çıkıntı bırakır [105] (Şekil 2-2-9).



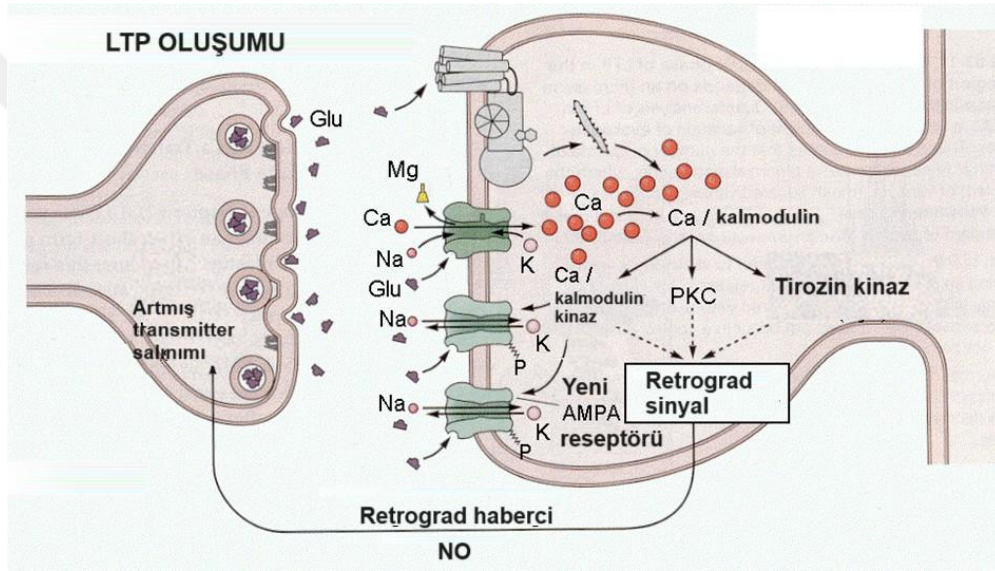
Şekil 2-2-8: Düşük frekanslı iletim sırasında glutamat, NMDA, AMPA ve metabotropik reseptörlerle etkileşime girer [94].



Şekil 2-2-9: Sinaptik plastisite [99].

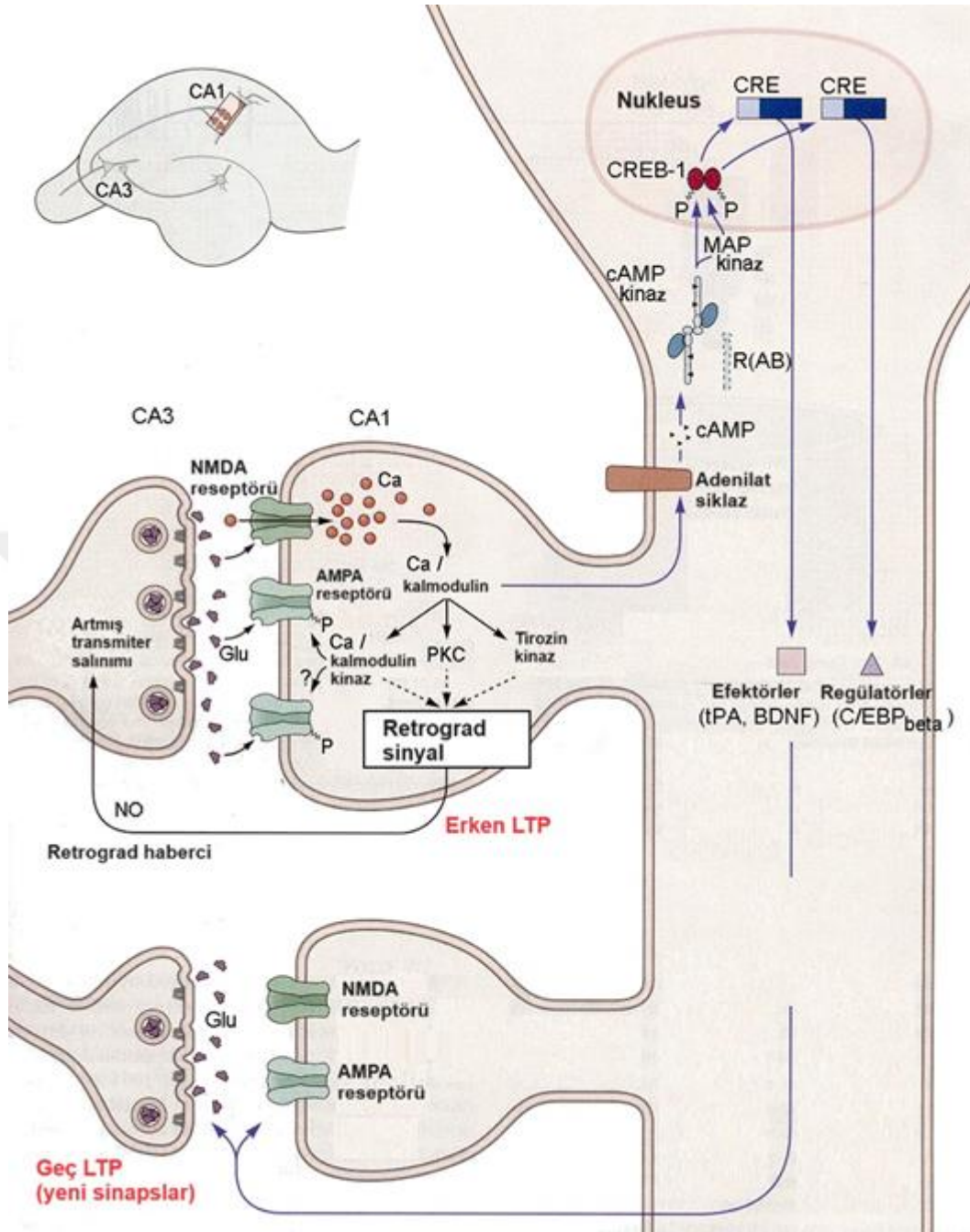
Kalsiyum iyonları, birçok enzimin konformasyonunu değiştirerek aktive eden son derece önemli hücre içi habercilerdir. Bu enzimlerden biri, dört kalsiyum iyonu bağlandığında aktif hale gelen kalmodulindir. Daha sonra LTP'nin ana ikinci habercisi olan Ca^{2+} /kalmodulin haline gelir. Ca^{2+} /kalmodulin daha sonra bu süreçte anahtar rol oynayan adenilat siklaz ve Ca^{2+} /kalmodulin bağımlı protein kinaz II (CaM kinaz II) gibi diğer enzimleri aktive eder. Bu

enzimler, genellikle onlara bir fosfat iyonu ekleyerek diğer moleküllerin uzaysal konformasyonunu değiştirir. Bu yaygın katalitik süreç fosforilasyon denir. Aktive edilmiş adenilat siklaz, siklik adenozin mono-fosfat (cAMP) üretir ve bu da başka bir protein olan kinaz A'nın (PKA) aktivitesini katalize eder. PKA, AMPA reseptörlerini fosforile ederek glutamat onlara bağlandıktan sonra daha uzun süre açık kalmalarını sağlar (Şekil 2-2-10). Sonuç olarak, postsinaptik nöron daha da depolarize olur ve böylece LTP'ye katkıda bulunur. Protein kinaz A'nın başka bir hedefi CREB (cAMP cevap elemanı bağlayıcı protein) proteinidir. CREB, gen transkripsiyonunda önemli bir rol oynar ve bunun aktivasyonu, sinaptik verimliliği daha da artırabilen yeni AMPA reseptörlerinin aktivasyonuna yol açar [99].



Şekil 2-2-10: Yüksek frekanslı uyarım ile LTP oluşumu [94].

LTP'nin oluşumunda yer alan tüm postsinaptik mekanizmalara ek olarak, takip eden süreçte presinaptik değişikliklerin meydana geldiği de bilinmektedir. Bu değişiklikler presinaptik nöron tarafından salınan glutamat miktarındaki artışı kapsar ve bu mekanizma presinaptik nörona geri dönen ve glutamat salınımını arttıran bir haberci olan, doğal halinde gaz formunda bulunan nitrik oksit (NO) varlığına işaret etmektedir. Hücre içi artan Ca^{+2} nitrik oksit sentaz (NOS) enzimini aktive ederek membrandan kolayca difüze olan NO'nun oluşumuna sebep olmaktadır. Presinaptik alana ulaşan NO, veziküllerin membrana bağlanmasını artırarak presinaptik uçtan daha fazla glutamat salınmasına neden olarak postsinaptik hücrede daha büyük ve uzun süreli eksitator yanıt oluşturmaktadır [94] (Şekil 2-2-11).



Şekil 2-2-11: Geç LTP oluşumu için protein sentezinde değişiklikler ve yeni sinaptik bağlantıların oluşumu da gereklidir [94].

2.4.2. Depresyon, Hipokampus ve Prefrontal Korteks İlişkisi

Hipokampus, mekansal ve bağlamsal işleme, hafıza ve duygusal işleme dahil olmak üzere çeşitli işlevlerde rol oynarken prefrontal korteks çalışma belleği, zamansal işleme, karar verme, esneklik ve hedefe yönelik davranış dahil olmak üzere yürütme işlevine hizmet eden çok sayıda bilişsel işleve katılır [106].

Hipokampusun bir kısmı medial prefrontal kortekse çıktılar gönderir. Medial PFK'nin çıktıları perirhinal ve lateral entorhinal kortekse geri gönderilir; bu sayede medial PFK 'ne' akışındaki olay bilgilerinin alınmasını önleyebilir veya seçebilir. Ayrıca talamustan (nucleus reuniens) geçerek doğrudan hipokampusa giden subkortikal bir yol da vardır; bu yol aracılığıyla prefrontal korteks, hafızayı geri getirmenin özgüllüğünü kontrol edebilir. Hipokampal-PFK yolu olarak adlandırılan nöronların bir projeksiyonu, hipokampal formasyondan PFK'ye ana efferent anatomik bağlantıyı içerir. Bu yolun aktivitesi, depresyon, şizofreni ve anksiyete bozukluklarının semptomlarını hızlandıran önemli bir faktör olan strese karşı oldukça hassastır. Yol aynı zamanda amigdala ile de önemli etkileşimlere sahiptir ve kemirgenlerde H-PFK yolunun yürütücü işlev ve duygusal düzenlemeye hizmet eden bağlamsal işlemlerde rol oynadığına dair güçlü kanıtlar vardır. Genetik faktörler ve stres bu süreçlerin düzenini bozabilir ve böylece hipokampal oluşum ile PFK arasındaki anormal işlevsel eşleşmeye katkıda bulunabilir; bu da bir dizi psikiyatrik bozuklukta yaygın olan biliş ve duygusal düzenleme eksikliklerine katkıda bulunur [107].

Depresyon ile ilgili yapılan çalışmalar PFK, hipokampus, amigdala, ventral tegmental alan-nukleus akumbens dopamin sistemi ve HPA eksenine odaklanmıştır. Amigdala ve hipokampus depresyonla en fazla ilişkilendirilen beyin bölgeleridir. Son yıllarda depresyonda beyin yapısı ve işlevinin değiştiği ve PFK ile hipokampusun hacminin küçüldüğü ileri sürülmektedir [108]. Hacim azalmasının boyutu hastalığın süresi, tedavi süresi ve depresyonun şiddeti ile ilişkilidir. Yapılan çalışmalar aynı zamanda depresyonlu deneklerin PFK'sinde sinaps sayısının azaldığını da göstermektedir. Deney hayvanlarında yapılan çalışmalar, kronik strese maruz kalmanın PFK ve hipokampusta atrofiye ve nöron ve glia hücrelerinin kaybına neden olduğunu kanıtlamıştır [109].

2.5. DENEYSEL DEPRESYON MODELLERİ

İnsanlardaki depresyon semptomlarını mükemmel bir şekilde yansıtan bir hayvan modeli tasavvur etmek son derece zordur. Hayvanlarda benlik bilinci, depresif ruh hali, düşük özsaygı veya intihar eğilimi gibi depresyonun ayırt edici özellikleri saptanamaz. Bununla birlikte, diğer zihinsel bozukluklar gibi depresyon da bir takım fizyolojik, davranışsal, endokrinolojik ve nöroanatomik değişikliklerle karakterize edilir ve deney hayvanlarında bu semptomlar saptanabilir. Deney hayvanları üzerinde en sık kullanılan depresyon modelleri; monoaminlerin presinaptik depolarını boşaltan rezepin uygulanması, dopamin agonisti olan apomorfinin yüksek dozda uygulanması, 5- Hidroksitriptofan uygulanması, zorunlu yüzme testi, olfaktör bulbektomi, neonatal stres, sosyal izolasyon, hareket kısıtlama stresi, öğrenilmiş çaresizlik ve kronik öngörülemeyen hafif stres modelidir [110].

Deney hayvanlarında depresyonun temel semptomları olan anhedoni, kilo/iştahta değişiklikler ve psikomotor değişiklikler çeşitli testler ile değerlendirilebilir. Davranışsal açıdan, depresif ruh hali insanlarda genellikle sosyal geri çekilme, yavaş yürüme ve ilgisizlik ile ifade edilir. Tam anlamıyla eşdeğer olmasa da deney hayvanlarında ilgisizlik sosyal geri çekilmeye, yavaş yürüyüş ise psikomotor geriliğe karşılık gelebilir [111].

2.5.1. Deney Hayvanlarında Depresyon Doğrulama Testleri

2.5.1.1. *Anhedoni*

Deney hayvanlarında genel olarak anhedoni, lezzetli solüsyonlar veya yiyecekler kullanılarak değerlendirilir. Bunun iki örneği, hayvanların musluk suyu veya sükröz içeren su arasında seçim yaptığı sükröz tercih testi ve normal peletler yerine çikolatalı kurabiye arasında seçim yaptığı kurabiye testidir. Normal hayvanlar, lezzetli yiyecek/çözelti tercihi gösterirken, anhedonik hayvanlarda lezzetli yiyecek tercihi önemli ölçüde azalır [111].

2.5.1.2. *Çaresizlik*

Umutsuzluğa benzer davranışların değerlendirilmesine yönelik yaygın testler arasında zorunlu yüzme ve kuyruktan asılı kalma testleri yer alır. Her iki test de kemirgeni kaçmanın imkânsız olduğu rahatsız edici bir duruma (bir su tankı veya hayvanın kuyruğundan asılı olduğu bir pozisyon) yerleştirmeyi içerir. Başlangıçta hayvanlar aktif davranışlar sergilerler (yüzme veya mücadele etme). Ancak bu durum kaçınılmaz olduğundan, bir noktada hayvanlar hareketsizlik nöbetleri göstermeye başlar ve bu durum giderek artar [111].

2.5.1.3. Apati

Apati, hedefe yönelik davranışlarda bir eksiklik olarak tanımlanmıştır. Kemirgenlerde bunu değerlendirmek için beş farklı ölçüm önerilmiştir; bunlar arasında yuva yapımının bozulması, kişisel bakımın bozulması, anne bakımının azalması, sosyal ilginin azalması ve yeni nesnelere olan ilginin azalması yer almaktadır [112].

2.5.1.4. Anksiyete

Kemirgenlerde kaygıya bağlı davranışları değerlendirmek için birçok cihaz tasarlanmıştır. Bunlardan en sık kullanılanı kemirgenin yeni bir ortamla karşılaştırılması (örneğin açık alan, yükseltilmiş artı labirent, aydınlık/karanlık kutu veya serbest keşif testi) ve hayvanın yeni bir ortama yerleştirilmesi testleridir.

2.5.1.5. Kognitif Fonksiyonlarda Bozukluk

Mevcut tedavilerin çoğu duygudurum düzensizliğine odaklansa da bilişsel işlev bozukluğu depresif bozuklukta temel bir patolojik özelliktir. Depresif hastalarda ve deney hayvanı modellerinde dikkat ve esneklik eksikliklerinin yanı sıra bellek bozuklukları ve öğrenme güçlükleri de sıklıkla görülmektedir [113].

Uzamsal hafızayı ve öğrenmeyi test etmeye yönelik standart paradigmlar arasında Morris su labirent (MWM) testi sıklıkla deneysel depresyon modellerinde kullanılır [114]. MWM'de deney hayvanlarına suyun altına gizlenmiş bir platformun konumunu öğretilir; bu da hipokampusu bağı hafızayı değerlendirmek için kullanılır. Çalışma belleğine yönelik en yaygın testlerden biri, kemirgenlerin yeni ortamları keşfetmeye yönelik doğal eğilimine dayanan Y labirentidir. Bu test olumlu veya olumsuz pekiştiriciler içermez ve çok az strese neden olur.

2.5.2. Kronik Öngörülemeyen Hafif Stres Modeli

Depresif dönemleri tetiklediği veya tetiklediği bilinen en güçlü faktörler arasında öngörülemeyen stresli yaşam olayları yer almaktadır. Kronik öngörülemeyen hafif stres (KÖHS) modelinin kökeni, Katz ve meslektaşları tarafından 1980'lerin başında yayınlanan ve sıçanların çeşitli ve şiddetli stres faktörlerine sırayla maruz bırakıldığı bir dizi çalışmaya dayanmaktadır. Ancak Katz ve meslektaşları tarafından tanımlanan prosedürde yapılan bir değişiklik sonucu kullanılan stres etkenlerinin şiddeti büyük ölçüde azaltılmıştır. Bu değişiklik, etik nedenlerden dolayı ve yakın zamanda Birleşik Krallık'ta hayvan araştırmalarının çerçevesini sıkılaştıran ve mümkün olan her yerde stresin en aza indirilmesine vurgu yapan Hayvan Yasası (1986) bağlamında yapılmıştır. Sonuç olarak, başlangıçta geliştirilen KÖHS

sisteminin aksine yeni sistem, yoğun ayak şoku, soğuk suya daldırma veya uzun süreli (48 saat) yiyecek ve su yoksunluğu gibi ciddi stresli unsurların hiçbirini içermemektedir [115].

Günümüzde kullanılan modelde hayvanlar, aydınlık-karanlık döngüsünün bozulması, sosyal izolasyon, ıslak talaş, eğik kafes, kalabalık kafes, yem ve su kısıtlaması gibi bir dizi hafif stres etkenine farklı döngülerle art arda maruz bırakılmaktadır. KÖHS modelini sıçanlarda kullanan ilk araştırmacı grubu, 9 haftalık maruziyetten sonra sükröz tercihinin belirgin ölçüde azaldığını, trisiklik bir antidepresanla 2-4 haftalık tedavi sonucunda sıçanların eski haline döndüğü rapor etmiştir [116].

KÖHS modelinin depresyon çalışmalarında kullanım sıklığının artması KÖHS etkilerinin altında yatan fizyolojik mekanizmalar ile klinik depresyon arasındaki paralellikleri araştıran kapsamlı bir literatürün ortaya çıkmasına neden olmuştur. 2010 yılına kadar KÖHS modeli ile yapılan çalışmalar değerlendirildiğinde, deney hayvanlarındaki nörobiyolojik değişikliklerin klinik popülasyonla paralel olduğu tespit edilmiş ve bu modellemenin kullanılmasının tamamen güvenli olduğuna karar verilmiştir. Bu değişiklikler kortikal β -adrenoreseptörlerin up-regülasyonu, hipotalamusun paraventriküler nukleusta CRH ekspresyonunda artış, kortikal ve hipokampal BDNF ekspresyonunda azalmalar gibi birtakım belirteçleri kapsamaktadır [117].

2.6. RENİN-ANJİYOTENSİN SİSTEMİ

Renin-anjiyotensin sistemi, kan basıncının düzenlenmesinde, vücudun sıvı ve elektrolit dengesinin sağlanmasında önemli rolü olan sistemlerden biridir [118]. Böbreğin afferent arteriollerinde bulunan jukstaglomerüler hücreler (JGH) prorenin içerir. JG hücrelerinin aktivasyonu prorenin'in renin'e dönüşmesine neden olur. Prorenin aktivasyonu böbrekte prokonvertaz 1 ve katepsin B gibi enzimler tarafından meydana gelir. Olgun renin, JG hücrelerinin granüllerinde depolanır ve dört ana uyararla dolaşıma salınır. Bunlar:

1. Afferent arteriyollerin duvarındaki mekanoreseptörler tarafından algılanan renal perfüzyondaki azalma,
2. Makula densaya ulaşan sodyum konsantrasyonunun azalması,
3. JG aygıt hücrelerinde beta-1 adrenerjik reseptörler yoluyla sempatik aktivitenin artması,

4. Potasyum ve atriyal natriüretik peptid (ANP) gibi hümoral faktörlerin negatif geri bildirim yapmasıdır.

Bu nedenle, böbrek perfüzyonunun azalmasına ve tübüler sodyum içeriğinin azalmasına yol açan koşullar, reninin kan dolaşımına salınmasına yol açar. Renin aktivitesinin dolaşımdaki yarı ömrü 10-15 dakikadır [118]. Renin RAS'ın hız sınırlayıcısıdır.

Renin, karaciğer tarafından sentezlenen ve salgılanan anjiyotensinojenin N-terminalini böler ve anjiyotensin I (ang I) oluşumuna yol açar. Anjiyotensin I'in bilinen herhangi bir biyolojik aktivitesi yoktur. Monokarboksipeptidaz ACE, His-Leu dipeptidini Ang I'in C-terminal kısmından uzaklaştırarak onu bu klasik eksenin ana peptidi olan Ang II'ye dönüştürür. Tonin, kimaz ve katepsin G gibi diğer enzimler de bu dönüşümü gerçekleştirebilmektedir. ACE, esas olarak pulmoner dolaşımda olmak üzere vasküler endotel hücrelerinin plazma membranlarında eksprese edilir. ACE, anjiyotensin II'yi oluşturmak için anjiyotensin I'in C terminalindeki iki amino asidi ayırır [119].

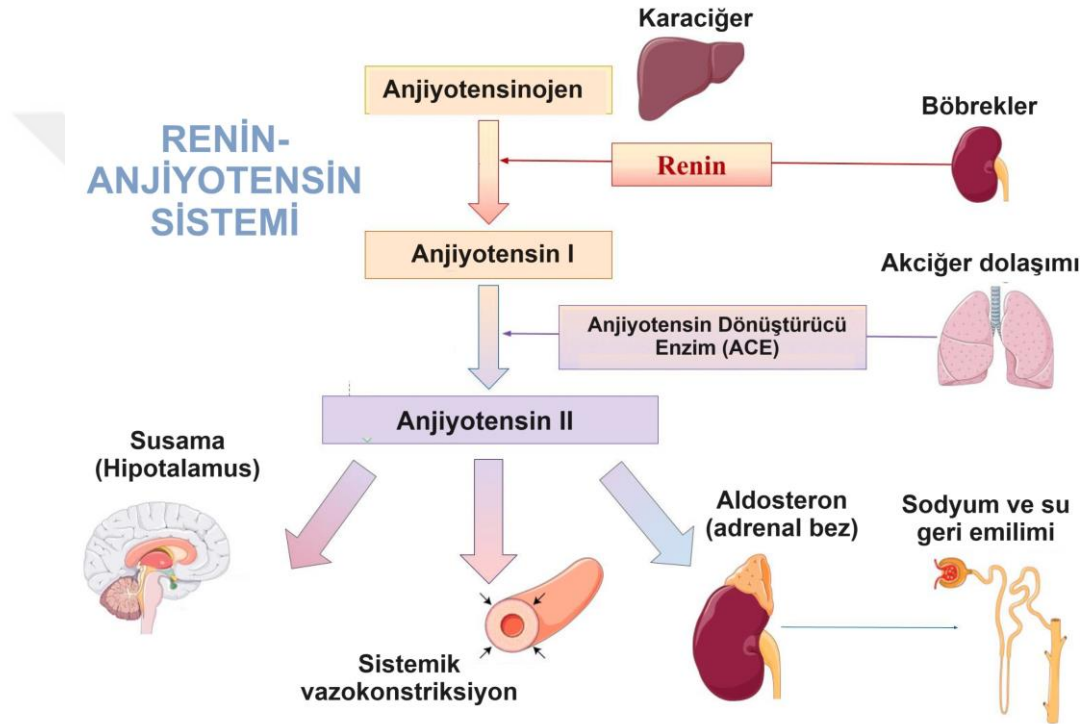
Anjiyotensin II, RAS'ın kan basıncı, vücut sıvı hacminin düzenlemesi, vazokonstriksiyon ve aldosteron sekresyonu gibi bilinen fizyolojik etkilerini meydana getiren esas peptittir (şekil 2-2-12). Anjiyotensin II'nin dolaşımdaki yarı ömrü çok kısadır, 60 saniyeden azdır. Peptidazlar onu anjiyotensin III ve IV'e indirger. Anjiyotensin II'nin aynı zamanda birçok patofizyolojik durumda da rol oynadığı ve oksidatif stresi, vasküler düz kas kasılmasını, endotel disfonksiyonunu, fibrozisi ve hipertrofik, anti-apoptotik ve pro-mitojenik etkileri indüklediği bilinmektedir. Anjiyotensin II'nin bu etkiler yoluyla hipertansiyon, aterosklerotik hastalık, kalp yetmezliği ve böbrek hastalığının patogenezinde rol oynadığı gösterilmiştir [120]. Anjiyotensin II'nin fizyolojik ve patofizyolojik etkilerine iki tip reseptör aracılık eder: Anjiyotensin tip 1 reseptörü (AT1R) ve anjiyotensin tip 2 reseptörü (AT2R). Bu reseptörlerin farklı ve çoğunlukla zıt fizyolojik etkileri vardır.

2.6.1. Anjiyotensin Tip 1 Reseptörü

AT1-R, G-proteinine bağlı bir reseptördür. Kalp, damar sistemi, böbrek, adrenal bezler, hipofiz ve merkezi sinir sistemi dahil olmak üzere birçok hücre tipinde yaygın olarak dağılmıştır. Anjiyotensin II, AT1R yoluyla vazokonstriksiyon ve sodyum ve suyun geri emilimini gerçekleştirir. Patolojik durumlarda AT1R'nin aktivasyonu inflamasyona, fibroze, oksidatif strese, doku yeniden modellenmesine ve kan basıncında artışa yol açar. Bu reseptörün düzensizliği, kalp ve böbrek hastalıklarının patofizyolojisinde merkezi bir rol oynar [121].

2.6.2. Anjiyotensin Tip 2 Reseptörü

AT2R de G-proteinine bağlı bir reseptördür. Esas olarak fetal dokularda eksprese edilir ve yetişkinlikte ekspresyonu azalır. Yetişkinlerde kalp, böbrek, adrenal bezler ve beyinde dağılır. AT2-R, AT1-R aracılığıyla anjiyotensin II'nin karşıt ve koruyucu etkilerine aracılık eder. Bu etkiler inflamasyonu, fibrozu ve merkezi sempatik çıkışı engeller ve vazodilatasyona neden olur. AT2R'nin anjiyotensin II tarafından uyarılması, AT1R aracılığıyla anjiyotensin II'nin neden olduğu vazokonstriksiyon ve anti-natriürezin tersine, vazodilatasyon ve natriüreze yol açar [121].



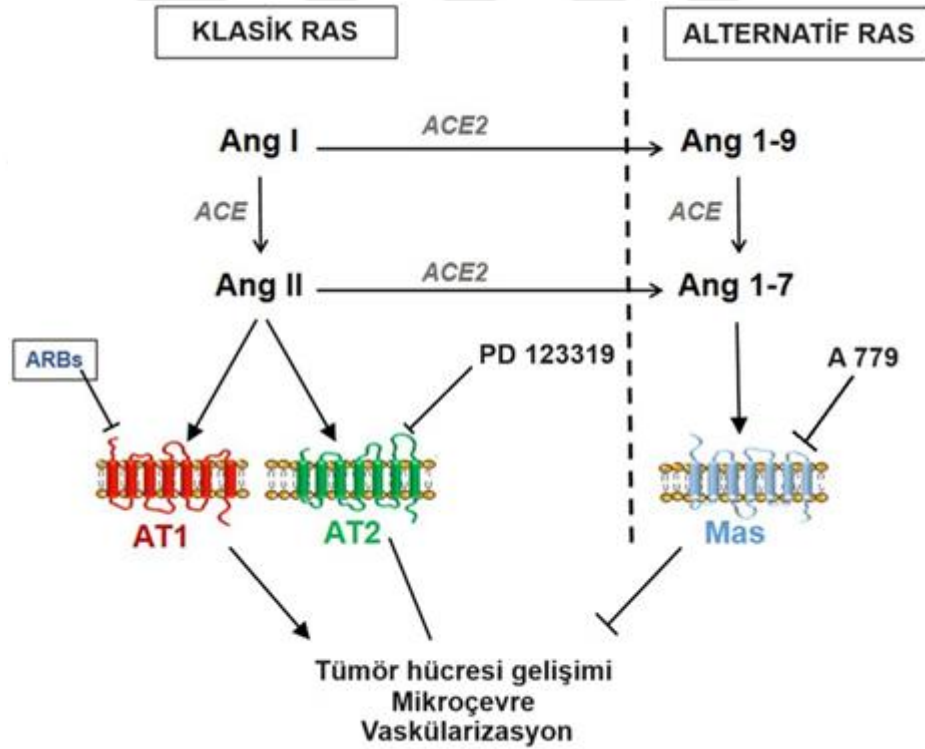
Şekil 2-2-12: Renin-Anjiyotensin Sistemi [122].

2.6.3. Alternatif Renin Anjiyotensin Sistemi

Ang II, RAS sisteminin biyolojik olarak aktif ana peptidi olmasına ve AT1R ve AT2R'ler ile etkileşimi yoluyla kan damarlarında, kalpte, beyinde ve böbrekte merkezi rollere sahip olmasına rağmen, çeşitli çalışmalar, farklı peptitler, enzimler ve reseptörler ile daha karmaşık, klasik eksenden farklı alternatif bir RAS'ın varlığını ortaya çıkarmıştır. Gen ekspresyon çalışmaları RAS'ın tüm bileşenlerine ait genlerin birçok dokuda mRNA ekspresyonunu ve regülasyonunu göstermiş, bu da lokal Ang II sentezinin olasılığını ortaya çıkarmıştır. Bunun sonucunda “yerel” veya “doku” renin anjiyotensin sistemleri kavramları doğmuştur. Yapılan

çalışmalar sistemik RAS ve doku düzeyindeki RAS'ın bağımsız hareket etmediğini, birden fazla düzeyde etkileşime girebileceğini ortaya koymuştur [122].

Günümüzde RAS, protein ve peptit bileşenleri esasen her organda eksprese olabilen ve renal, nöronal, kardiyak, pankreatik, vasküler, adrenal, hipofiz, bilişsel, yaşlanma, inflamasyon gibi çok sayıda fizyolojik olayda rol oynayan bir doku sistemi olarak ifade edilmektedir. Bununla birlikte, normalde renal hemodinamik ve tübüler yolla arteriyel basıncın korunmasıyla ilişkili ACE-Ang II-AT1R ekseninden farklı fonksiyonel özelliklere sahip alternatif bir RAS'a dair çok büyük kanıtlar mevcuttur. Klasik yolak olarak bilinen ACE/AngII/AT1R ekseninin birçok etkisini dengeleyen bir ACE2/anjiyotensin-(1-7) /Mas koruyucu ekseninin keşfi, bu sistemin karmaşıklığını bir kez daha vurgulamıştır (Şekil 2-2-13). 1988'de Santos ve diğ. Ang-(1-7)'nin ACE'den bağımsız bir yolla oluşumunu keşfetmiş ve Schiavone ve diğ. (2018) bu heptapeptidin nöral doku eksplantlarında vazopressin salınımına sebep olduğunu göstermiştir. Bir yıl sonra Ang-(1-7)'nin ilk in vivo etkileri tanımlanmıştır [123].

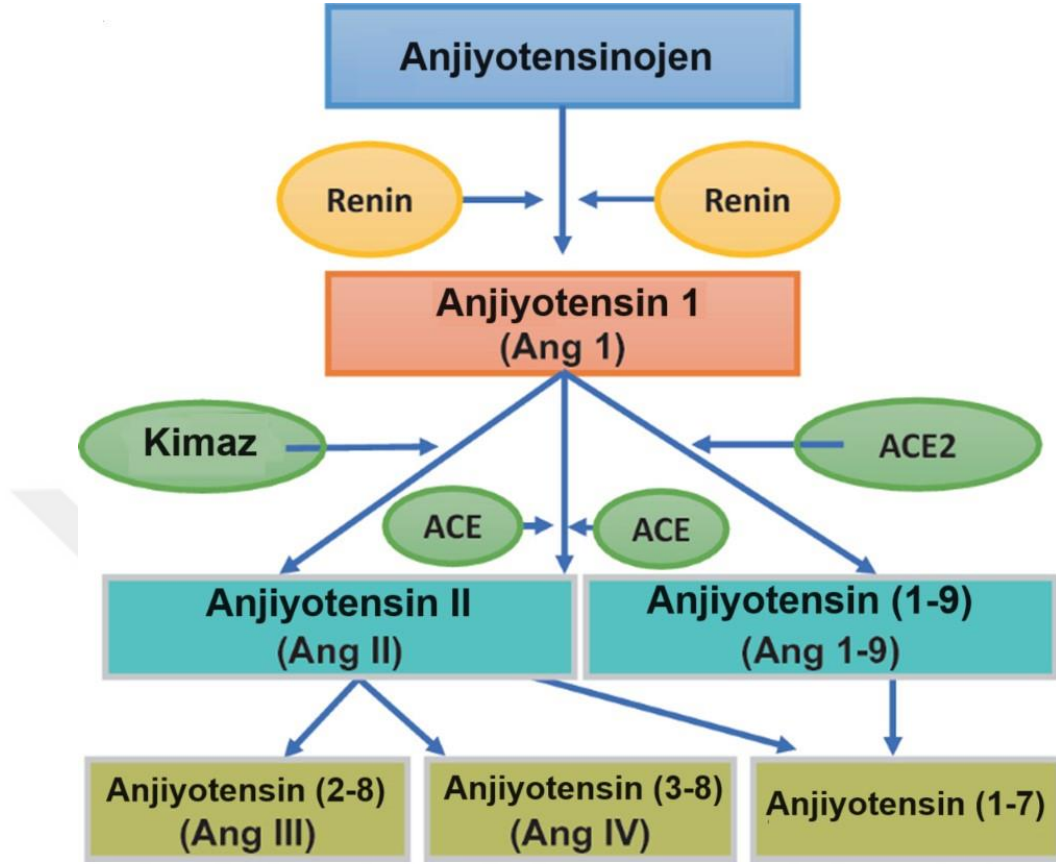


Şekil 2-2-13: Klasik ve Alternatif RAS Eksenleri [124].

2.6.4. ACE2/Anjiyotensin-(1-7) /MasR Eksen

Anjiyotensin-(1-7), anjiyotensin dönüştürücü enzim 2 (ACE2) veya prolil-endorpeptidaz ve prolil-karboksipeptidaz dahil diğer peptidazlar tarafından doğrudan Ang II'den oluşturulabilen bir heptapeptittir. ACE2 ayrıca Ang I'i anjiyotensin-(1-9) [Ang-(1-9)]'a dönüştürerek Ang-(1-7)'yi oluşturabilir. Anjiyotensin (2-8) (Ang III) ve anjiyotensin-(3-8) (Ang IV) gibi diğer anjiyotensin peptidleri de RAS içerisinde oluşturulabilir ve biyolojik etkiler üretebilir (Şekil 2-2-14). 2003 yılında Santos ve ark. Mas reseptörünü (MasR) Ang-(1-7) için fonksiyonel reseptör olarak tanımlamıştır. Bu reseptör de AT1R ve AT2R gibi G proteinine bağlı reseptör ailesine aittir. Mas reseptörü damar endotel hücrelerinde, makrofajlarda ve nöronlarda yaygın dağılım göstermektedir [124].

Ang 1-7, kan damarlarının vazodilatasyonu, anti inflamatuvar prostaglandinlerin sentezinin uyarılması ve NO salınımı artırması nedeniyle klasik RAS'a zıt olarak arteriyel kan basıncını düşürür. In vitro çalışmalar, Ang (1-7)'nin sıçan aortuna uygulanmasının, Ang II ile uyarılan ROT üretimini önlediğini, NO salınımını artırarak vazodilatasyonun artmasına neden olduğunu ve endotelial oksidatif stresi azalttığını göstermektedir [125]. Ang 1-7 ayrıca kardiyomiyositlerin çoğalmasını ve hipertrofisini sınırlandırarak kalp kası üzerinde olumlu bir etkiye sahiptir. Peptit, koroner damarların yenilenmesini ve yeniden şekillenmesini önemli ölçüde etkiler. Böbrekler üzerindeki etkiler arasında sodyum taşınmasının düzenlenmesi ve glikoz emilimindeki artış yer alır. Ang 1-7 lipid metabolizmasını düzenleyebilir ve insülin direncine karşı koruma sağlayabilir [126]. Santral Ang-(1-7), özellikle hipotalamik çekirdekler ve dorsomedial ve ventrolateral medulla gibi kan basıncının tonik ve refleks regülasyonu ile ilişkili bölgelerde kardiyovasküler fonksiyonun kontrolüne etki eder [127]. Bunlara ek olarak, Ang'ın (1-7)'nin antioksidan, anti-inflamatuvar etkilerinin yanı sıra kognitif fonksiyonlar ve depresyon üzerine olumlu etkileri olduğu yapılan çalışmalarca ileri sürülmüştür [128]. Yapılan bir çalışmada, Ang-(1-7) enjeksiyonu ile amigdalada azalmış oksidatif stres belirteçleri arasındaki ilişki gösterilmiştir [129]. Ayrıca başka bir çalışmada Mas antagonizminin, transgenik hipertansif sıçanlarda enalapril'in anksiyolitik/antidepresan etkisini de önlediği ileri sürülmüştür [130]. Jiang ve diğ. (2012), çalışmalarında anjiyotensin (1-7)'nin serebral iskemide anti-inflamatuvar etkisinin olduğunu ve bu yararlı etkilerin Mas reseptör blokeri olan A-779 ile bozulduğunu ileri sürmüştür [131]. Buna ek olarak, Alzheimer hastalığında ve diyabete bağlı meydana gelen kognitif fonksiyon bozukluğu ile depresyonda Ang (1-7) 'nin iyileştirici etkisi olduğuna dair çalışmalar bulunmaktadır [132,133].



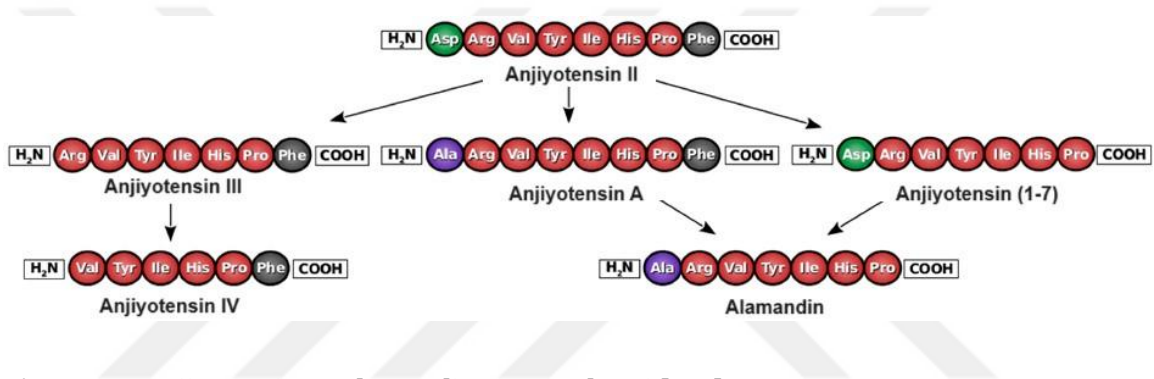
Şekil 2-2-14: Renin-Anjiyotensin Sistemi [134].

2.6.5. Anjiyotensin A/Alamandin/MrgD Ekseni

Klasik olmayan RAS ekseninde, yakın zamanda yeni anjiyotensin peptitleri tanımlanmıştır. Bu peptitlerden biri, Ang II'ye oldukça benzeyen, yalnızca Asp1'in Ala1'e dekarboksile edildiği N-terminalinde farklılık gösteren, anjiyotensin A adındaki oktapeptittir. Bu peptit, AT1R'ye daha düşük afiniteye sahipken AT2R'ye daha yüksek afinite gösterir [135]. Villela ve diğ. (2014), anjiyotensin A'nın, Ang-(1-7)'ye benzer ancak aynı N-terminal Asp/Ala modifikasyonuna sahip bir peptit oluşturacak şekilde bölünebileceğini ileri sürmüştür [136]. Bu sınıf, Anjiyotensin A/alamandin/MrgD eksenini olarak tanımlanmıştır ve RAS yapbozunda daha önce eksik olan yeni bir parçayı temsil etmektedir. Bu yolak hakkında çok az şey bilinmesine ve biyolojik ve patofizyolojik ilişkisinin belirsiz olmasına rağmen, RAS'ın karmaşıklığının anlaşılmasında başka bir adımı temsil edebilir.

2.6.6. Alamandin

RAS ailesinin en yeni üyesi olan alamandin 2013 yılında Lautner ve diğ. tarafından tanımlanmıştır [137]. Alamandin, ACE2'nin katalitik etkisi ile anjiyotensin A'dan veya doğrudan aspartik asidin enzimatik dekarboksilasyonu yoluyla Ang-(1-7)'den üretilir [136]. Alamandin ve Ang-(1-7) neredeyse aynı amino asit dizilerine sahiptir. Yalnızca zincirin N-ucundaki (Ala-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro) amino asit Asp/Ala bakımından farklılık gösterirler (Şekil 2-2-15). Alamandinin, amino asit sekanslarının yakın homolojisinden dolayı Ang'ın (1-7) etkilerini taklit etmesi mümkündür. Bu olgu, biyolojik etkilerinin çoğunluğunun önemli benzerliğini açıklayabilir. Örneğin, alamandinin vazodilatasyon, antifibrozis, antihipertansif etkileri Ang-(1-7)'nin fizyolojik etkilerine benzerdir [135].



Şekil 2-2-15: Anjiyotensin A/Alamandin/MrgD Ekseni [135].

Fonksiyonel olarak, alamandinin, spontan hipertansif sıçanlarda hipertansiyonu azalttığı ve kalpte fibrozis ve hipertrofiyi azaltarak iskemi/reperfüzyon hasarına karşı koruyucu etkisinin olduğu gösterilmiştir [138]. Ang-(1-7) için daha önce yapılan çalışmalarda ileri sürüldüğü gibi, alamandin de fare ve sıçanların aort halkalarında vazodilatasyona sebep olmuştur [139]. Ayrıca, kan basıncının kontrolü için kritik olan beynin medullar bölgelerine alamandin mikroyenjeksiyonu, Ang-(1-7) tarafından üretilenlere benzer kardiyovasküler etkilere sebep olmuştur [137]. Ancak bu bilgilerin yanı sıra, her iki peptidin tüm etkilerinin aynı olmadığına dikkat çekilmektedir. Örneğin, anjiyotensin-(1-7) için tanımlanan anti-proliferatif etki henüz alamandin için gösterilememiştir.

Alamandinin etkileri Ang-(1-7)'nin etkilerine benzese de bu iki peptidin reseptörleri farklıdır. Ang-(1-7)'nin Mas reseptörü için endojen ligand olduğu tespit edildiğinden, başlangıç hipotezi olarak alamandin'in de bu reseptör için bir ligand olabileceği düşünülmüştür. Ancak yapılan bir çalışmada, aort halkalarında alamandin kaynaklı vazodilatasyon, Mas antagonisti A-779 ile ön tedaviden etkilenmemiştir. Ayrıca, Mas geni silinmiş farelerden alınan aort halkalarında,

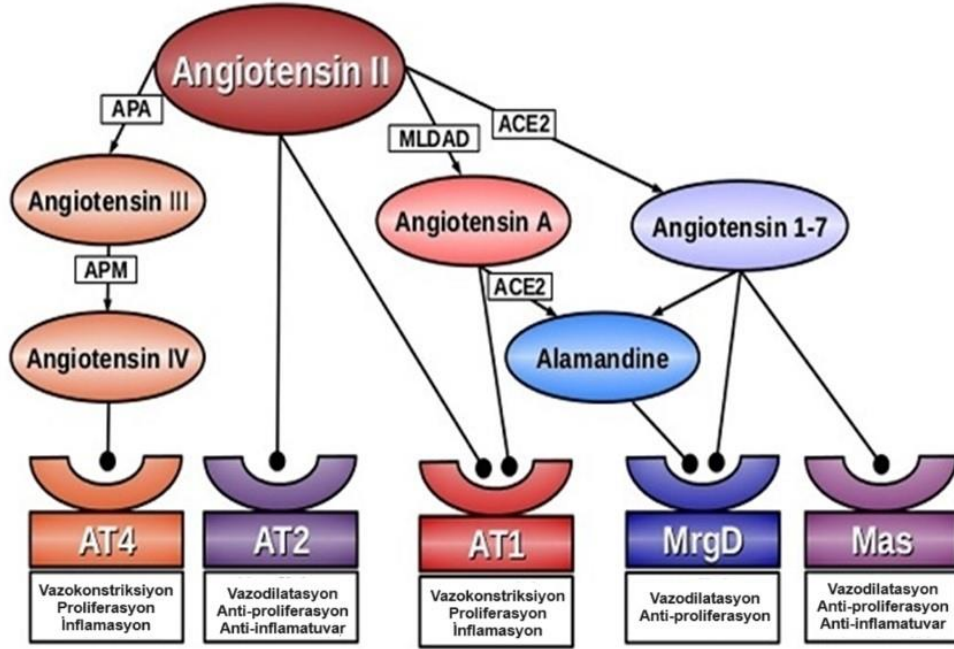
alamandinin vazodilatasyon etkisi tamamen korunmuştur [137]. Ek olarak, yapılan diğer çalışmalarca alamandinin ve MrgD reseptörü etkileşiminin D-Pro7-Ang-(1-7) tarafından bloke edildiği ancak Mas reseptör antagonisti olan A-779 tarafından bloke edilmediği gösterilmiştir. Bu veriler, alamandin'in bir Mas reseptör agonisti olmadığını göstermektedir [136].

Merkezi olarak alamandinin etkisi, rostral ventrolateral medulla, kaudal ventrolateral medulla ve hipotalamusta Ang-(1-7) için tanımlanan etkilere benzerdir. Bu gözlemler, daha önce Ang II ve Ang-(1-7) için tanımlandığı gibi, alamandinin de beyinde nöronal uyarıcı bir molekül olarak görev yapabileceğini göstermektedir. Ancak bu iki peptid arasında birtakım farklılıklar da bulunmaktadır [140]. Örneğin, Ang-(1-7) esas olarak PI3K/Akt/eNOS yolunu aktive ederek NO salınımını desteklerken, alamandin bu yolu içermeyen bir mekanizma ile NO salınımına yol açar. AMP ile aktifleştirilen protein kinaz (AMPK), alamandin kaynaklı NO oluşumunun ana hedefi gibi görünmektedir [141]. Son zamanlarda, Ang-(1-7)'nin MrgD için zayıf bir ligand olduğu gösterilmiş olup, bu reseptörün Ang-(1-7) /ACE2'de olası bir rolü olduğunu düşündürmektedir. Alamandin, MrgD ile selektif olarak etkileşime girer ve hemen hemen tüm dokularda ve organlarda bulunur [142].

2.6.7. Mas ile İlişkili G-Proteinine Bağlı D Tip Reseptör

Mas ile ilişkili G-proteini ile eşleşen reseptörler, ilk olarak kemirgenlerde ve insanlarda birincil nosiseptif duyu nöronlarında tanımlanmıştır [143]. Buna göre, dorsal kök ganglionlarında MrgD reseptörlerinin varlığı gösterilmiştir ve nöropatik ağrının modülasyonunda rol oynadıkları ileri sürülmektedir. Ancak testis, mesane, arterler, uterus, deri, beyincik, trakea, timus, kalp, akciğer, diyafram, iskelet kası, prostat, seminal vezikül ve beyaz ve kahverengi yağ dokusu gibi diğer dokularda da MrgD reseptörleri tanımlanmıştır [135] (Şekil 2-2-16). MrgD'nin ekspresyonunun, örneğin inflamatuvar barsak hastalığı, aterosklerotik aort veya akciğer kanseri gibi birtakım patolojilerle ilişkili olduğu rapor edilmiştir [143,144]. İmmünohistokimyasal analiz kullanılarak, MrgD'ler aterosklerotik plaklarda, düz kas hücrelerinde ve endotelial nitrik oksit sentazı (eNOS) eksprese eden endotel hücrelerinde tanımlanmıştır [19]. Merkezi sinir sisteminde alamandinin MrgD reseptörünün aracılık ettiği süperoksit anyon üretimini indükleyerek nikotinamid adenin dinükleotit fosfat (NADPH) oksidaz aktivitesini arttırdığı da ileri sürülmüştür [141]. Bunlara ek olarak, Almeida-Santos ve diğ. (2020), çalışmalarında alamandinin MrgD reseptörü aracılığıyla, düşük beyin anjiyotensinojeni olan transgenik sıçanlarda antidepresan benzeri etkiyi indüklediğini

göstermiştir [142]. Bu sonuçlar, alamandinin depresif davranışın modülasyonuna katkısı olduğunu düşündürmektedir.



Şekil 2-2-16: Anjiyotensin A/Alamandinin/MrgD Ekseni: Anjiyotensin sistem reseptörleri ve etkileri [135].

MrgD reseptörü ve onun endojen ligandı alamandinin hakkındaki çalışmaların büyük bir çoğunluğu kardiyovasküler sistemi kapsamaktadır, ancak alamandinin merkezi sinir sistemi üzerindeki etkileri ile bilgiler hala sınırlıdır ve kognitif fonksiyonlar üzerindeki etkisini gösteren bir çalışma henüz bulunmamaktadır. Alamandinin oluşumunu destekleyecek fizyolojik/patofizyolojik koşullar, oluşumundan sorumlu enzimler, sinyal yollarının moleküler detayları ve MrgD'nin RAS'ın bu yeni üyesi için tek bağlanma bölgesi olup olmadığı henüz netlik kazanmamıştır. Depresyon tedavisinde bu ajanların yararlılığını doğrulamak için beyin anjiyotensin sistemini hedef alan çalışmalar gereklidir. Bu bilgiler ışığında çalışmamızın amacı, depresyon ve buna bağlı meydana gelen kognitif fonksiyon bozukluğunun patofizyolojisinde, potansiyel bir tedavi aracı olarak, kognitif fonksiyonlara, nöroinflamasyona ve oksidatif stres üzerine RAS ailesinin yeni bir üyesi olan alamandinin etkilerini incelemektir.

3. YÖNTEM

3.1. DENEY HAYVANLARI

Daha önceki çalışmalar referans alınarak ortalamalar arasındaki fark 2.87 birim ve standart sapma 1.66 birim alındığında %95 güven düzeyi ve $\alpha=0.05$ anlamlılık seviyesinde %80 güç için örneklem büyüklüğü $n_1=n_2=n_3=n_4=n_5=7$, toplam $n=35$ olarak belirlendi [131]. Çalışmanın etik kurul onayı Bezmialem Vakıf Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan alındı (No:2022/22). Tez öneri savunmasında tez adında yapılan değişiklik Bezmialem Vakıf Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'na bildirildi ve ikinci onay da alındı (No: 19.09.2022-E.77505).

Çalışmada deney hayvanı olarak yetişkin 3 aylık, ağırlıkları 300-350 g arasında değişen 35 adet erkek *Sprague dawley* cinsi sıçan kullanıldı. Sıçanların her biri deney öncesinde ve deney süresince, kontrollü çevresel koşullar altında (7:00-19:00 aydınlık/karanlık döngüsü ve 22-24°C), plastik kafeslerde tutuldu. Aşağıda belirtilmiş olan kronik öngörülemez hafif stres (KÖHS) modeline bağlı olarak depresyon oluşturulan gruplara belirli günlerde su ve yem kısıtlaması uygulandı. Kontrol grubuna ise herhangi bir su ve yem kısıtlaması uygulanmadı.

3.2. DENEYDE KULLANILAN KİMYASALLAR

Alamandin (Sigma-Aldrich, 103-SML1374) ve A-779 (Sigma-Aldrich, 23396-A-779) 21 gün boyunca 0,5 ml serum fizyolojik içerisinde çözündürülerek, Alamandin 50 µg/kg ve A-779 300 µg/kg olacak şekilde intraperitoneal (i.p.) olarak enjekte edildi.

3.3. DENEY GRUPLARI

Deneye başlamadan önce tüm sıçanların ağırlıkları ölçülerek ve sükröz tercih testi uygulanarak hayvanların başlangıç aşamasındaki anhedoni düzeyleri tespit edildi. Elde edilen verilere göre hayvanlar 5 gruba ayrıldı ve deneysel protokoller uygulandı (Şekil 3-1).

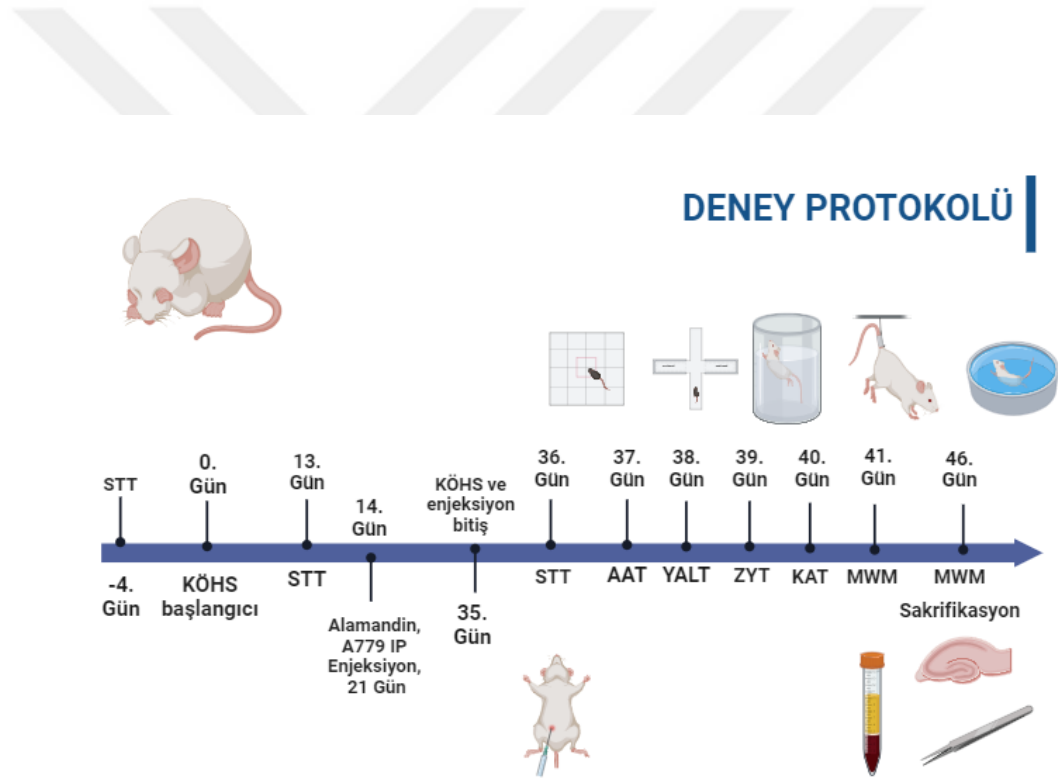
1.Kontrol Grubu (K) (n=7): KÖHS modeline maruz bırakılmamış olup, 21 gün boyunca i.p. olarak 1 ml serum fizyolojik enjekte edilen grup.

2. Depresyon Grubu (D) (n=7): KÖHS modeli devam ederken 21 gün boyunca i.p. olarak 1 ml serum fizyolojik enjekte edilen grup.

3. Depresyon+Alamandin Grubu (D+Ala) (n=7): KÖHS modeli devam ederken 21 gün boyunca i.p. olarak 1 ml serum fizyolojik içerisinde çözünmüş 50 µg/kg Alamandin enjekte edilen grup.

4. Depresyon+A-779 Grubu (D+A779) (n=7): KÖHS modeli devam ederken 21 gün boyunca i.p. olarak 1 ml serum fizyolojik içerisinde çözünmüş 300 µg/kg A-779 (Mas reseptör blokeri) enjekte edilen grup.

5. Depresyon+A-779+Alamandin Grubu (D+ALA+A779) (n=7): KÖHS modeli devam ederken 21 gün boyunca i.p. olarak 0.5 ml, 50 µg/kg Alamandin ve 0.5 ml, 300 µg/kg A-779 (Mas reseptör blokeri) enjekte edilen grup.



Şekil 3-1 Deney Protokolü KÖHS: Kronik Öngörülemez Hafif Stres; STT: Sükröz Tercih Testi; AAT: Açık Alan Testi; Yükseltmiş Artı Labirent Testi, ZYT: Zorunlu Yüzme Testi; KAT: Kuyruktan Asma Testi; MWM: Morris Su Labirenti Testi.

3.4. DEPRESYON MODELİNİN OLUŞTURULMASI

3.4.1. Kronik Öngörülemeyen Hafif Stres Modeli

Çalışmada depresyon modeli oluşturmak amacıyla sıçanlara yüksek geçerlilik ve güvenilirliğe sahip olan kronik öngörülemeyen hafif stres modeli uygulandı [145]. KÖHS modelinde 35 gün boyunca, rastgele ve değişken sıra ile çok sayıda stresör uygulandı. Hayvanlar aynı stresöre 3 gün içinde tekrar maruz bırakılmadı, böylece stresörün tahmin edilebilirliği ortadan kalktı. Kontrol grubu bu süre boyunca serum fizyolojik enjeksiyonu dışında herhangi bir strese maruz bırakılmadı. Kontrol grubu stresör uygulaması esnasında protokol boyunca ayrı bir odada bekletildi. KÖHS modeli aşağıda ayrıntıları belirtildiği gibi uygulandı (Tablo 3-1, Şekil 3-2). Aydınlik/karanlık döngüsünün bozulması hariç stresör uygulamaları sırasında saat başı sıçanlar gözlemlendi.

Sıcak plaka: Sıçanlar 5'er dk boyunca 45°C sıcak plaka üzerinde bekletildi.

Soğuk plaka: Sıçanlar 5'er dk boyunca 5°C soğuk plaka üzerinde bekletildi.

Talaşsız kafes: Sıçanlar 24 saat boyunca talaşsız kafeste bekletildi.

Nemli talaş: Oda sıcaklığındaki kafeslerdeki talaşlara su döküldü ve sıçanlar nemli talaşta 24 saat bekletildi (100 g talaş için 200ml su). 24 saatin sonunda sıçanlar kuru ve temiz talaşa sahip yeni bir kafese aktarıldı.

Hareketsizlik stresi: Sıçanlar 4 saat boyunca kısıtlayıcı (restrainer) içerisinde su ve yem erişimi olmadan bekletildi.

Sosyal izolasyon: Sıçanlar tanımadıkları başka bir kafeste 4 saat boyunca ayrı ayrı tutuldu.

Eğik kafes: Kafesler 24 saat boyunca duvara 45° olacak şekilde eğilerek sabitlendi.

Kuyruk sıkma: Hayvanların kuyruk ucu 1 dk boyunca bir penset yardımı ile orta şiddette sıkıldı.

Kalabalık kafes: Sıçanlar 24 saat boyunca 7'şerli olacak şekilde kafeslerde bekletildi.

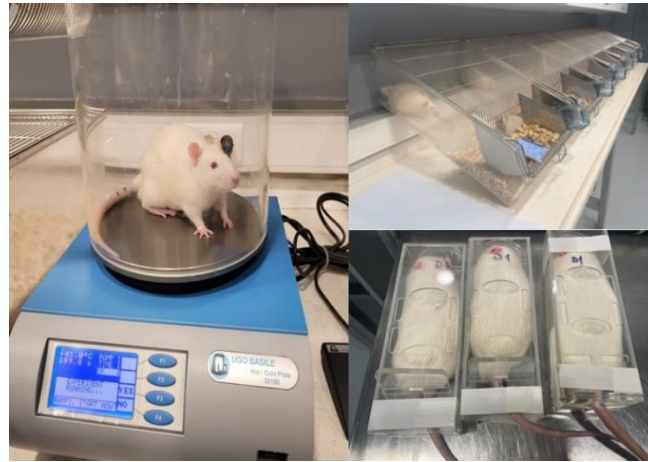
Yem kısıtlaması: Sıçanların 24 saat boyunca yiyeceğe ulaşımı engellendi, su kısıtlaması yapılmadı.

Su kısıtlaması: Sıçanların 24 saat boyunca suya ulaşımı engellendi, yem kısıtlaması yapılmadı.

Işık/karanlık döngüsünün bozulması: Sıçanlar 24 saat boyunca ışığı açık veya kapalı odalarda bekletildi.

Tablo 3-1: KÖHS Modeli ve Uygulama Günleri

Stresör	KÖHS Günleri
Sıcak plaka (45°C, 5 dk)	1, 24
Soğuk plaka (5°C, 5 dk)	9, 27
Talaşsız kafes (24 saat)	6, 29
Nemli talaş (24 saat)	10, 19, 33
Hareketsizlik stresi (restrainer) (4 saat)	2, 16, 35
Sosyal izolasyon (24 saat)	4, 17, 28
Eğik kafes (45°, 24 saat)	3, 14, 26
Kuyruk sıkma (1 dk)	7, 15, 31
Kalabalık kafes (24 saat)	8, 18, 30
Farklı kafes (24 saat)	13, 25
Yem kısıtlaması	5, 12, 22
Su kısıtlaması	12, 21, 32
Aydınlık/karanlık döngüsünün bozulması (24 saat aydınlık)	11, 23
Aydınlık/karanlık döngüsünün bozulması (24 saat karanlık)	20, 34



Şekil 3-2: KÖHS Modeli

3.5. DAVRANIŞ TESTLERİ

3.5.1. Sükroz Tercih Testi

Sükroz tercih testi, majör depresyonun iki temel belirtisinden biri olan anhedoniye değerlendirmek için uygulanmaktadır [146]. Sükroz tercih testi, deneye başlamadan önce hayvanların bazal anhedoni düzeylerini ölçmek ve grupların oluşturulması için, KÖHS modelinin ortasında depresyon modeli takibi için ve KÖHS modeli tamamlandıktan sonra anhedoni doğrulaması için toplam 3 defa uygulandı. İlk test uygulanırken hayvanlar tekli kafeslere alınarak sessiz bir ortamda %1'lik sükroza alıştıırıldı. Bu aşamada, iki şişe %1'lik sükroz solüsyonu her bir kafese yerleştirildi. 24 saat sonra %1'lik sükroz solüsyonundan biri içme suyu ile değiştirildi. 24 saatlik adaptasyon süreci tamamlandıktan sonra hayvanlara 24 saatlik su ve yem kısıtlaması uygulandı ve ertesi sabah %1'lik sükroz solüsyonu ile içme suyu içeren iki şişe kafeslere konuldu (Şekil 3-3). İki şişenin (sağ/sol) konumu 1 saat sonra rastgele değiştirildi. 24 saat sonunda tüketilen su ve %1'lik sükroz solüsyonu miktarları hesaplandı. Sükroz tercih oranı, daha önceki çalışmalarda tanımlanan formül kullanılarak hesaplandı:

$$\text{Sükroz Tercih Oranı (\%)} = \frac{\text{Sükroz Tüketimi (g)}}{[\text{Su Tüketimi (g)} + \text{Sükroz Tüketimi (g)}]} \times 100.$$



Şekil 3-3: Sükroz Tercih Testi

3.5.2. Açık Alan Testi

Porsolt ve diğ. (1978) tarafından geliştirilen açık alan testi sıçanların anksiyete düzeyi ve lokomotor aktivite gibi davranışların değerlendirilmesi amacıyla uygulanır [147]. Bu çalışmada kullanılan düzenek ahşaptan yapılmış, kare tabanlı (91x91 cm), siyaha boyalı ve hayvanın tırmanmasını önleyecek yükseklikte (40 cm) duvarlara sahiptir (Şekil 3-4). Deneye başlamadan önce, kullanılan açık alanın orta kısmı hayvanın göremeyeceği bir bantla 26x26 cm ebatlarında ayrıldı. Her bir sıçan deney düzeneğine yüzü duvar tarafına bakacak şekilde yerleştirildi ve 5 dakika boyunca tepe kamerası ile kayıt altına alındı. EthoVision-XT programı kullanılarak (Noldus Bilgi Teknolojisi, EthoVision Sistemi, Hollanda) orta ve kenar alan olmak üzere 2 hayali kadrın belirlendi. Deney süresi boyunca sıçanların orta ve kenar alanda geçirdikleri toplam süre, orta alana geçiş sıklığı kaydedildi. Testi tamamlayan her sıçandan sonra açık alan aparatı %70 alkol ile temizlendi. Hayvanların geçirdikleri süre değerlendirirken en az 3 ekstremitenin orta veya kenar alanda bulunması kriter olarak belirlendi. Elde edilen kayıtlardan ise hayvanların harekete başlama latansı, şahlanma sayısı, temizlenme sayısı ve temizlenme süresi hesaplandı.



Şekil 3-4: Açık Alan Testi

3.5.3. Yükseltilmiş Artı Labirent Testi

İlk olarak File (1985) tarafından geliştirilen bu test, deney hayvanlarında anksiyeteyi ölçmek için kullanılmaktadır [148]. Test aparatı karşılıklı iki açık (50x10 cm) ve iki kapalı (50x10x40 cm) koldan oluşan, artı şeklinde, yerden 50 cm yüksekte konumlanmış, siyaha boyalı, ahşap bir platformdan oluşmaktadır (Şekil 3-5). Deney başlangıcında her sıçan açık ve kapalı kolların arasında kalan orta bölme (5x5 cm), yüzleri açık kola bakacak şekilde yerleştirildi ve 5 dakika boyunca tepe kamerası ile kayıt altına alındı. Testi tamamlayan her hayvandan sonra, açık ve kapalı kollar ile orta alan herhangi bir kokunun ipucu oluşturmaması sebebi ile %70'lik alkol ile temizlendi. Deney boyunca hayvanların açık kol, kapalı kol ve orta alanda geçirdikleri toplam süre EthoVision-XT programı (Noldus Bilgi Teknolojisi, EthoVision Sistemi, Hollanda) ile kaydedildi.

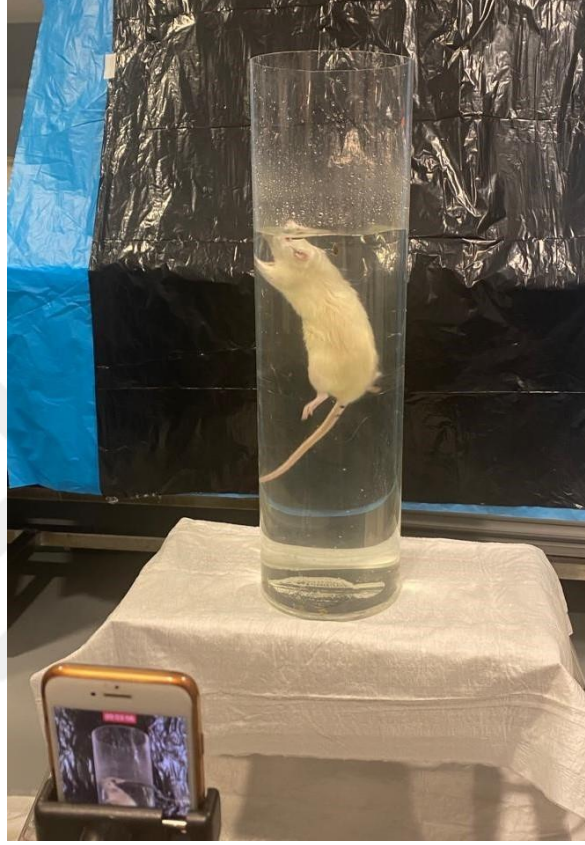


Şekil 3-5: Yükseltilmiş Artı Labirent Testi

3.5.4. Zorunlu Yüzme Testi

Davranışsal çaresizlik testi olarak da bilinen zorunlu yüzme testi, bir kemirgenin boğulma tehdidine verdiği yanıtı odaklanır. Zorunlu yüzme testinde hareketsizlik negatif duygu durum belirtisidir ve sıçanda umutsuzluk durumunu temsil eder. 1977 yılında Porsolt ve diğ. tarafından geliştirilen test, hayvanın kaçamayacağı büyüklükte ve ekstremiteleri yardımıyla tutunamayacağı genişlikte şeffaf silindirik bir cam şişede uygulanır [147] (Şekil 3-6). Sıçanlar,

içerisine 30 cm derinliğine kadar oda sıcaklığında su konulmuş 20 cm çapındaki silindirin içine önce kuyruk kısmı suya girecek şekilde bırakıldı ve 5 dk boyunca yüzdürüldü. Tüm deney prosedürü bir kamera yardımıyla kaydedildi ve sıçanların aktif olarak yüzdükleri süre, hareketsizlik latansı ve toplam hareketsizlik süreleri ölçüldü.



Şekil 3-6: Zorunlu Yüzme Testi

3.5.5. Kuyruktan Asma Testi

Zorunlu yüzme testinde olduğu gibi bu testte de çaresizlik davranışı değerlendirilmektedir. Sıçan yerden belirli bir yükseklikte kuyruktan baş aşağı olacak şekilde asıldı ve beş dakika boyunca bir kamera ile kaydedildi (Şekil 3-7). Sıçanların kurtulmak için çabalamayı bıraktığı toplam süre ölçüldü.



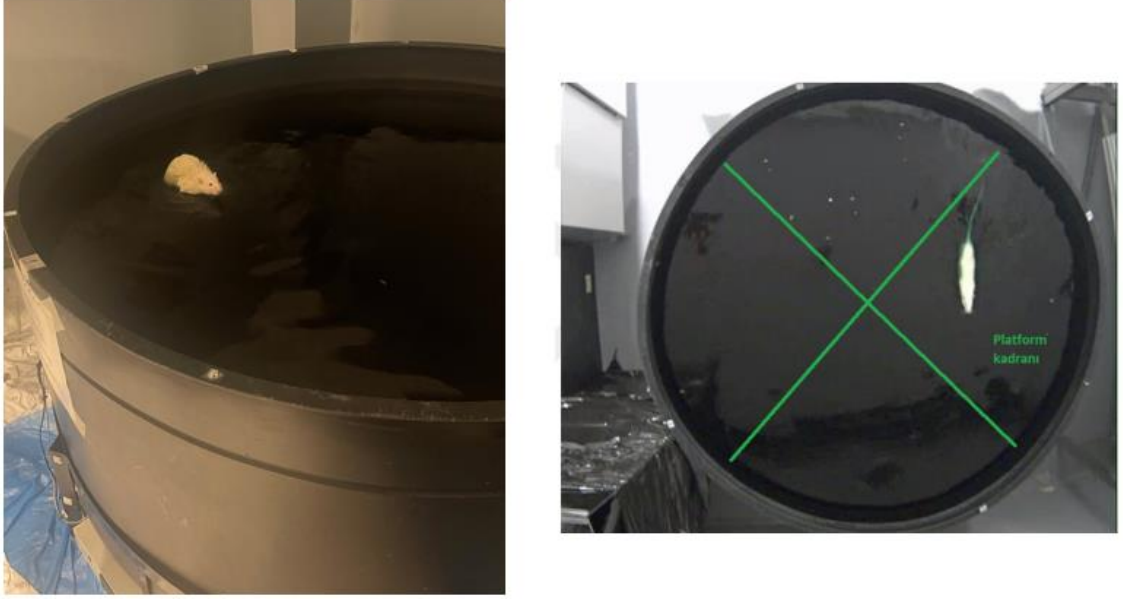
Şekil 3-7: Kuyruktan Asma Testi

3.5.6. Morris Su Labirenti Testi

Morris su labirenti testi, 1984 yılında Morris tarafından geliştirilen, sıçan ve farelerde kısa süreli bellek, hipokampusu bağlı mekânsal öğrenme ve uzaysal bellek parametrelerini ölçmek için kullanılan bir testtir [149]. Morris su labirenti testinin aparatı 150 cm çapında, 60 cm derinliğinde, siyah silindirik bir tanktan oluşmaktadır. Deney başlangıcında tank su ile ($23^{\circ}\text{C} \pm 1$) 45 cm derinliğe kadar dolduruldu ve toksik olmayan mavi ve mor renkli gıda boyası dökülerek suyun opaklaşması sağlandı. Su tankı, tankın ortasından geçen iki dikey çizgi ile dört çeyreğe (doğu, batı, kuzey, güney kadrantları) ayrıldı ve güney kadrantının merkezine şeffaf pleksiglastan yapılmış kaçış platformu (10 cm x 28 cm) su yüzeyinin 2 cm altına yerleştirildi (Şekil 3-8). Su tankının etrafındaki duvaralara, sıçanın konum tahmini yapabilmesi için hareketsiz 4 adet şekilli ipucu (şerit, üçgen, kare, yuvarlak) yerleştirildi. Bilgisayarlı video izleme sistemi (Noldus Bilgi Teknolojisi, EthoVision Sistemi, Hollanda) tanktaki hayvanları izlemek ve verileri kaydetmek için kullanıldı.

Morris su labirent testi öğrenme ve test periyodu olarak iki aşamada gerçekleştirildi. Öğrenme periyodunda sıçanlar 5 gün boyunca her gün 4 deneme olacak şekilde su tankının doğu, batı, kuzey ve güney kadrantlarından rastgele suya bırakıldı ve 60 sn boyunca yüzmelerine izin

verilerek kaçış platformunu bulmaları beklendi. Deneyin ilk günü 60 saniyelik periyotta kaçış platformunu bulamayan sıçanlara platformun konumu tanıtıldı. Sıçanların platforma ulaşmak için geçirdiği süre, katettikleri mesafe ve yüzme hızları, EthoVision-XT video izleme sistemi tarafından sürekli olarak kaydedildi. Deneyin 6. günü test periyodu gerçekleştirildi. Test periyodunda kaçış platformu kaldırıldı ve sıçanlar doğu kadrانından birer defa olmak üzere bırakılarak 60 sn boyunca yüzdürüldü. Sıçanların kaçış platformunun önceden bulunduğu kadranda geçirdikleri süre hesaplandı.



Şekil 3-8: Morris Su Labirenti Testi

3.6. BİYOKİMYASAL ÇALIŞMALAR

Morris su labirenti testinin son günü 10 mg/kg ksilazin ve 100 mg/kg ketamin ile genel anestezi altında sıçanlar dekapite edildi. Sıçanlardan kan ve beyin dokusu örnekleri alındı. Beyin dokusundan ince disseksiyon ile bilateral hipokampuslar ve prefrontal korteks izole edildi ve biyokimyasal çalışmalar için -80°C’de muhafaza edildi. Hayvanlardan alınan kan örnekleri 5000 rpm devirde 10 dakika santrifüj (Hettich Mikro 220R, Tuttlingen, Almanya) edildikten sonra serum kısımları mikrotüplere aktararak -80°C’de saklandı.

Biyokimyasal analizler beyin ve prefrontal korteks homojenatlar ile serum örneklerinde gerçekleştirildi. Hipokampus ve prefrontal korteks dokuları PBS (Phosphate Buffered Saline, pH:7.4) çözeltisi ile 2 ml hacimli mikrotüpler içerisinde, çelik boncuklu homojenizatör (Retsch MM400, Haan, Almanya) ile homojenize edildi. Elde edilen homojenatlar mikrotüplere alındı

ve 4°C’de, 15.000 xg’de 20 dakika santrifüjlenerek pelet ve süpernatant olmak üzere 2 farklı fraksiyon elde edildi. Homojenatlarda Bikinkoninik Asit (BCA) yöntemi ile total protein miktarları tayin edildi. Tüm biyokimyasal analizler uygun kitler kullanılarak ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) yöntemiyle yapıldı.

Prefrontal korteks ve hipokampus doku homojenatlarında; N-methyl-d-aspartic acid (NMDA, Bioassay Technology Laboratory, Şangay,Çin, No: E0999Ra), Gamma-aminobutyric acid (GABA, Bioassay Technology Laboratory, Şangay,Çin, No: E0102Ra), Cyclic AMP response element binding protein (CREB, SunRed, Şangay, Çin, No: 201-11-0040), Brain derived neurotrophic factor (BDNF, SunRed, Şangay, Çin, No: 201-11-0477), Nuclear factor-kappa B (NF-Kb, Bioassay Technology Laboratory, Şangay,Çin, No: E0287Ra), Mas-related G-protein coupled receptor member D (MrgD, Bioassay Technology Laboratory, Şangay,Çin, No: E3380Ra), Angiotensinogen (AGT, Bioassay Technology Laboratory, Şangay,Çin, No: E0657Ra) ve Angiotensin dönüştürücü enzim-2 (ACE-2, Bioassay Technology Laboratory, Şangay,Çin, No: E0657Ra) kitleri çalışıldı. Serum örneklerinde; Kortizol (Bioassay Technology Laboratory, Şangay,Çin, No: E0828Ra) ve Epinefrin (Bioassay Technology Laboratory, Şangay,Çin, No: EA0043Ra) kitleri kullanıldı. Ayrıca tüm doku ve serum örneklerinde; Interlökin 6 (IL-6, Bioassay Technology Laboratory, Şangay,Çin, No: E0135Ra), Interlökin 1 β (IL-1 β , Bioassay Technology Laboratory, Şangay,Çin, No: E0119Ra), Tümör nekroz faktör- alfa (TNF- α , Bioassay Technology -Laboratory, Şangay,Çin, No: E0764Ra), Süperoksit dismutaz (SOD, sUNrED, Şangay, Çin, No: 201-11-0169), katalaz (CAT Bioassay Technology Laboratory, Şangay,Çin, No: E0869Ra; SunRed, Şangay, Çin No: 201-11-5106), malondialdehid (MDA Bioassay Technology Laboratory, Şangay,Çin, No: E0156Ra; SunRed, Şangay, Çin No: 201-11-0157) ve Siklooksijenaz-2 (COX-2 Bioassay Technology Laboratory, Şangay,Çin, No: E0296Ra) kitleri çalışıldı. Tüm kitler mikropalak okuyucusunda (Thermo Scientific Multiskan FC, 2011-06, ABD) 450 nm dalga boyunda ölçüldü.

3.6.1. Total Protein Tayini

- 49 ml BCA çözeltisine (B9643) 1 ml Bakır (KK) Sülfat Pentahidrat %4 Çözeltisi (C2284) ekleyerek protein belirleme reaktifini hazırlandı. Hazırlanan reaktif 1/50 oranında PBS ile seyreltilti.
- 1 mg/ml olacak şekilde hazırlanan bovin serum albumin (BSA) çözeltisinin seri dilüsyonları standart olarak kullanıldı.

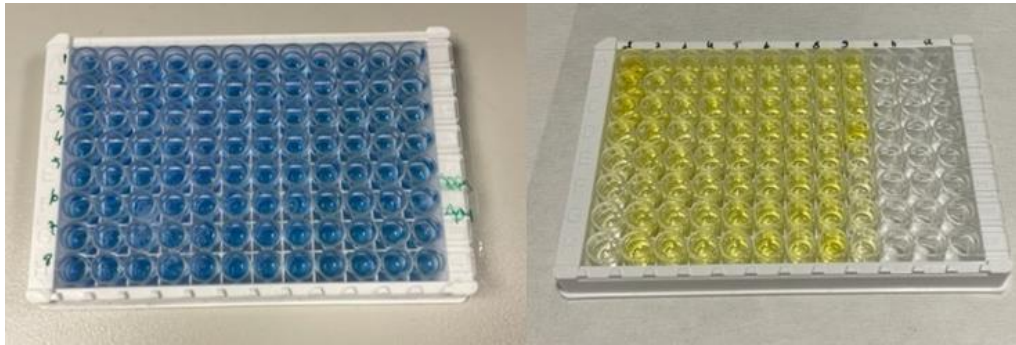
- Hazırlanan standartlar ve örnekler 96 kuyucuklu mikroyuvarlağa 25 µl hacimde pipetlendi.
- Tüm kuyucuklara 200 µl BCA eklendikten sonra 30 dakika inkübe edildi, ardından plak okuyucusunda 595 nm absorbansta (Thermo Scientific Multiskan FC, 2011-06, ABD) ölçüldü.

Hesaplama: Standartların absorbanası belirlenerek x ekseninde absorbanas, y ekseninde konsantrasyon olacak şekilde lin-lin grafik elde edilip sonuçlar mg/ml şeklinde ifade edildi.

3.6.2. ELISA Protokolü

- Çalışmaya başlamadan önce örnekler ve kit oda ısısına getirildi.
- 6 adet standart kitlerin içerisinde çıkan standart solüsyon ve standartların seri dilüsyonları ile elde edildi.
- NMDA için 32 ng/ml,
- GABA için 1600 nmol/L,
- CREB için 112.5 ng/L,
- BDNF için 0.4 ng/ml,
- NF-κB için 24 ng/ml,
- MrgD için 160 ng/ml,
- AGT için 240 ng/ml,
- Epinefrin için 480 ng/L,
- Kortizol için 480 ng/ml,
- IL-6 için 48 ng/L,
- IL-1β için 80 ng/ml,
- TNF-α için 1280 ng/L,
- SOD için 4 ng/ml,
- CAT için 320 ng/ml (BT-LAB) ve 10 ng/ml (SunRed),

- MDA için 12.8 nmol/ml (BT-LAB) ve 2.5 nmol/ml (SunRed),
- COX-2 için 24 ng/ml stok standartların seri dilüsyonları elde edildi. Ardından 50 µl olacak şekilde her bir standart pipetlendi.
- Antikor ile kaplı mikrolaktaki örnek kuyucuklarına 40'ar µl örnek (süpernatant ya da serum) ve incelenen her bir parametre için ilgili antikordan 10 µl pipetlendi.
- Tüm kuyucuklara 50 µl HRP-konjugat (Horseradish Peroxidase) eklendi ve 37°C'de 1 saat inkübasyona (Nüve Cooled Incubator, ES120, Ankara, Türkiye) bırakıldı.
- İnkübasyonun ardından kit içerisinde bulunan 30X'lik yıkama solüsyonu distile su ile hazırlandıktan sonra, mikrolak ELISA yıkayıcısı ile (Thermo Scientific WellWash Microplate Washer, 2011-08, ABD) 4 kez (350 µl) yıkandı.
- Tüm kuyucuklara sırasıyla Solüsyon A ve Solüsyon B'den 50'şer µl pipetlendi. Ardından mikrolak 37°C'de 10 dakika ışık almayacak şekilde inkübe edildi (Şekil 3-9).
- Tüm kuyucuklara 50 µl Stop Solüsyon pipetlendi ve 450 nm absorbansda mikrolak okuyucuda okundu. Absorbansların konsantrasyon değerleri; lineer olarak elde edilen standart grafiği ile hesaplandı.



Şekil 3-9:ELISA Test Kiti ve Reaksiyon Oluşumu

3.7. GEN EKSPRESYON ANALİZLERİ

3.7.1. Doku Homojenizasyonu

Çalışma protokolüne uygun olarak alınan ve -80°C de saklanan hipokampus doku örnekleri, RNA izolasyonu için 30 mg olacak şekilde bisturi ile parçalara ayrıldı. 30 mg doku üzerine 1 ml HT tamponu eklendi ve 2 ml hacimli kapaklı tüpler içerisinde, mikro boncuklu homojenizatör (Rethsch, Haan, Germany) ile homojen hale getirildi. Süpernatant dikkatlice yeni bir 1.5 ml tüpe aktarıldı ve protokole uygun şekilde izolasyona devam edildi.

3.7.2. Total RNA İzolasyonu

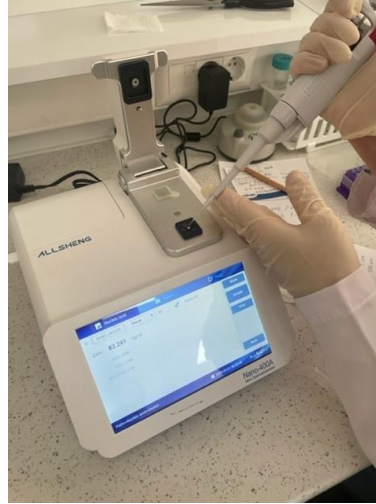
Gen analizlerinde kullanılacak örnekler, Total RNA İzolasyon Kiti (Hibrogen, MG-RNA-01) kullanılarak izole edildi. Tüm işlemlerde RNaz içermeyen malzemeler kullanıldı.

- Nükleoprotein kompleksinin tamamen parçalanması için buz üzerinde 5 dk. inkübasyon yapıldı.
- İnkübasyon sonrası örnekler 4°C’de, 10.900 xg’de 5 dk. santrifüj edildi.
- Süpernatant, yeni bir RNaz bulundurmeyen mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı. Bu aşamada protein, yağ, polisakkarit fibrilleri uzaklaştırıldı.
- Tüplere 200 µl kloroform eklendi, 15 sn vorteks ile homojen hale gelene kadar karıştırıldı ve buz üzerinde 10 dk inkübasyona bırakıldı. Daha sonra 4°C’de 10.900 xg’de 15 dk santrifüj edildi.
- Santrifüjden sonra karışım 2 faza ayrıldı. En altta fenol kloroform fazı ve en üstte RNA içeren renksiz faz oluştu. En üstteki renksiz faz pipet yardımıyla alttaki diğer fazların karışmasına olanak vermeyecek şekilde dikkatlice yeni bir RNaz bulundurmeyan boş tüpe aktarıldı. Üst faz miktarı ile RNA konsantrasyonu doğru orantılı olduğu için mümkün olduğunca fazla toplanmaya dikkat edildi.
- Alınan renksiz fazın hacmine göre üzerine 1/2 oranında önceden soğutulmuş etanol (%100) eklendi. Karışım vorteksle iyice karıştırıldı.
- Karışım filtreli tüpe aktarıldı. 4°C’de 10.900 xg’de 30 sn santrifüj edildi ve filtrenin altındaki tüpte toplanan sıvı atıldı.

- Filtreye 500 µl RY1 eklendi ve 4°C’de 10.900 xg’de 30 sn kalacak şekilde santrifüj edildi ve yine altta kalan sıvı atıldı.
- Filtreye 500 µl RY2 eklendi, 1 dk oda sıcaklığında inkübasyon yapıldı ve 4 °C’de 10.900xg’de 30 sn santrifüj edildi ve altta kalan sıvı atıldı. Bu işlem bir kez daha tekrarlandı.
- Filtreli tüp 10.900 xg’de 2 dk kuruması için santrifüj edildi.
- Kolon 1,5 ml’lik mikrosantrifüj tüplerine yerleştirildi. Direkt olarak membran üzerine 75 µl DEPC ile muamele edilmiş su eklendi. 2 dk oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı, 10.900 xg’de 2 dk santrifüj edilerek saf RNA elde edildi.

3.7.3. Total RNA Miktarı ve Saflığının Belirlenmesi

Total RNA miktarı ve saflığının belirlenmesi için Nano-400A Spektrofotometre cihazı kullanılarak 260 nm ve 280 nm dalga boylarında optik dansite ölçümleri yapıldı. Bu işlem için 2 µl RNA kullanıldı. Kalite standartı gereği A260/A280 oranının 1.8-2 aralığında olmasına dikkat edildi ve RNA miktarı ng/µl olarak verildi (Şekil 3-10). İzole edilen RNA örneklerinin yapısal bütünlüğü ve kalitesi, %2’lik agaroz jel elektroforezi ile kontrol edildi (Şekil 3-10).



Şekil 3-10: Total RNA Miktarının Belirlenmesi

3.7.4. cDNA Sentezi

cDNA sentezi HibriGen MG-CDNA-02 cDNA sentez kiti kullanılarak buz üzerinde yapıldı. 20 µl’lik bir cDNA reaksiyonu için eklenen bileşenler ve miktarları Tablo 3-2’de yer almaktadır.

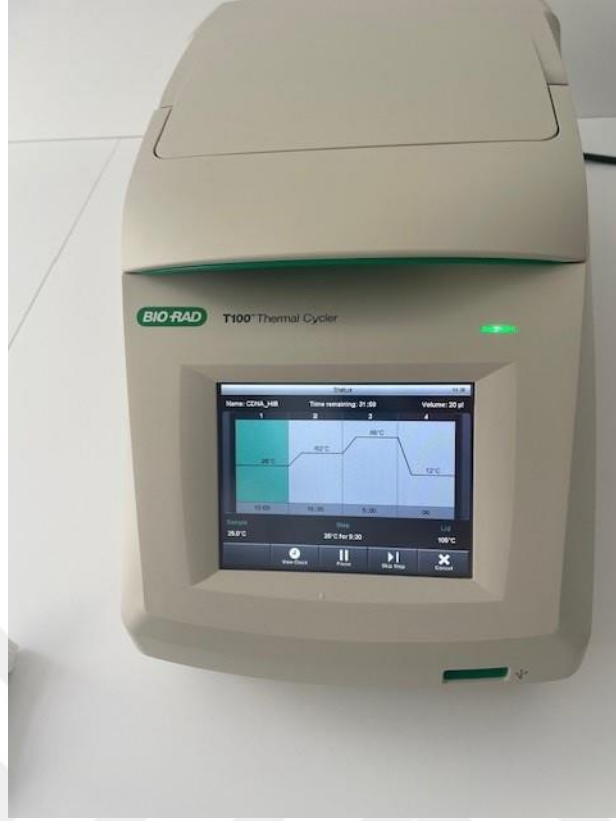
Tablo 3-2: cDNA reaksiyonu için eklenen bileşenler ve miktarları

Bileşen	Hacim	Final Konsantrasyonu
5X RT Tamponu	4 µl	1X
dNTP 10 mM	1 µl	500 µM
Oligo(dT) Primer, 10 µM	0.5 µl	250 nM
Random Heksamer Primerler, 10 µM	0.5 µl	250 nM
Total RNA	Değişken	1 ng – 2 µg
cDNA Plus RTase	1 µl	
Nükleaz içermeyen su	Değişken	20 µl'ye tamamlanacak şekilde
Total Hacim	20 µl	

Tüpler döngü cihazına (BioRad Thermal Cycler T100, ABD) yerleştirildi ve aşağıda verilen programa göre sentez gerçekleştirildi (Şekil 3-11).

- 25°C'de 10 dakika (Primer bağlanması)
- 55°C'de 15 dakika (Ters transkripsiyon)
- 85°C'de 5 dakika (İnktivasyon)
- Buzda bekletme

Tüp buza konularak reaksiyon durduruldu ve örnekler -20°C'de kullanılana kadar saklandı.



Şekil 3-11: Döngü Cihazı

3.7.5. Kantitatif Eş Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu

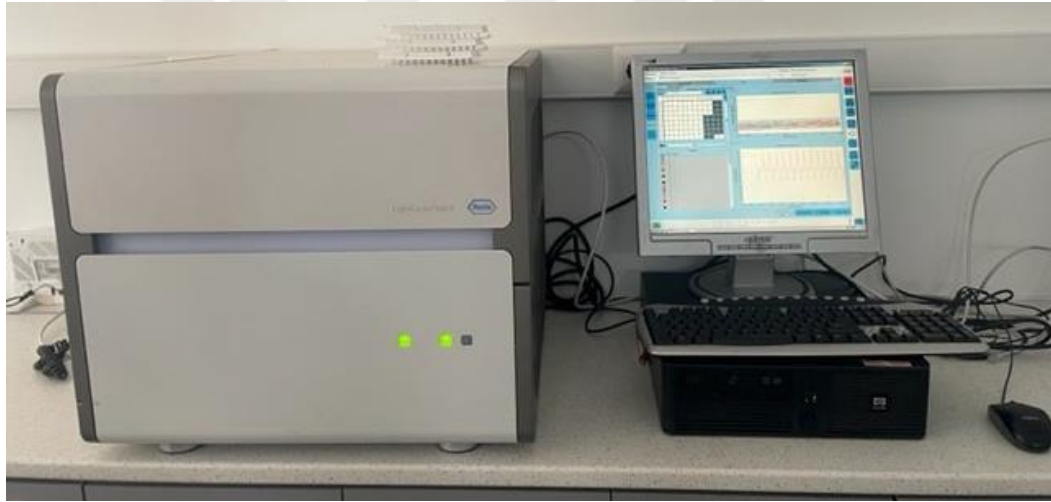
Kantitatif eş zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (qRT-PCR-PZR) Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), NMDAR2A, GABAARA1, MrgD, AGT ve ACE2 genleri için Tablo 3-3'te belirtilen primerler ile SensiFAST™ SYBR® No-ROX Kit kullanılarak gerçekleştirildi. qRT-PCR reaksiyonu bileşenleri Tablo 3-4'te verilmişti (qRT-PCR reaksiyonu için kullanılan döngü koşulları Tablo 3-5'te yer almaktadır). qRT-PCR deneyleri LightCycler® 480 cihazında gerçekleştirildi (Şekil 3-12).

Tablo 3-3: Deneyde kullanılan primer dizileri

Gen	Primer baz dizilimleri (5'-3')	Kromozom	PZR ürün (bp)	Gen ID
GAPDH	Fwd- CCGCATCTTCTTGTGCAGTG Rev- CGATACGGCCAAATCCGTTC	12p13	79	NM_021803.3
NMDAR2A	Fwd- ATGGGCAGATTGGGCTACTG Rev- GAAGTTCGCGTTCTGTCACG	10q11	154	NM_012573.4
GABAAα1	Fwd- CCAAGTCTCCTTCTGGCTCAA CA Rev- GGGAGGGAATTTCTGGCACTG AT	10q21	111	NM_183326.2
MRGD	Fwd- TGTCTCTCCGTGCTTTTCCC Rev- GTCCACCTTGAAGCACTGGT	1q42	168	NM_001001506.2
AGT	Fwd- TTGGTTCACCAGGGGATAGC Rev- AGGATGCAGAAGATGGTGGC	19q12	123	NM_134432.2
ACE2	Fwd- GAGGAAAAGGCCGAGAGCTT Rev- GCCTCGTTCATCTTTTGGGC	Xq14	131	NM_001012006.2

Tablo 3-4: PZR karışımına eklenen bileşenler ve miktarları

Bileşen	Hacim	Final Konsantrasyon
2x SensiFAST SYBR® No-ROX Mix	10 µL	1X
10 µM forward primer	0.8 µL	400 nM
10 µM reverse primer	0.8 µL	400 nM
H ₂ O	6.4 µL	
cDNA (1:1)	2 µl	
Total Hacim	20 µl	

**Şekil 3-12: LightCycler® 480 Real-Time PCR System**

Tablo 3-5: PZR'de kullanılan döngü koşulları.

Program Adı	Döngü Sayısı	Sıcaklık	Zaman
Predenatürasyon	1	95°C	2 dakika
Denatürasyon	40	95°C	5 saniye
Annealing (Bağlanma)		60°C	10 saniye
Elongation (Uzama)		72°C	15 saniye
Çözülme Eğrisi Analizi (Melting Curve)		95°C 65°C 97°C	05 saniye 1 dakika Sürekli
Soğutma	1	40°C	10 saniye

3.7.5.1. Rölatif Kantitasyon Analizi

Reaksiyon bittikten sonra elde edilen veriler, LightCycler® 480 RealTime PCR System cihazında bulunan yazılım programı kullanılarak analiz edildi. Ekspresyon düzeyi $2^{-\Delta\Delta Ct}$ metodu kullanılarak semi-kantitatif olarak hesaplandı. Normalizasyon için GAPDH referans gen olarak kullanıldı. Sıçanların her dokusuna ait örneklerden, her gen için iki tekrar olacak şekilde çalışıldı.

$$2^{-\Delta\Delta Ct} = 2^{-(\Delta Ct_{\text{hedef}} - \Delta Ct_{\text{kontrol}})}$$

$$2^{-\Delta\Delta Ct} = 2^{-[(Ct_{\text{hedef}} - Ct_{\text{referans}}) - (Ct_{\text{kontrol}} - Ct_{\text{referans}})]}$$

3.8. İSTATİSTİKSEL ANALİZLER

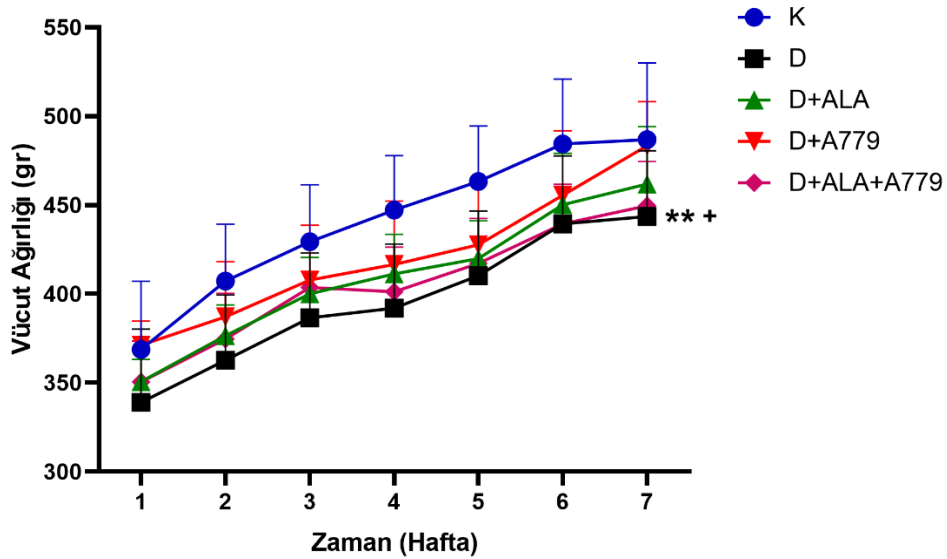
Elde edilen tüm veriler Instat İstatistiksel Paket Programı (Instat Graphad Software 8.0.1, San Diago, CA, USA) aracılığı ile analiz edildi. Grupların dağılımı Shapiro Wilk testi ile değerlendirildi. Normal dağılıma uygunluğunun test edilmesini takiben, normal dağılıma sahip bağımsız grup karşılaştırması One-Way ANOVA testi ile, normal dağılıma sahip olmayan bağımsız grup karşılaştırması Kruskal Wallis testi ile yapıldı. Anlamli çıkan değişkenlerin post-hoc karşılaştırmaları Bonferroni ve Dunn testi ile yapıldı. Bağımlı grup karşılaştırmalarında Two-Way ANOVA analizi uygulanarak Bonferroni'nin çoklu karşılaştırma testi ile değerlendirildi. Verilerin tamamlayıcı istatistikleri ortalama $\pm$ standart sapma ile verildi ve tüm analizlerde $p < 0.05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.



4. BULGULAR

4.1. AĞIRLIK BULGULARI

Tüm grupların vücut ağırlığı grup içi kıyaslamalarda 7 haftalık deney süresi boyunca, deneyin ilk haftasına göre anlamlı artış gösterdi ($p<0.001$). Deneyin son haftası gruplar arası karşılaştırma yapıldığında depresyon grubunun vücut ağırlığının kontrol grubuna ($p<0.01$) ve D+A779 grubuna ($p<0.05$) göre anlamlı olarak düşük olduğu tespit edildi (Şekil 4-1).



Şekil 4-1: Kontrol (K), Depresyon (D), Depresyon+alamandin (D+ALA), Depresyon+A779 (D+A779), Depresyon+Alamandin+A779 (D+ALA+A779) gruplarının haftalara göre vücut ağırlıklarındaki değişim.

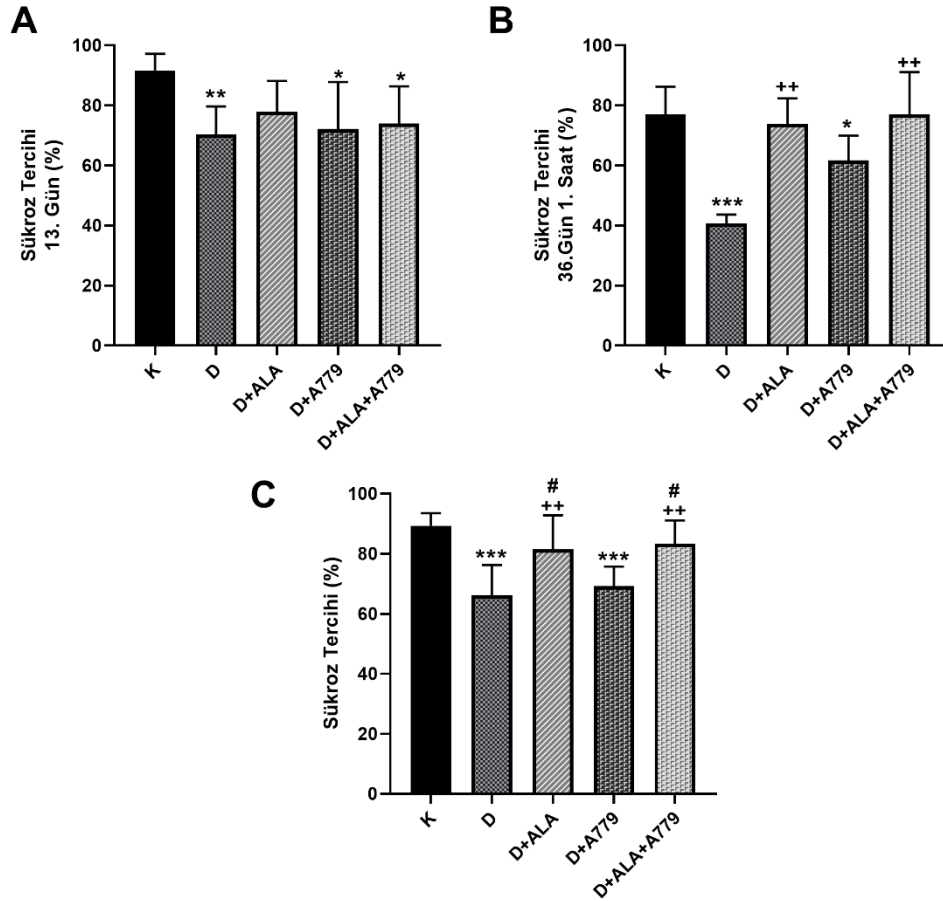
** $p<0.01$, kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlılık; * $p<0.05$, D+A779 grubuna göre istatistiksel anlamlılık.

4.2. DAVRANIŞ TESTLERİ BULGULARI

4.2.1. SÜKROZ TERCİH TESTİ BULGULARI

KÖHS uygulamasının 13. günü, enjeksiyona başlanmadan önce depresyon takibi için uygulanan sükröz tercih testi bulgularına göre D ($p<0.01$), D+A779 ($p<0.05$) ve D+ALA+A779

($p<0.05$) gruplarında sükröz tercihi kontrol grubuna göre anlamlı olarak azaldı. (Şekil 4-2A). KÖHS uygulaması ve enjeksiyonların son günü, 1. saatteki ölçümde sükröz tercihi kontrol grubuna göre en fazla D grubunda ($p<0.001$) azalmışken, D+A779 grubunda da kontrol grubuna göre anlamlı ($p<0.05$) bir azalma tespit edildi. D+ALA ve D+ALA+A779 gruplarında ise D grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı ($p<0.01$) bir artış görüldü (Şekil 4-2B). Deneyin son günü 24 saatlik ölçüm sonuçlarına göre ise hem D hem de D+A779 gruplarında kontrol grubuna kıyasla anlamlı ($p<0.001$) bir azalma mevcuttu. D+ALA ve D+ALA+A779 gruplarında ise hem D grubuna ($p<0.01$) hem de D+A779 grubuna göre ($p<0.05$) anlamlı bir artış meydana geldi (Şekil 4-2C).

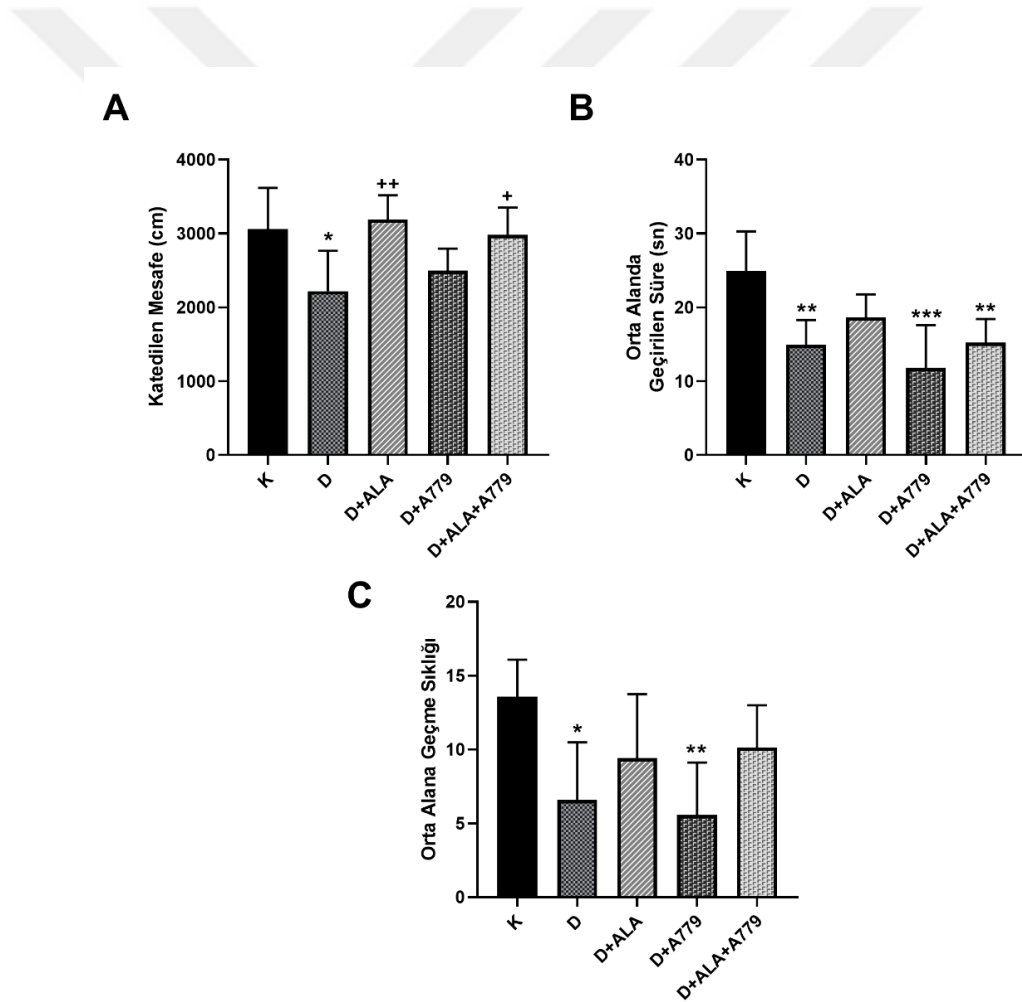


Şekil 4-2: Deney gruplarının 13. Gün (A), 36. Gün 1 saatlik (B) ve 36. gün 24 saatlik (C) sükröz tercih değerlerinin yüzde değişimi.

* $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$, kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlılık; ++ $p<0.001$, D grubuna göre istatistiksel anlamlılık; # $p<0.05$, D+A779 grubuna göre istatistiksel anlamlılık.

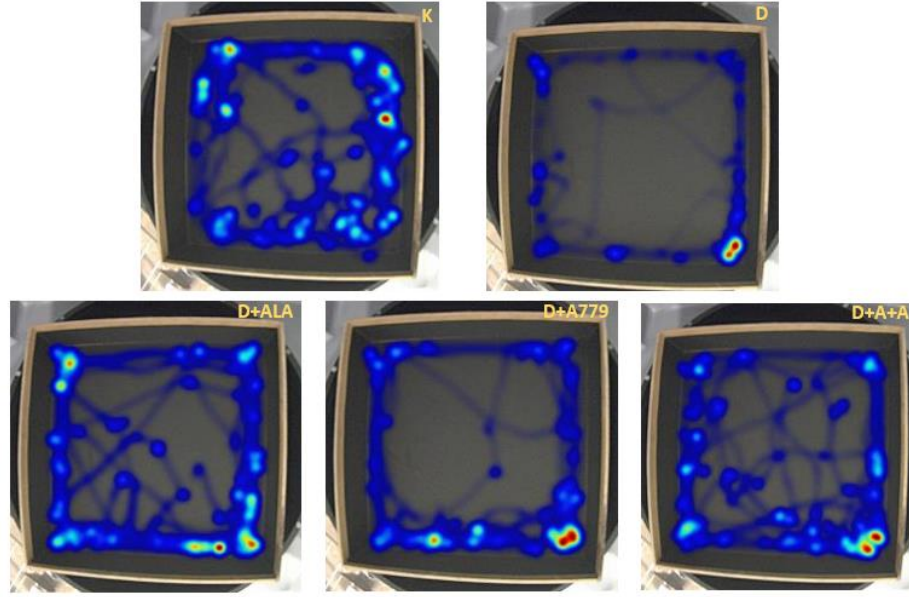
4.2.2. AÇIK ALAN TESTİ BULGULARI

Deney hayvanlarında depresyon ve anksiyete ölçümü için yapılan açık alan testinden elde edilen verilere göre, açık alanda hayvanların toplam katettikleri mesafe kontrol grubuna göre en az depresyon grubunda bulundu ($p<0.05$). D+ALA ($p<0.01$) ve D+ALA+A779 ($p<0.05$) gruplarında ise depresyon grubuna göre anlamlı bir artış saptandı (Şekil 4-3A; Şekil 4-4). Hayvanların orta alanda geçirdikleri süreler kıyaslandığında; D ($p<0.01$), D+A779 ($p<0.001$) ve D+ALA+A779 ($p<0.01$) gruplarında geçirilen süre, kontrol grubuna göre anlamlı olarak azaldı (Şekil 4-3B). Hayvanların orta alandan geçme sıklıkları değerlendirildiğinde ise D ($p<0.05$) ve D+A779 ($p<0.01$) gruplarında kontrol grubuna göre anlamlı bir azalma görüldü (Şekil 4-3C).



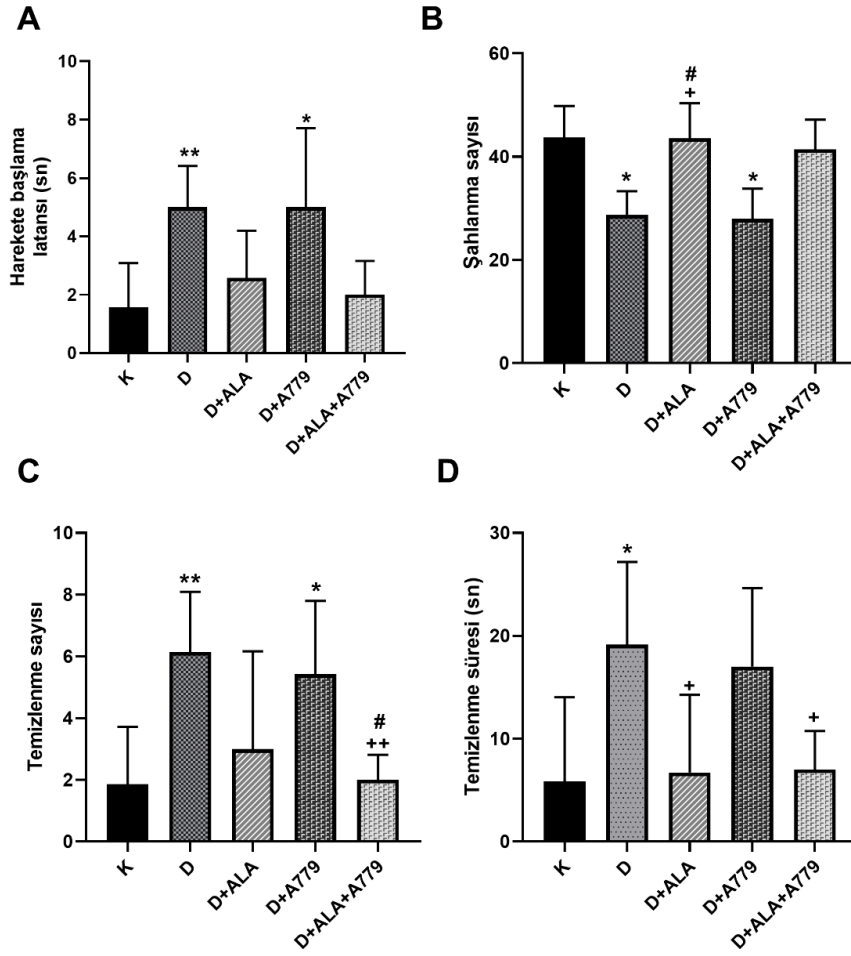
Şekil 4-3: Deney gruplarının açık alan testinde toplam katettikleri mesafe (A), orta alanda geçirdikleri süre (B) ve orta alandan geçme sıklıkları (C).

* $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$, kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlılık; + $p<0.05$, ++ $p<0.01$, D grubuna göre istatistiksel anlamlılık.



Şekil 4-4: Deney gruplarının açık alan testinde katettikleri toplam mesafenin iz haritası.

Hayvanların açık alan platformuna bırakılması ile harekete başlamaları arasındaki geçen süre karşılaştırıldığında D ($p<0.01$) ve D+A779 ($p<0.05$) gruplarının latansı kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulundu (Şekil 4-4A). Şahlanma sayıları karşılaştırıldığında, D ve D+A779 gruplarında kontrol grubuna göre anlamlı ($p<0.05$) bir azalma gözlenirken, D+ALA grubunda hem D hem de D+A779 gruplarına göre anlamlı ($p<0.05$) bir artış tespit edildi (Şekil 4-4B). Deney hayvanlarında anksiyetenin önemli bir belirteci olan temizlenme sayıları incelendiğinde, D ($p<0.01$) ve D+A779 ($p<0.05$) gruplarında kontrol grubuna göre anlamlı bir artış saptandı. Ancak D+ALA+A779 grubunda D ($p<0.01$) ve D+A779 ($p<0.05$) gruplarına göre anlamlı bir azalma bulundu (Şekil 4-4C). Son olarak temizlenme süresi verileri değerlendirildiğinde, D grubunda kontrol grubuna göre anlamlı ($p<0.05$) bir artış varken, D+ALA ve D+ALA+A779 gruplarında ise D grubuna göre anlamlı ($p<0.05$) bir azalma meydana geldi (Şekil 4-4D).



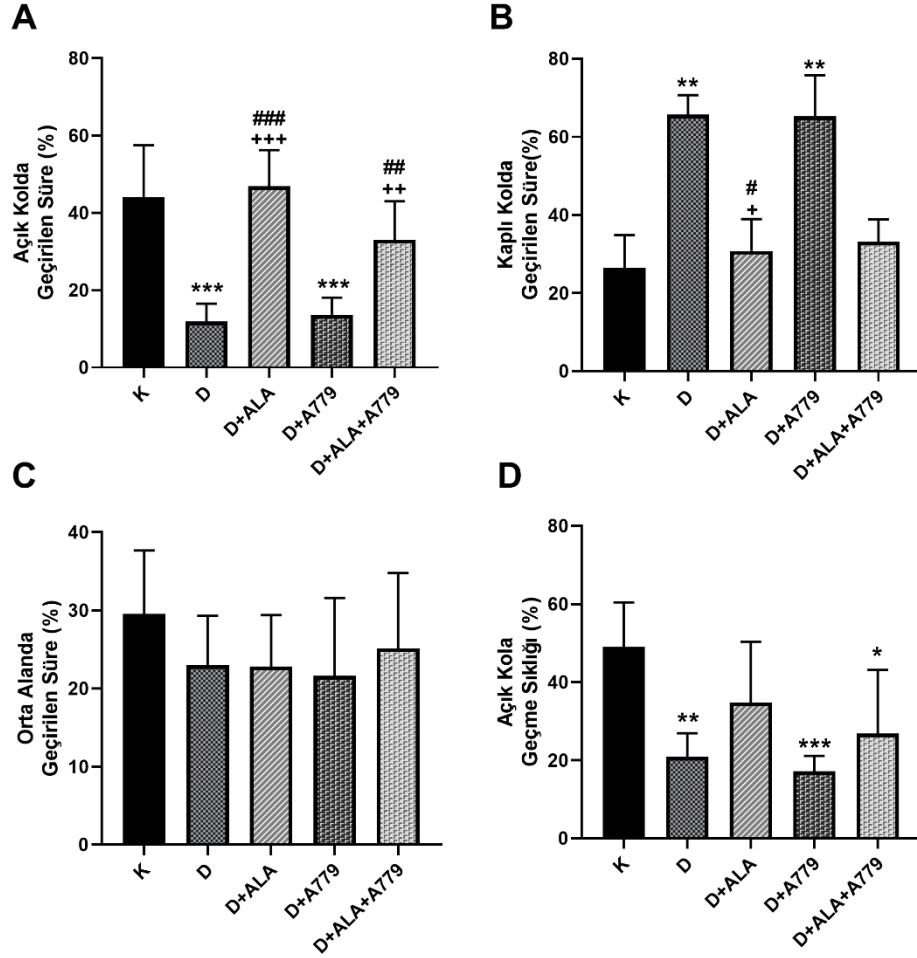
Şekil 4-5: Deney gruplarının açık alan testinde harekete başlama latansları (A), şahlanma sayıları (B), temizlenme sayıları (C) ve temizlenme süreleri (D).

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlılık; + $p < 0.05$, ++ $p < 0.01$, D grubuna göre istatistiksel anlamlılık, # $p < 0.05$, D+A779 grubuna göre istatistiksel anlamlılık.

4.2.3. YÜKSELTİLMİŞ ARTI LABİRENT TESTİ BULGULARI

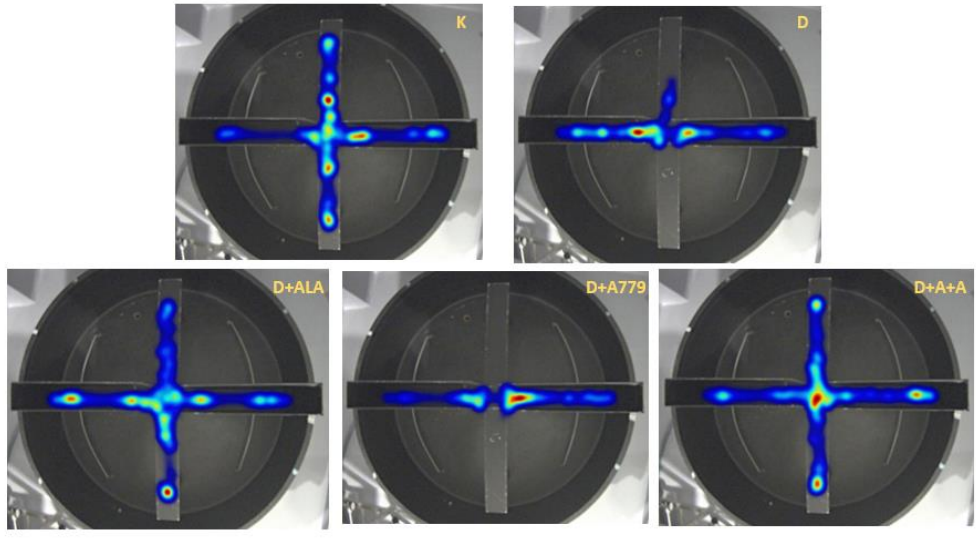
Yükseltilmiş artı labirent testinde deney hayvanlarının labirentin açık ve kapalı kollarında geçirdikleri süre ile platformun orta alanında geçirdikleri süre toplam test süresine göre yüzde cinsinden ifade edildi. Buna göre açık kolda geçirilen süre en az D ve D+A779 gruplarında görüldü ve azalış kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p < 0.001$). D+ALA ($p < 0.001$) ve D+ALA+A779 ($p < 0.01$) gruplarında ise hem D hem de D+A779 gruplarına göre anlamlı bir artış saptandı (Şekil 4-6A). Deney hayvanlarının kapalı kolda geçirdikleri süre kontrol grubuna göre anlamlı olarak en fazla D ($p < 0.01$) ve D+A779 ($p < 0.01$) gruplarında meydana geldi. D+ALA grubunda ise hem D ($p < 0.05$) hem de D+A779 ($p < 0.05$) gruplarına kıyasla anlamlı bir azalma görüldü (Şekil 4-6B). Gruplar arasında orta alanda geçirilen süre

kıyaslandığında anlamlı bir fark bulunamadı (Şekil 4-6C). Son olarak grupların açık kola geçme sıklıkları ölçüldüğünde D ($p<0.01$), D+A779 ($p<0.001$) ve D+ALA+A779 ($p<0.05$) gruplarında kontrol grubuna göre anlamlı bir azalma tespit edildi (Şekil 4-6D, Şekil 4-7).



Şekil 4-6: Deney gruplarının yükseltilmiş artı labirent testinde platformun açık kolunda (A), kapalı kolunda (B), orta alanda (C) geçirdikleri sürenin ve açık kola geçme sıklıklarının (D) yüzde değişimi.

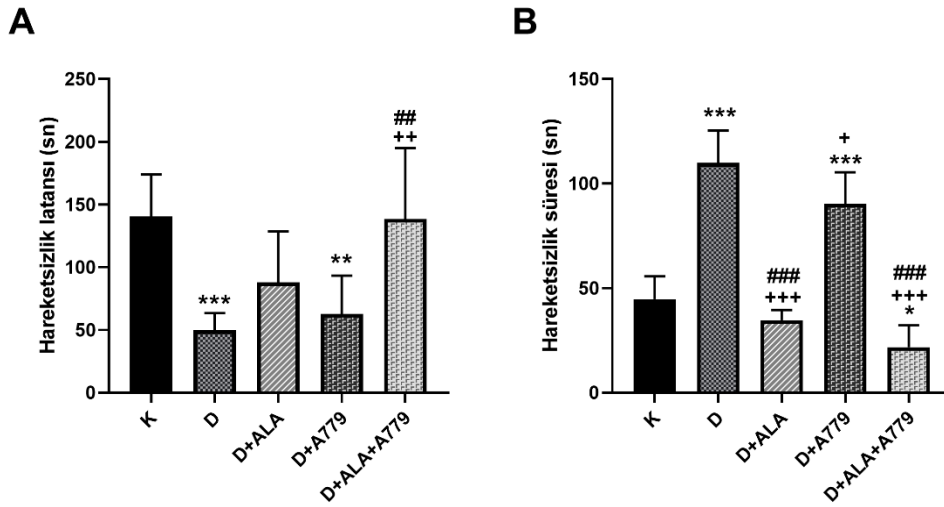
* $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$, kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlılık; + $p<0.05$, ++ $p<0.01$, +++ $p<0.001$, D grubuna göre istatistiksel anlamlılık; # $p<0.05$, ## $p<0.01$, ### $p<0.001$, D+A779 grubuna göre istatistiksel anlamlılık.



Şekil 4-7: Deney gruplarının yükseltilmiş artı labirent testinin açık ve kapalı kollarında geçirdikleri toplam mesafenin iz haritası.

4.2.4. ZORUNLU YÜZME TESTİ BULGULARI

Depresyonda meydana gelen öğrenilmiş çaresizlik davranışını test etmek için zorunlu yüzme testi uygulandı. Buna göre hayvanların ilk hareketi bıraktıkları süreye bakıldığında zaman D ($p<0.001$) ve D+A779 ($p<0.01$) gruplarında kontrol grubuna göre anlamlı bir azalma meydana geldi. Bunun aksine D+ALA+A779 grubunda hareketsizlik latansının D ($p<0.01$) ve D+A779 ($p<0.01$) gruplarına göre anlamlı olarak arttığı saptandı (Şekil 4-8A). Hayvanların toplam hareketsiz kaldığı süre kontrol grubuna kıyasla D ve D+A779 gruplarında anlamlı ($p<0.001$) olarak artmışken, D+ALA+A779 grubunda ise anlamlı ($p<0.05$) bir azalma meydana geldi. D+ALA ($p<0.001$), D+A779 ($p<0.05$) ve D+ALA+A779 ($p<0.001$) gruplarında D grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir azalış belirlendi. Son olarak hem D+ALA hem de D+ALA+A779 gruplarında hareketsizlik süresi D+A779 grubuna göre anlamlı ($p<0.001$) bir şekilde azalmış olarak bulundu (Şekil 4-8B).

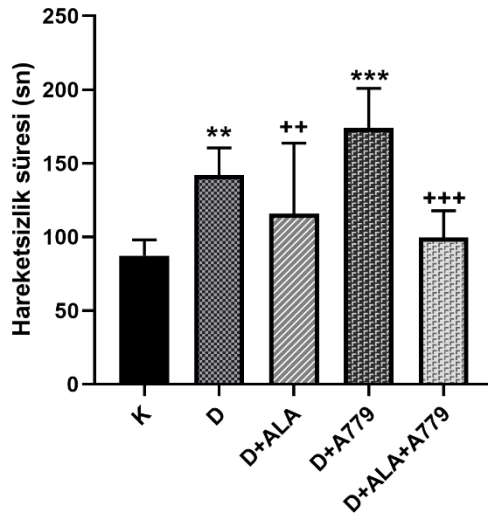


Şekil 4-8: Deney gruplarının zorunlu yüzme testindeki hareketsizlik latansı (A) ile toplam hareketsiz kalma süreleri (B).

* $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$, kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlılık; + $p<0.05$, ++ $p<0.01$, +++ $p<0.001$, D grubuna göre istatistiksel anlamlılık; ## $p<0.01$, ### $p<0.001$, D+A779 grubuna göre istatistiksel anlamlılık.

4.2.5. KUYRUKTAN ASMA TESTİ BULGULARI

Zorunlu yüzme testini desteklemek amacıyla yapılan kuyruktan asma testi sonuçları da zorunlu yüzme testi ile paralellik gösterdi. Hayvanların toplam hareketsizlik süresi D ($p<0.01$) ve D+A779 ($p<0.001$) gruplarında kontrol grubuna göre anlamlı olarak artış gösterdi. Buna karşın D+ALA ($p<0.01$) ve D+ALA+A779 ($p<0.001$) gruplarında D grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir azalma meydana geldi (Şekil 4-9).



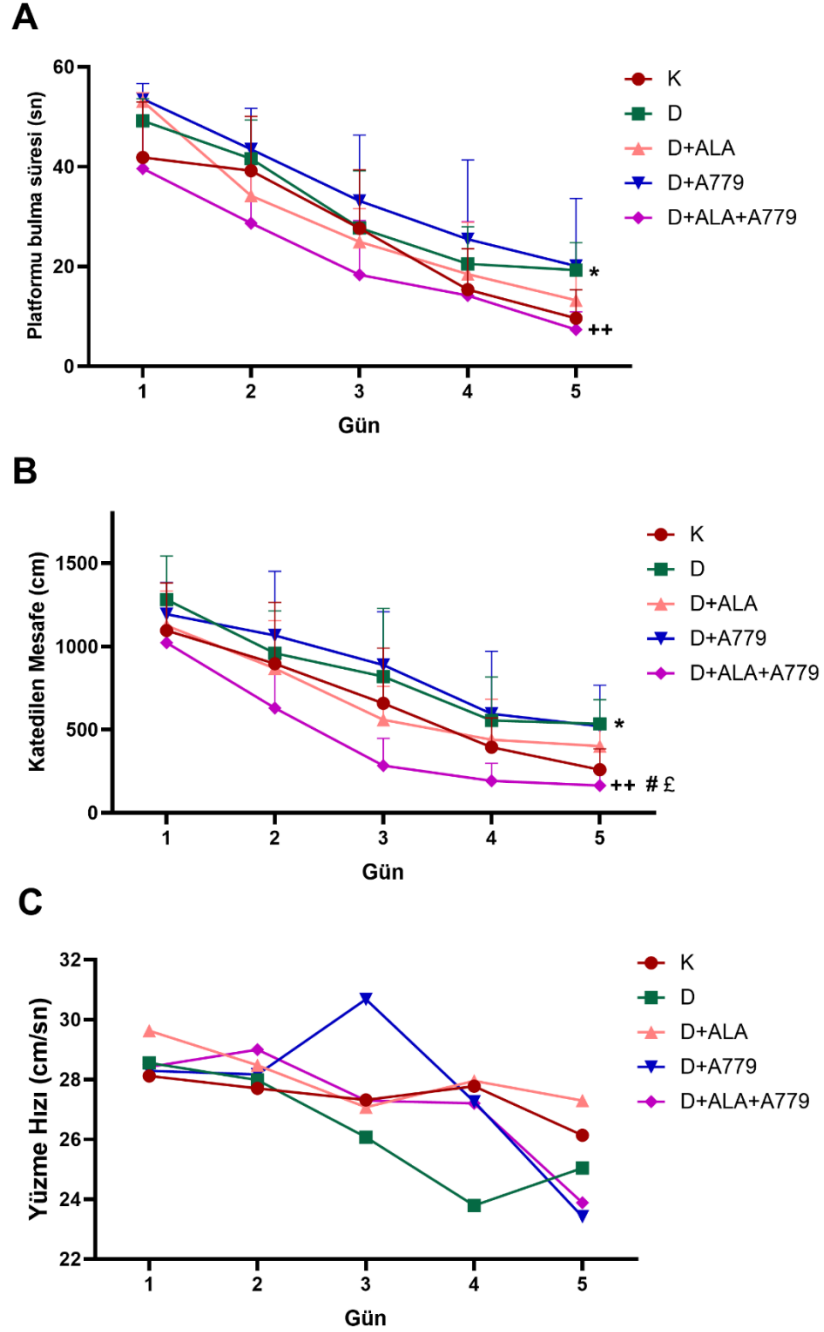
Şekil 4-9: Deney gruplarının kuyruktan asma testinde toplam hareketsiz kaldıkları süre ** $p<0.01$, *** $p<0.001$, kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlılık; ++ $p<0.01$, +++ $p<0.001$, D grubuna göre istatistiksel anlamlılık.

4.2.6. MORRİS SU LABİRENTİ TESTİ BULGULARI

4.2.6.1. Öğrenme Periyodu Bulguları

Öğrenme periyodu bulguları değerlendirildiğinde, tüm gruplarda deneyin ilk ve son günleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulundu. ($p<0.001$). Gruplar arası kıyaslamaya bakıldığında, deneyin son günü D grubunun platformu bulma süresi kontrol grubuna göre anlamlı olarak ($p<0.05$) yüksek bulundu. D+ALA+A779 grubunun platformu bulma süresi ise D grubuna göre anlamlı ($p<0.01$) olarak azalmış bulundu (Şekil 4-10A). Platformu bulma süresine benzer şekilde toplam katedilen mesafe de tüm gruplarda deneyin son gününde ilk gününe kıyasla anlamlı olarak bir azalma görüldü ($p<0.001$). Katedilen toplam mesafe D grubunda kontrol grubuna göre anlamlı ($p<0.05$) olarak arttı. Katedilen mesafenin en az olduğu grup D+ALA+A779 grubu olarak tespit edildi. Bu azalma; D grubu ($p<0.01$), D+A779 grubu ($p<0.05$) ve D+ALA grubu ($p<0.05$) ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bulundu.

(Şekil 4-10B). Son olarak deney gruplarının yüzme hızları karşılaştırıldığında gruplar arası anlamlı bir farklılık bulunamadı (Şekil 4-10C).

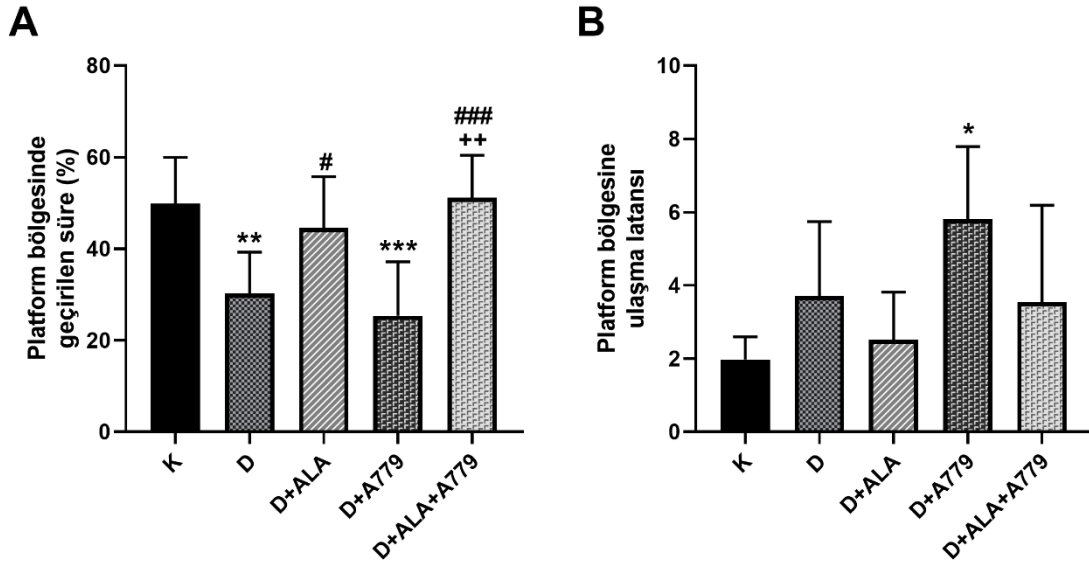


Şekil 4-10: Deney gruplarının Morris su labirenti testinin öğrenme periyodundaki platformu bulma süreleri (A), toplam katettikleri mesafe (B) ve yüzme hızları (C).

* $p<0.05$, kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlılık; ** $p<0.01$, D grubuna göre istatistiksel anlamlılık; # $p<0.05$ D+A779 grubuna göre istatistiksel anlamlılık, § $p<0.05$ D+ALA grubuna göre istatistiksel anlamlılık.

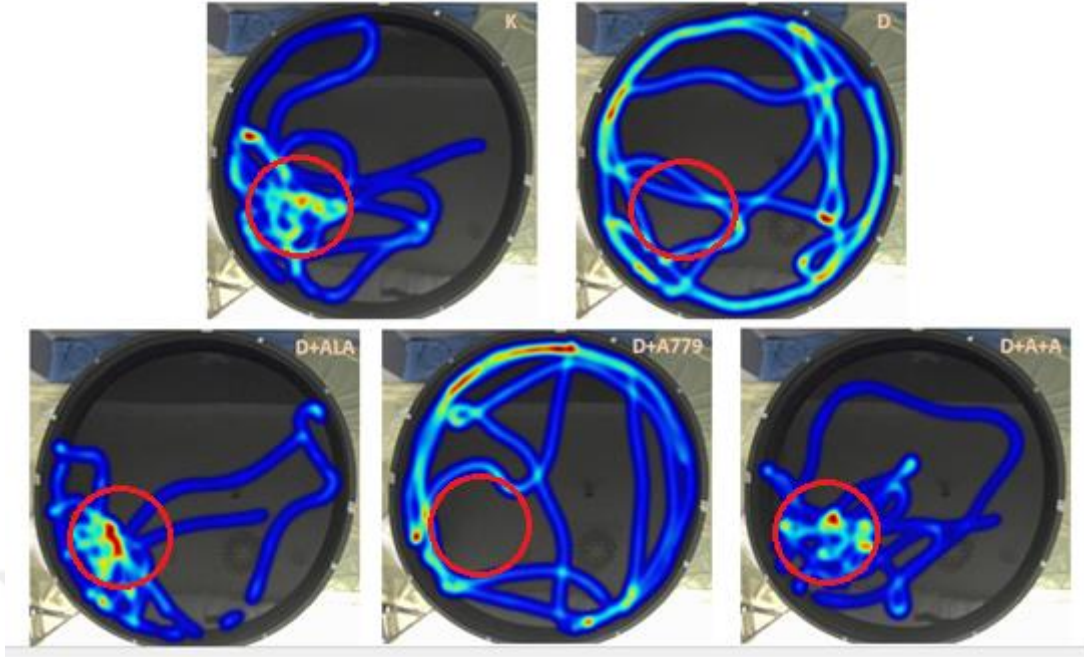
4.2.6.2. Test Periyodu Bulguları

Morris su labirenti testinin test periyodunda platform bölgesinde geçirilen süre kontrol grubuna kıyasla D ($p<0.01$) ve D+A779 ($p<0.001$) gruplarında anlamlı olarak azaldı. D+ALA ($p<0.05$) ve D+ALA+A779 ($p<0.001$) gruplarında D+A779 grubuna göre anlamlı bir artış görüldü. Ayrıca D+ALA+A779 grubunda D grubuna göre de anlamlı ($p<0.01$) bir artış tespit edildi (Şekil 4-11A; Şekil 4-12). Deney gruplarının platform bölgesine ulaşma süresinin kontrol grubuna göre en fazla en fazla D+A779 grubunda olduğu saptandı ($p<0.05$) (Şekil 4-11B).



Şekil 4-11: Deney gruplarının Morris su labirenti testinin test periyodunda platform bölgesinde geçirdikleri sürenin tankta toplam geçirdikleri süreye oranının yüzde değişimi (A), deney hayvanlarının platform bölgesine ulaşma latansı (B).

* $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$, kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlılık; ** $p<0.01$, D grubuna göre istatistiksel anlamlılık; # $p<0.05$, ### $p<0.001$, D+A779 grubuna göre istatistiksel anlamlılık.



Şekil 4-12: Deney gruplarının Morris su labirenti testinin test periyodunda platform bölgesinden geçme sıklığının iz haritası.

BİYOKİMYASAL BULGULAR

4.2.7. HİPOKAMPUS DOKUSU ELISA BULGULARI

Hipokampus dokusundan elde edilen süpernatantlarda ölçülen NMDA düzeyleri D ve D+A779 gruplarında kontrol grubuna göre anlamlı ($p<0.01$) olarak azaldı. D+ALA ve D+ALA+A779 gruplarında ise hem D hem de D+A779 gruplarına göre anlamlı ($p<0.01$) bir artış meydana geldi. GABA düzeyleri en yüksek D grubunda tespit edildi ve bu artış kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0.001$). D+ALA ($p<0.001$), D+A779 ($p<0.01$) ve D+ALA+A779 ($p<0.01$) gruplarında ise D grubuna göre anlamlı bir azalma görüldü. CREB düzeyleri D+ALA grubunda D ($p<0.01$) ve D+A779 ($p<0.05$) gruplarına göre anlamlı bir artış gösterdi. BDNF düzeyleri D ve D+A779 gruplarında kontrol grubuna göre anlamlı ($p<0.01$) olarak azalırken, D+ALA grubunda D ve D+A779 gruplarına göre anlamlı ($p<0.05$) olarak arttı. Hipokampus dokusundaki anjiyotensinojen düzeyleri en yüksek D+ALA grubunda tespit edilirken bu artış D+A779 grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0.05$). Anjiyotensin (1-7) düzeyleri D+A779 ($p<0.001$) ve D+ALA+A779 ($p<0.05$) gruplarında kontrol grubuna göre anlamlı olarak arttı. D+ALA grubunda ise D+A779 grubuna göre anlamlı ($p<0.05$) olarak azaldı. MrgD düzeyleri D+ALA ve D+ALA+A779 gruplarında kontrol ($p<0.05$) ve D+A779 ($p<0.01$) gruplarına göre anlamlı artış gösterdi. İnflamasyon belirteçleri olan IL-6, IL-1 β ve TNF- α düzeyleri D ($p<0.001$) ve D+A779 ($p<0.05$, $p<0.01$) gruplarında

kontrol grubuna göre anlamlı olarak arttı. Bunlara ek olarak IL-6 düzeyleri D+ALA+A779 grubunda da kontrol grubuna göre anlamlı ($p<0.05$) olarak arttı. IL-1 β ve TNF- α düzeyleri hem D+ALA ($p<0.001$) hem de D+ALA+A779 ($p<0.001$, $p<0.05$) gruplarında D grubuna göre anlamlı bir azalma gösterdi. Buna ek olarak TNF- α düzeyleri D+ALA ($p<0.01$) ve D+ALA+A779 ($p<0.05$) gruplarında D+A779 grubuna göre anlamlı olarak azaldı. SOD düzeyleri D ve D+A779 gruplarında kontrol grubuna göre anlamlı ($p<0.05$) olarak azalırken, D+ALA grubunda D+A779 grubuna göre anlamlı ($p<0.05$) olarak arttı. MDA düzeyleri kontrol ($p<0.001$), D+ALA ($p<0.05$) ve D+A779 ($p<0.05$) gruplarında D grubuna göre anlamlı olarak azaldı. Hipokampus dokusundaki katalaz düzeyleri en düşük D+A779 grubunda saptanırken bu azalış kontrol ($p<0.01$), D+ALA ($p<0.01$) ve D+ALA+A779 ($p<0.05$) gruplarına göre anlamlı bulundu. Buna ek olarak D+ALA grubunda D grubuna göre anlamlı ($p<0.01$) bir artış meydana geldi (Tablo 4-1).

Tablo 4-1: Hipokampus dokusundan elde edilen süpernatantlarda NMDA, GABA, CREB, BDNF, AGT, MrgD, NF- κ B, IL-6, IL-1 β , TNF- α , SOD, MDA ve CAT'ın ortalama $\pm$ standart sapma değerleri (* $p<0.05$, ** $p<0.01$, * $p<0.001$, kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlılık; * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$, D grubuna göre istatistiksel anlamlılık; # $p<0.05$, ## $p<0.01$, ### $p<0.001$, D+A779 grubuna göre istatistiksel anlamlılık)**

HİPOKAMPUS					
PARAMETRE	K	D	D+ALA	D+A779	D+ALA+A779
NMDA (ng/gr)	10.23 $\pm$ 2.49	5.96 $\pm$ 1.66**	10.57 $\pm$ 1.87 ^{+,##}	6.75 $\pm$ 2.29**	10.38 $\pm$ 1.41 ^{+,##}
GABA (μ mol/gr)	289.2 $\pm$ 71.02	478.7 $\pm$ 32.14***	296.2 $\pm$ 54.13 ⁺⁺⁺	357.8 $\pm$ 80.65 ⁺⁺	291.3 $\pm$ 62.2 ⁺⁺⁺
CREB (pg/gr)	868.5 $\pm$ 303	647.2 $\pm$ 164.4	1081 $\pm$ 179.3 ^{+,#}	687.3 $\pm$ 204	983.4 $\pm$ 249.8
BDNF (ng/gr)	4.77 $\pm$ 1.29	2.05 $\pm$ 1.26**	4.15 $\pm$ 0.91 ^{+,#}	2.05 $\pm$ 1.36**	3.83 $\pm$ 1.02
AGT (ng/gr)	43.73 $\pm$ 16.24	43.9 $\pm$ 13.66	47.58 $\pm$ 6.44 [#]	30.28 $\pm$ 5.12	42.54 $\pm$ 15.8
ANG (1-7) (ng/gr)	501.8 $\pm$ 59.02	581.5 $\pm$ 67.66	551 $\pm$ 24.44 ⁺	669.6 $\pm$ 128.1***	619 $\pm$ 46.36*
MrgD (ng/gr)	18.59 $\pm$ 8.38	24.41 $\pm$ 9.45	30.05 $\pm$ 8.96 ^{*,##}	15.54 $\pm$ 1.82	33.1 $\pm$ 13.19 ^{*,##}
NF- κ B (ng/gr)	4.56 $\pm$ 1.54	5.66 $\pm$ 2.68	3.8 $\pm$ 1.4	5.31 $\pm$ 2.75	3.65 $\pm$ 1.68
IL-6 (pg/gr)	6.92 $\pm$ 1.12	11.21 $\pm$ 2.54***	8.83 $\pm$ 1.17	9.75 $\pm$ 0.79*	9.89 $\pm$ 1.68*
IL-1 β (pg/gr)	8.09 $\pm$ 0.69	19.18 $\pm$ 4.07***	9.39 $\pm$ 1.09 ⁺⁺⁺	14.56 $\pm$ 3.86**	12.9 $\pm$ 4.78 ⁺
TNF- α (pg/gr)	123.8 $\pm$ 20.35	219.7 $\pm$ 39.23***	126.4 $\pm$ 27.78 ^{+++,#}	196.6 $\pm$ 38.25**	139.1 $\pm$ 23.2 ^{+++,#}
SOD (ng/gr)	50.36 $\pm$ 13.77	28.3 $\pm$ 6.86*	47.98 $\pm$ 15.58 [#]	24.05 $\pm$ 17.43*	43.23 $\pm$ 15.99
MDA (nmol/gr)	9.21 $\pm$ 2.38	19.55 $\pm$ 8.18***	12.16 $\pm$ 1.37 ⁺	12.83 $\pm$ 2.81 ⁺	14.01 $\pm$ 2.53
CAT (ng/gr)	136.2 $\pm$ 26.84	98.14 $\pm$ 7.64	157.3 $\pm$ 38.02 ^{+,###}	84.19 $\pm$ 10.59*	133.1 $\pm$ 34.03 [#]

4.2.8. PREFRONTAL KORTEKS DOKUSU ELISA BULGULARI

Prefrontal korteks dokusunda yapılan biyokimyasal analizlere göre en düşük NMDA düzeyleri D grubunda görüldü. D grubu kontrol ve D+ALA grupları ile karşılaştırıldığında, bu azalmanın istatistiksel olarak anlamlı olduğu saptandı ($p<0.05$). Bunun aksine GABA düzeyleri ise en yüksek D grubunda tespit edildi ve D grubu kontrol ($p<0.01$) ve D+ALA ($p<0.05$) grupları ile karşılaştırıldığında bu artışın anlamlı olduğu görüldü. BDNF düzeyleri incelendiğinde D, D+ALA ve D+A779 gruplarının BDNF düzeyleri kontrol grubuna göre anlamlı ($p<0.001$) olarak düşük bulundu. D+ALA+A779 grubunda ise D+A779 grubuna göre anlamlı ($p<0.05$) bir artış bulundu. Prefrontal korteks dokusunda anjiyotensinojen düzeylerinde bir anlamlılık tespit edilemezken, MrgD düzeyleri D ve D+ALA gruplarına göre anlamlı ($p<0.05$) olarak yüksek bulundu. NF- κ B düzeyleri de MrgD düzeylerine benzer şekilde en fazla D+ALA+A779 grubunda arttı ve bu artış D grubuna göre anlamlı bulundu ($p<0.01$). IL-6 düzeylerinin D grubunda kontrol ve D+ALA grubuna göre anlamlı ($p<0.05$) olarak arttığı tespit edildi. IL-1 β düzeyleri ise D+ALA grubunda D grubuna göre anlamlı ($p<0.05$) olarak azaldı. İnflamatuar belirteçler arasında en büyük değişim TNF- α 'da saptandı. TNF- α düzeyleri en yüksek D+A779 grubunda tespit edilirken, bu artış kontrol ($p<0.001$), D+ALA ($p<0.001$) ve D+ALA+A779 ($p<0.05$) gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı bulundu. D grubunda ise kontrol ve D+ALA grubuna kıyasla anlamlı ($p<0.01$) bir artış mevcuttu. Katalaz düzeyleri D ve D+ALA gruplarında kontrol grubuna göre anlamlı ($p<0.05$) olarak azaldı (Tablo 4-2).

Tablo 4-2: Prefrontal kortkes dokusundan elde edilen süpernatantlarda NMDA, GABA, CREB, BDNF, AGT, MrgD, NF- κ B, IL-6, IL-1 β , TNF- α , MDA ve CAT $\pm$ standart sapma değerleri (*p<0.05, **p<0.01, *p<0.001, kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlılık; +p<0.05, ++p<0.01, +++p<0.001, D grubuna göre istatistiksel anlamlılık; #p<0.05, ##p<0.01, ###p<0.001, D+A779 grubuna göre istatistiksel anlamlılık; †p<0.05, ‡p<0.001, D+ALA grubuna göre istatistiksel anlamlılık)**

PREFRONTAL KORTEKS					
PARAMETRE	K	D	D+ALA	D+A779	D+ALA+A779
NMDA (ng/gr)	5.19 $\pm$ 1.89	2.38 $\pm$ 0.9*	5.02 $\pm$ 3.06*	3.02 $\pm$ 0.92	4.58 $\pm$ 1.85
GABA (μ mol/gr)	85.99 $\pm$ 22	200.3 $\pm$ 95.86**	98.25 $\pm$ 12.91*	147.6 $\pm$ 29.96	117.7 $\pm$ 46.39
CREB (pg/gr)	393.1 $\pm$ 102.3	269.5 $\pm$ 154.1	230.7 $\pm$ 78.39	349 $\pm$ 179.2	375.9 $\pm$ 125.2
BDNF (ng/gr)	2.87 $\pm$ 0.16	1.04 $\pm$ 0.78***	1.55 $\pm$ 0.61***	0.86 $\pm$ 0.75***	1.96 $\pm$ 0.59#
AGT (ng/gr)	1.63 $\pm$ 1.21	1.19 $\pm$ 0.87	0.87 $\pm$ 0.61	1.65 $\pm$ 0.78	1.29 $\pm$ 0.86
MrgD (ng/gr)	9.65 $\pm$ 5.8	6.96 $\pm$ 2.32	6.75 $\pm$ 2.38	7.83 $\pm$ 4.21	16.63 $\pm$ 6.18 ^{†,‡}
NF- κ B (ng/gr)	1.76 $\pm$ 1.47	0.61 $\pm$ 0.36	1.81 $\pm$ 0.93	1.86 $\pm$ 0.29	2.3 $\pm$ 0.54 ⁺⁺
IL-6 (pg/gr)	5.04 $\pm$ 2.02	8.24 $\pm$ 0.99*	4.83 $\pm$ 1.56*	6.35 $\pm$ 2.25	6.54 $\pm$ 1.31
IL-1 β (pg/gr)	4.03 $\pm$ 1.72	7.43 $\pm$ 3.29	3.43 $\pm$ 0.35*	6.54 $\pm$ 3	5.78 $\pm$ 2.45
TNF- α (pg/gr)	47.64 $\pm$ 11.62	78.03 $\pm$ 12**	46.06 $\pm$ 8.03 ^{†,###}	86.28 $\pm$ 21.93**	57.93 $\pm$ 17.49#
MDA (nmol/gr)	7.75 $\pm$ 4.85	4.76 $\pm$ 2.45	4.76 $\pm$ 2.71	6.55 $\pm$ 2.44	4.52 $\pm$ 1.72
CAT (ng/gr)	40.85 $\pm$ 15.58	25.76 $\pm$ 15.25*	22.74 $\pm$ 8.27*	33.44 $\pm$ 10.4	29.98 $\pm$ 6.16

4.2.9. SERUM ELISA BULGULARI

Serum epinefrin düzeyleri D+A779 grubunda kontrol ve D gruplarına göre anlamlı (p<0.001) olarak arttı. D+ALA grubunda ise D+A779 grubuna göre anlamlı (p<0.001) bir azalma görüldü. Epinefrin düzeyi en düşük D+ALA+A779 grubunda saptandı ve bu azalış D (p<0.05) ve D+A779 (p<0.001) gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı bulundu. Epinefrine benzer şekilde serum kortizol düzeyleri de en düşük D+ALA+A779 grubunda görüldü ve bu azalış D (p<0.05), A+A779 (p<0.001) ve D+ALA (p<0.05) gruplarına göre anlamlı bulundu. D (p<0.01) ve D+A779 (p<0.05) gruplarında ise kontrol grubuna göre anlamlı bir artış vardı. Prefrontal kortekse benzer şekilde serum anjiyotensinojen seviyelerinde de anlamlı bir değişim meydana gelmedi. IL-6 düzeyleri D grubunda D+ALA ve D+ALA+A779 gruplarına göre anlamlı (p<0.05) olarak artarken, D+ALA grubunda D+A779 grubuna göre anlamlı (p<0.05) olarak azaldı. IL-1 β düzeyleri en fazla D+A779 grubunda artış gösterdi ve bu artış D, D+ALA ve

D+ALA+A779 gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0.001$). D+ALA+A779 grubunda ise kontrol grubuna göre anlamlı bir azalma ($p<0.01$) görüldü. Prefrontal korteks dokusundaki gibi en fazla değişim TNF- α düzeylerinde meydana geldi. Buna göre D+ALA, A+A779 ve D+ALA+A779 gruplarında kontrol ($p<0.01$, $p<0.001$) ve D ($p<0.05$, $p<0.001$, $p<0.05$) gruplarına göre anlamlı bir artış saptandı. SOD düzeyleri en yüksek D+ALA+A779 grubunda tespit edilirken, bu artış kontrol ($p<0.001$), D ($p<0.001$) ve D+A779 ($p<0.01$) gruplarına göre anlamlı bulundu. D+ALA grubunda da kontrol ve D grubuna göre anlamlı ($p<0.05$) bir artış saptandı. Katalaz düzeyleri en düşük D+ALA grubunda tespit edilirken, bu azalış D grubuna göre anlamlı bulundu ($p<0.05$). Son olarak COX-2 düzeyleri D ($p<0.05$) ve D+A779 ($p<0.001$) gruplarında kontrol grubuna göre anlamlı olarak arttı, D+ALA+A779 grubunda ise D ($p<0.05$) ve D+A779 ($p<0.001$) gruplarına göre anlamlı olarak azaldı. D+ALA grubunda ise D+A779 grubuna göre anlamlı ($p<0.01$) bir azalma tespit edildi (Tablo 4-3).

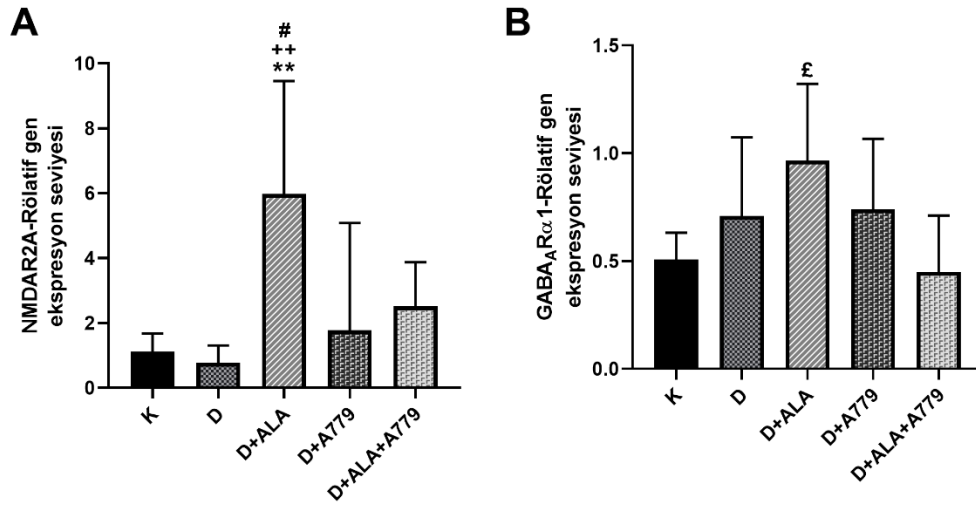
Tablo 4-3: Serum epinefrin, kortizol, AGT, IL-6, IL-1 β , TNF- α , SOD, MDA, CAT ve COX-2 $\pm$ standart sapma değerleri (* $p<0.05$, ** $p<0.01$, * $p<0.001$, kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlılık; + $p<0.05$, ++ $p<0.01$, +++ $p<0.001$, D grubuna göre istatistiksel anlamlılık; # $p<0.05$, ## $p<0.01$, ### $p<0.001$, D+A779 grubuna göre istatistiksel anlamlılık; § $p<0.05$, D+ALA grubuna göre istatistiksel anlamlılık).**

SERUM					
PARAMETRE	K	D	D+ALA	D+A779	D+ALA+A779
Epinefrin (ng/L)	58.8 $\pm$ 32.23	108.1 $\pm$ 25.21	68.49 $\pm$ 26.24###	204.7 $\pm$ 66.97***,+++	50.74 $\pm$ 18.13*,###
Kortizol (ng/ml)	38.83 $\pm$ 5.17	58.88 $\pm$ 8.83**	42.3 $\pm$ 16.43+	55.81 $\pm$ 13.15*	27.08 $\pm$ 8.17++*,§,###
AGT (ng/ml)	11.84 $\pm$ 5.47	10.1 $\pm$ 1.8	13.8 $\pm$ 4.05	12.96 $\pm$ 4.72	16.14 $\pm$ 6.87
IL-6 (pg/ml)	2.82 $\pm$ 0.64	4.8 $\pm$ 2.31	2.11 $\pm$ 1.02+,#	4.54 $\pm$ 2.62	2.35 $\pm$ 1.46+
IL-1 β (pg/ml)	4.18 $\pm$ 0.92	3.24 $\pm$ 0.58	3.36 $\pm$ 0.18###	5.11 $\pm$ 1.18+++	2.57 $\pm$ 1.26**,###
TNF- α (pg/ml)	66.02 $\pm$ 10.99	69.5 $\pm$ 5.3	79.9 $\pm$ 7.43**,+	85.49 $\pm$ 5.07***,+++	80.04 $\pm$ 6.45***,+
SOD (ng/ml)	11.5 $\pm$ 2.34	11.65 $\pm$ 3.2	17.27 $\pm$ 5.14*,+	13.74 $\pm$ 2.38	21.36 $\pm$ 7.92***,+++ ,###
MDA (nmol/ml)	6.45 $\pm$ 0.78	7.59 $\pm$ 1.56	7.04 $\pm$ 0.74	6.56 $\pm$ 1.76	6.85 $\pm$ 1.97
CAT (ng/ml)	16.84 $\pm$ 4.64	21.64 $\pm$ 1.71	15.38 $\pm$ 5.19+	18.74 $\pm$ 7.43	18.29 $\pm$ 4.6
COX-2 (ng/ml)	0.43 $\pm$ 0.31	2 $\pm$ 2.02*	0.59 $\pm$ 0.48##	2.69 $\pm$ 1.32***	0.4 $\pm$ 0.17+,###

4.3. GEN EKSPRESYON ANALİZLERİ

4.3.1. NMDAR2A ve GABAAR α 1 Ekspresyon Düzeyi

Hipokampus dokusunda yapılan gen ekspresyon analizleri sonucunda NMDA2RA reseptör ekspresyonunun en fazla D+ALA grubunda olduğu ve bu artışın kontrol ($p<0.01$), D ($p<0.01$) ve D+A779 ($p<0.05$) gruplarına göre anlamlı olduğu belirlendi (Şekil 4-13A). GABAAR α 1 ekspresyonu ise D+ALA grubunda D+ALA+A779 grubuna göre anlamlı ($p<0.05$) olarak arttı (Şekil 4-13B).

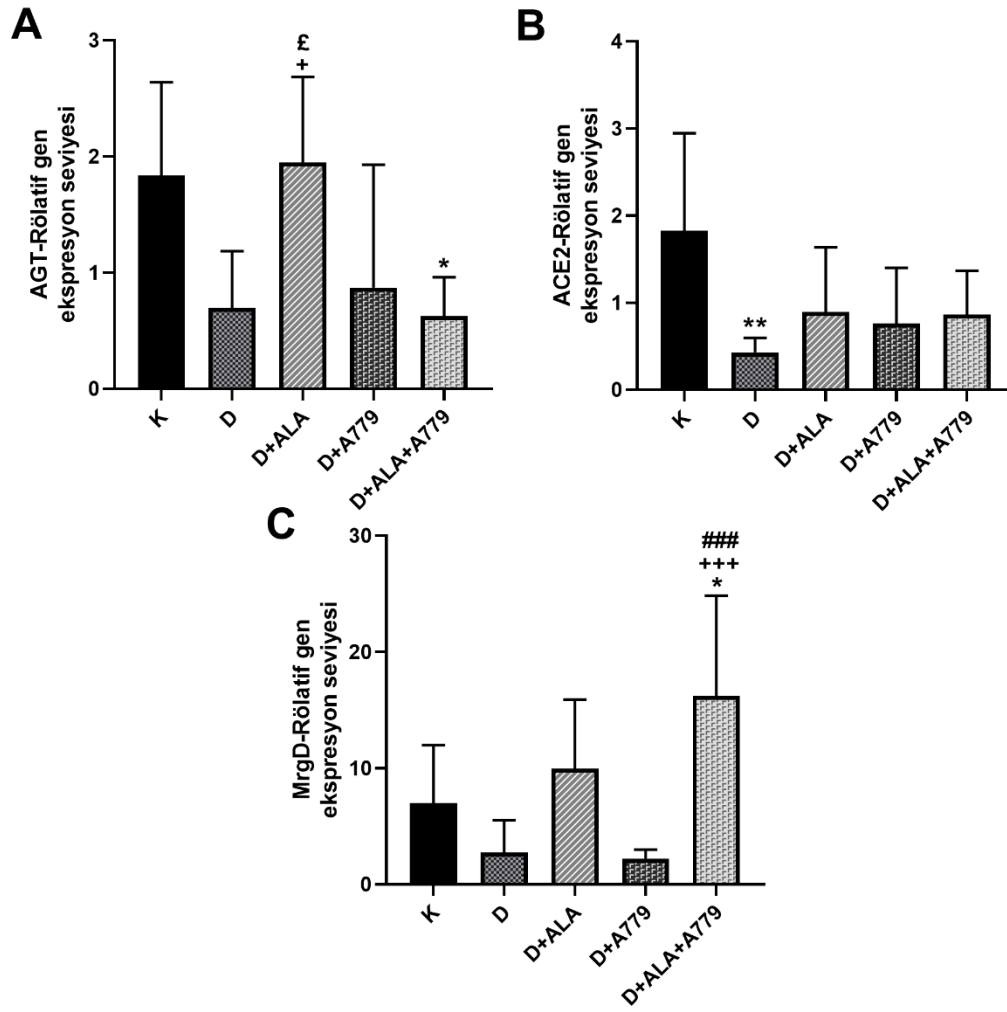


Şekil 4-13: Deney gruplarında hipokampus NMDAR2A (A) ve GABAAR α 1 (B) reseptörlerinin rölatif gen ekspresyon seviyeleri.

** $p<0.01$, kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlılık; ++ $p<0.01$, D grubuna göre istatistiksel anlamlılık; # $p<0.05$, D+A779 grubuna göre istatistiksel anlamlılık; £ $p<0.05$, D+ALA+A779 grubuna göre istatistiksel anlamlılık.

4.3.2. AGT, ACE2 ve MrgD Ekspresyon Düzeyi

Hipokampal AGT ekspresyonu D+ALA+A779 grubunda kontrol grubuna göre anlamlı ($p<0.05$) olarak azalırken, D+ALA grubunda D ve D+ALA+A779 gruplarına göre anlamlı ($p<0.05$) bir artış görüldü (Şekil 4-14A). ACE2 ekspresyon düzeyleri en az D grubundaydı ve bu azalış kontrol grubuna göre anlamlı bulundu ($p<0.01$) (Şekil 4-14B). Son olarak MrgD reseptör ekspresyonu D+ALA+A779 grubunda kontrol ($p<0.05$), D ($p<0.001$) ve D+A779 ($p<0.001$) gruplarına kıyasla anlamlı olarak arttı (Şekil 4-14C).



Şekil 4-14: Deney gruplarında hipokampus AGT (A), ACE-2 (B) ve MrgD reseptörünün (C) rölatif gen ekspresyon seviyeleri.

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlılık; [†] $p < 0.05$, ⁺⁺⁺ $p < 0.001$, D grubuna göre istatistiksel anlamlılık; ^{###} $p < 0.001$, D+A779 grubuna göre istatistiksel anlamlılık; [‡] $p < 0.05$, D+ALA+A779 grubuna göre istatistiksel anlamlılık.

5. TARTIŞMA

Depresyon, genellikle depresif ruh hali, uyku bozuklukları, çoğu aktiviteye ilgi kaybı, hayata karşı düşük heyecan ve hatta intihar düşüncesi gibi bir dizi semptomun eşlik ettiği yaygın bir psikolojik veya duygusal bozukluktur [155]. Ayrıca depresyon, dünya çapında yaklaşık 350 milyon insanı etkileyen, aileler ve toplum üzerinde önemli bir ekonomik yüke ve ciddi psikolojik baskıya yol açan kronik ve yaşamı tehdit eden zihinsel bir bozukluktur. Depresyonun patogeneğinde monoaminler, oksidatif stres, nöroinflamasyon ve RAS rol oynar. Sistemik RAS'a ek olarak, depresyon ve anksiyetenin patofizyolojisinde rol oynayan RAS'ın tüm bileşenleri beyinde bağımsız olarak bulunur [156]. Her ne kadar anjiyotensinojen, pro-renin ve reninin kan beyin bariyerini geçmediği ileri sürülse de yapılan çalışmalar dolaşımdaki RAS ve beyindeki RAS'ın bağlantılı olduğunu göstermektedir [157]. Yüksek RAS aktivitesinin nöroinflamasyon, stres ve oksidatif stresin indüksiyonu ile depresyon ve anksiyeteye yol açtığı düşünülmektedir. Dahası, RAS blokajının, anti-inflamatuar ve anti-oksidatif stres etkilerine sahip olabileceği ve bu yolla anksiyete ve depresyonun gelecekteki tedavisi için teorik bir temel sağlayabileceği ileri sürülmektedir. Bunlara ek olarak beyindeki RAS'ın aşırı aktivasyonunun bilişsel fonksiyon bozukluğu ve nörodejeneratif hastalık gelişimiyle ilişkili olduğu gösterilmiştir [157,158].

Son yıllarda yapılan çalışmalar, kronik öngörülemez hafif stresin kaygı ve depresyon benzeri davranışlara yol açtığını göstermiştir [159]. KÖHS modelinde, sıçanlar art arda, tahmin edemeyecekleri sırayla çeşitli stres faktörlerine maruz bırakılarak depresyonlu hastalarda gözlemlenenlere benzer bir dizi uzun vadeli fiziksel, davranışsal, nörokimyasal ve nöroendokrin değişiklikler tetiklenmektedir. Çalışmamızda sıçanlar 35 günlük KÖHS uygulamasına maruz bırakılmıştır.

Stres maruziyeti sonucu vücutta meydana gelen değişikliklerden ilki serum kortizol düzeylerinde artış, gıda alımında değişiklik ve vücut ağırlığındaki değişimlerdir [160,161]. Yapılan çalışmalara göre vücut ağırlığı stres etkeninin türü, yoğunluğu ve süresinden etkilenebilir. Örneğin sıçanlara uygulanan 20 günlük bir stresin ardından serum kortikosteron seviyeleri yükselse bile vücut ağırlığında bir değişim gözlemlenmeyebilir ve bu muhtemelen stresin etkilerini telafi etmeye katılan direnç sistemlerinden kaynaklanmaktadır. Bununla

birlikte, yaklaşık 40 günlük stresin ardından bu telafi edici mekanizmalar baskılanır ve kortikosteronun etkisine karşı direnç oluşması nedeniyle vücut ağırlığı kaybıyla sonuçlanır [160]. Çalışmamızda tüm grupların vücut ağırlığı deney süresince artış göstermiş ancak deneyin son günü yapılan ölçümlerde en düşük vücut ağırlığı depresyon grubunda saptanmıştır. Bu bulgu önceki çalışmalarla tutarlıdır. Lopez ve diğ. (2018) çalışmalarında 60 günlük KÖHS uygulamasının 30. gününe kadar tüm gruplarda belirli oranda artış kaydetmişken, KÖHS uygulamasının 40. gününde belirgin azalma olduğunu tespit etmiştir [160]. Benzer şekilde Meng ve diğ. (2022) KÖHS uygulaması boyunca vücut ağırlığı değişiminin en düşük stres grubunda olduğunu göstermiştir [162]. Bunun muhtemel nedeni stres spektrumu hipotezidir [163]. Bu hipoteze göre kronik stresin ilk 20 günlük periyodunda giderek zorlaşan koşullar altında daha uzun süre hayatta kalmayı destekleyen bir direnç meydana gelir. Stres 40 günden fazla devam ettiğinde ise, stres tepkisi muhtemelen metabolik bozuklukların alevlendiği evreye geçiş yaparak bireyin kilo kaybını destekleyecektir.

Stres yanıtlarının önemli endokrin bileşenlerinden biri glukokortikoidlerin artışıdır ve strese adaptasyon için önem teşkil etmektedir. Örneğin, depresyonlu hastaların önemli bir yüzdesinde tükürükte, plazmada ve idrarda kortizol düzeyleri artmış, hipofiz ve adrenal bezlerin büyüklüğünün yanı sıra aktivitesinde de artış görülmüştür [164]. Bu anormallik genellikle HPA eksenini negatif geri bildirim düzenlemesinin bozulmasıyla ilişkilidir. Çalışmamızda bu bilgilerle paralel olarak, depresyon gruplarında belirgin bir serum kortizol artışı gözlemlenirken, alamandin ile tedavi edilen gruplarda kortizol seviyeleri azalmıştır. Serum kortizol seviyesinin düşüklüğü ise en belirgin D+ALA+A779 grubunda tespit edilmiştir. Buna ek olarak, monoamin hipotezi kapsamında, beyindeki monoamin eksikliğinin depresyon gelişimine sebep olan nedenlerden biri olduğu açıktır. Wei ve diğ. (2017) yaptıkları çalışmada KÖHS modeli uygulanan sıçanlarda serum epinefrin ve kortizol düzeylerinde anlamlı bir azalma tespit etmiştir [161]. Çalışmamızda da benzer şekilde KÖHS uygulamasının depresyon benzeri etkilere sebep olduğu serum kortizol ve epinefrin seviyeleriyle doğrulanmaktadır. Serum epinefrin düzeyleri de hem tedavi edilmeyen depresyon grubunda hem de bloker (A779) uygulanan depresyon grubunda artış gösterirken, tedavi gruplarında önemli ölçüde azalmıştır. Kortizol sonuçlarıyla paralel olarak en belirgin etki bloker ve alamandinin birlikte uygulandığı tedavi grubunda tespit edilmiştir.

Çalışmamızda KÖHS uygulaması sonucu depresyon benzeri davranış gelişimini doğrulamak için sükröz tercih testi, açık alan testi, yükseltilmiş artı labirent testi, kuyruktan asma testi ve

zorunlu yüzme testi uygulanmıştır. Sükroz tercih testi kemirgenlerde anhedonik davranışın değerlendirilmesinde en sık kullanılan davranış testlerinden biridir [165]. Sükroz tercih testinde anhedoni kriteri, <65 sükroz tercihidir [166] ve bu kritere ulaşan kemirgenler anhedonik olarak kabul edilir. Deneyin 13. günü stres gelişiminin takibi amacıyla ve deneyin son günü 1 saatlik ve 24 saatlik sükroz tercihi değerlendirilmiştir. Deneyin 13. günü tedavi henüz başlamadan, tüm depresyon gruplarının sükroz tercihinde anlamlı azalmanın başladığı tespit edilmiştir. Deneyin son günü yapılan 1 ve 24 saatlik ölçümlerde sükroz tüketimi tedavi edilmeyen ve bloker uygulanan depresyon gruplarında 65 'lik eşiğin altına düşmüşken, alamandin tedavisi uygulanan gruplarının her ikisinde de artmıştır. Bu sonuçlar uygulanan KÖHS modeli sonucunda depresyonda karakterize edilen anhedoninin geliştiğini göstermektedir ve diğer çalışmalarla uyumludur.

Açık alan ve yükseltilmiş artı labirent testlerinde, depresyonun sık görülen bir diğer semptomu olan anksiyete benzeri davranışın değerlendirilmesi gerçekleştirilmiştir. Açık alan testinde sıçanların keşif davranışı ve genel aktivitesini ölçmek amacıyla hayvanların toplam katettikleri mesafe, orta alanda geçirdikleri süre, orta alandan geçme sıklıkları ile harekete başlama latansları değerlendirilmeye alınmıştır. Yapılan çalışmalarda deney hayvanlarının azalmış lokomotor aktivitesi ve orta alandan kaçınma istekleri depresyonla ilişkili kaygı benzeri davranışla ilişkilendirilmiştir [167,168]. Katedilen mesafe ve orta alandan geçme sıklığı değerlendirildiğinde, tedavi edilmeyen ve bloker uygulanan depresyon gruplarında tedavi gruplarına göre anlamlı bir azalma tespit edilmiştir. Buna ek olarak lokomotor aktivitenin bir diğer göstergesi olan harekete başlama latansı da en yüksek tedavi edilmeyen depresyon gruplarında saptanmış olup, deney hayvanlarında anksiyete benzeri davranışın geliştiğinin bir diğer göstergesi olarak kabul edilmiştir. Açık alan testinde ayrıca hayvanların şahlanma sayısı, temizlenme sayısı ve süresi analiz edilmiştir. Normal sıçanlar açık alana bırakıldıklarında yeni bir ortamı keşfetme içgüdülerinden dolayı artan şahlanma hareketi gösterirler, kronik strese maruziyet ise şahlanma sayısını azaltır. Ayrıca KÖHS'nin kemirgenin kürk durumunu olumsuz etkilediği bilinmektedir ve bu nedenle hayvanın temizlenme davranışında artış gerçekleşmektedir. Denmark ve diğ. (2010) çalışmalarında kronik öngörülemez hafif strese maruz bırakılan sıçanların açık alan testinde temizlenme davranışında belirgin artış olduğunu ileri sürmüştür [169]. Çalışmamızda bu bilgilere benzer şekilde şahlanma sayısının her iki depresyon grubunda azaldığı, tedavi gruplarında ise arttığı tespit edilmiştir. Ayrıca depresyon modeli oluşturulan ve tedavi edilmeyen sıçanların temizlenme sayıları ve süreleri kontrol ve

tedavi gruplarına göre, diğer çalışmalarla uyumlu olarak artış göstermiştir. Sıçanlarda anksiyete benzeri davranış gelişiminin takibini sağlamak amacıyla yükseltilmiş artı labirent testi de uygulanmış ve sıçanların açık ve kapalı kollarda geçirdiği toplam süre değerlendirilmiştir. Bu testte anti-anksiyete davranışı sıçanların açık kola giriş sıklığı ve açık kolda geçirdikleri toplam süre ile ifade edilirken, anksiyete davranışı kemirgenlerin kapalı kollar gibi korunaklı alanları tercih etmesi ile karakterize edilir. Yapılan çalışmalar, kronik öngörülemeyen hafif stres modelinin sıçanların kapalı kolda geçirdikleri süreyi belirgin biçimde arttırırken, açık kolda geçirdikleri süreyi ise kısalttığını göstermektedir [170,171]. Çalışmamızda kapalı alanda vakit geçirme sıklığı tedavi edilmeyen ve bloker uygulanan depresyon gruplarında tedavi ve kontrol gruplarına göre belirgin bir artış gösterirken, açık alanda geçirdikleri süre tedavi ve kontrol gruplarına göre belirgin bir azalma göstermiştir. Zorunlu yüzme testi ve kuyruktan asma testi, kemirgenlerde umutsuzluğun ve öğrenilmiş çaresizliğin değerlendirilmesi için yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu testlerdeki hareketsizlik davranışı genellikle umutsuzluğun veya depresyonun göstergesi olarak kabul edilmektedir [151,172]. Çalışmamızda tedavi edilmeyen depresyon gruplarının hareketsizlik latansı kontrol ve alamandin ile tedavi edilen gruplara göre anlamlı bir azalma göstermiştir. Benzer şekilde hem zorunlu yüzme testi hem de kuyruktan asma testinde hayvanların hareketsizlik süreleri tedavi edilmeyen depresyon ve bloker uygulanan depresyon gruplarında belirgin bir şekilde artmıştır. Anksiyete benzeri davranış ölçen bütün testlerin sonuçları birlikte ele alındığında, 31 günlük KÖHS uygulamasının depresyon ve anksiyete benzeri davranışlara yol açtığı belirlenmiştir, sonuçlarımız literatürdeki diğer çalışmalarla uyumludur. Alamandin tedavisi ise anksiyete benzeri davranış gelişimini önemli ölçüde engellemiştir.

Hipokampus, stres, depresyon ve antidepresanların etkileri açısından kapsamlı olarak incelenen bir beyin yapısıdır. Önceki çalışmalar hipokampusun stres kaynaklı morfolojik ve fonksiyonel değişikliklere karşı oldukça duyarlı olduğunu ileri sürmektedir [173,174]. Fonksiyonel değişikliklerin başında LTP oluşumunda ve BDNF ekspresyonunda azalma ile karakterize edilen öğrenme-bellek performansında azalma gelmektedir [175]. Yapılan çalışmalar, kronik strese maruz bırakılan sıçanlarda uzamsal hafıza bozukluklarını göstermiştir [159,176,177]. Çalışmamızda Morris su labirenti testi uzamsal hafıza değerlendirilmesi için uygulanmıştır. Morris su labirenti testinin 5 günlük öğrenme periyodu sonuçları incelendiğinde tedavi edilmeyen depresyon gruplarının performansları alamandin ile tedavi edilen gruplara göre düşük bulunmuştur. Test periyodunda da benzer şekilde tedavi edilmeyen depresyon grubu ve

bloker uygulanan depresyon grubunun platform bölgesinde geçirdiği süre kontrol ve alamandin tedavisi uygulanan gruplara oranla belirgin şekilde azalmıştır. Chen ve diğ. (2017) çalışmalarında sıçanlarda streptozotosin ile diyabet modeli oluşturmuş ve Ang-(1-7) tedavisi uygulanmıştır. Çalışmanın sonucunda Ang-(1-7)'nin morris su labirenti testinde sıçanların performansını arttırarak bilişsel bozuklukları önemli ölçüde azalttığı gösterilmiştir [177]. Çalışmamızın Morris su labirenti test periyodu bulgularına göre ise hem Ang-(1-7) yolağı bloke edilerek uygulanan alamandin grubunda, hem de yalnızca alamandin uygulanan grupta bilişsel fonksiyonlarda benzer bir artış kaydedilmiştir.

BDNF, öğrenme ve hafızayla ilgili nöroplastisite değişikliklerinde rol oynayan tropomiyozin ile ilişkili reseptör kinaz B'ye (TrkB) bağlanan nörotrofik bir faktördür. BDNF'nin TrkB reseptörlerine bağlanması, Ras ve hücre dışı sinyalle düzenlenen kinaz (Erk)1 ve 2, fosfolipaz C- γ (PLC- γ), PI3K ve protein kinaz C (PKC) dahil olmak üzere çeşitli hücre içi sinyalleri aktive eder. Daha sonra c-Jun ve c-Fos gibi çeşitli transkripsiyon faktörleri uyarılır ve CREB aktive edilir [178]. BDNF ekspresyonundaki değişiklikler depresyon, öğrenme-bellek süreci ile, özellikle de hipokampus ve parahipokampal alanlar gibi hafıza süreçleri için önemli olan yapılarla yakın ilişkilidir. BDNF, nöronal büyüme, olgunlaşma ve hayatta kalmada önemli bir rol oynar ve sinaptik plastisiteyi arttırarak öğrenmeyi ve hafızayı etkiler, ayrıca hipokampusta nörojenezi teşvik eder. Majör depresif bozukluğa sahip hastalarla yapılan postmortem çalışmalarda, hipokampus ve prefrontal korteks gibi hafıza süreçlerinde yer alan yapılarda azalan BDNF düzeyleri rapor edilmiştir [179]. Chauhan ve diğ. (2023) BDNF düzeyi düşük olan depresif hastalarda dört haftalık antidepresan tedavisinden sonra serum BDNF düzeylerinin ve depresif belirtilerin önemli ölçüde düzeldiğini ortaya çıkarmıştır [180]. Buna benzer şekilde, kronik öngörülemeyen hafif stres modelinden önce sıçan hipokampusuna BDNF infüzyonunun, Morris su labirenti testinde performans artışına sebep olduğu ve LTP'yi uyatarak öğrenme ve hafıza eksikliklerine karşı koruma sağladığı bildirilmiştir [181]. RAS, BDNF/TrkB ekseninin ekspresyonunu farklı şekillerde düzenler. Örneğin, diyabetik sıçanlarda RAS aktivasyonu, BDNF/TrkB ekseninin down-regülasyonunu indükleyerek depresyona yol açar. Ayrıca Ang II'nin, NF- κ B ekspresyonunu indükleyerek BDNF ekspresyonunu azalttığı gözlenmiştir. Bu sonuçlar, merkezi RAS'taki düzensizliğin, BDNF/TrkB ekseninin ekspresyonunu ve fonksiyonel aktivitesini azaltarak depresyon nöropatolojisini artırabileceğini düşündürmektedir [157]. Çok sayıda deneysel çalışma, Ang-(1-7) /MasR ekseninin aktivasyonunun BDNF/TrkB ekseninin ekspresyonunu desteklediğini ve bilişsel fonksiyonları

iyileştirdiğini göstermiştir [182]. Çalışmamızda hem hipokampus dokusunda hem de prefrontal kortekste tayin edilen BDNF ve CREB düzeyleri depresyon gruplarında diğer çalışmalarla tutarlı olarak azalmıştır. Tedavi gruplarında ise Morris su labirenti bulgularıyla uyumlu olarak alamandin uygulanan gruplarda artış göstermiş, ancak en belirgin artışın yalnızca alamandin uygulanan grupta olduğu saptanmıştır.

Hipokampustaki NMDA reseptörüne bağlı sinaptik plastisitenin, uzamsal hafızanın altında yatan mekanizma olduğu varsayılmaktadır. Önceki çalışmalar BDNF'nin NMDA reseptörü fosforilasyonunu desteklediğini ve bu yolla aktivitesinin artmasına yol açtığını göstermiştir [183,184]. Miranda ve diğ. (2018) de bu bilgiyi destekleyecek şekilde BDNF'nin hipokampusta bellek konsolidasyonuna aracılık etmek için NMDA reseptörü bağımlı mekanizma ile etkileşime girdiğini öne sürmüştür [183]. Çalışmamızda hem hipokampus hem de prefrontal kortekste depresyon gelişimiyle birlikte NMDA seviyeleri önemli ölçüde azalmış, bunun aksine alamandin uygulanan her iki grupta da artış meydana gelmiştir.

NMDA reseptörünün NR1, NR2 ve NR3 olmak üzere 3 temel alt tipi bulunmaktadır. Doğum sonrası ve gençlik dönemindeki beyinlerde daha yüksek miktarda NR2B (epsilon 2) ekspresyonu vardır ancak NR2A, yetişkinlikte ve ileri yaşlarda giderek daha yaygın hale gelir. NR2A (epsilon 1) alt birimlerini içeren NMDA reseptörleri, yetişkin hayvanlarda hipokampal LTP indüksiyonuna önemli katkıda bulunur ve bu nedenle hipokampusa bağlı mekansal öğrenmede geniş çapta rol oynamaktadır [185]. Bir dizi genetik çalışma, NR2A alt biriminin silinmesinin LTP'de azalma, Morris su labirenti testinde düşük performans, uzamsal ve korku hafızasında azalmaya yol açtığını göstermiştir. Farmakoloji çalışmaları, NR2A antagonistinin hipokampusta LTP oluşumunu azaltabileceğini ileri sürmektedir [186]. Çalışmamızda hipokampal NMDAR2a gen ekspresyon düzeyleri incelendiğinde depresyon grubunda en düşük seviyede olduğu, blokerle birlikte alamandin uygulamasında ise bir miktar artış meydana geldiği tespit edilmiştir. En belirgin artışın ise yalnızca alamandin uygulanan grupta olduğu saptanmıştır.

Araştırmalar, uyarıcı ve baskılayıcı sinaptik iletim dengesinin hayvanların davranışlarını düzenlediğini göstermiştir. GABA MSS'nin temel inhibitör nörotransmitteridir. Bu nörotransmitter hemen hemen tüm bilişsel ve davranışsal süreçlerin modülasyonunda önemli bir rol oynasa da klinik çalışmalar özellikle GABAerjik sistemin anksiyete ve stres yanıtlarının merkezi modülasyonundaki rolünü vurgulamıştır [187]. GABAerjik nörotransmisyonu artıran

ajanların anti-anksiyete etkilerinin altında yatan mekanizmaları açıklamak için, deney hayvanlarında çevresel stresin GABA_Aerjik fonksiyon üzerindeki etkilerini karakterize eden bir dizi çalışma mevcuttur [188,189]. Bu etkilerin karmaşık olduğu kanıtlanmıştır çünkü akut stres etkenleri, stresin türüne, stresin süresine ve incelenen beyin bölgesine bağlı olarak beyindeki GABA düzeylerini artırabilir veya azaltabilir [190]. Patolojik anksiyete durumlarında ve stresle ilişkili bozukluklarda, azalan GABA plazma konsantrasyonları, azalan beyin GABA seviyeleri ve azalan prefrontal GABA_A reseptörü rapor edilmiştir [190,191]. Hem insanlarda hem de kemirgenlerde, GABA reseptör antagonistleri genellikle anksiyojenik etkiler gösterirken, GABA reseptör agonistleri ve GABA iletimini artıran ilaçlar, stres etkenlerine veya tehditlere maruz kalma sırasında kaygıyı ve stres tepkilerini azaltır [192]. Öte yandan, GABA_Aerjik sistem öğrenme ve hafıza gibi bilişsel süreçlerde de rol almaktadır. Klinik uygulamada, benzodiazepinler veya barbitüratlar gibi GABA_Aerjik etkiyi sistemik düzeyde artıran bileşiklerin hafızayı olumsuz etkilediği bilinmektedir [193]. İlginç bir biçimde çalışmamızda hem prefrontal korteks hem de hipokampus dokularında GABA seviyelerinin depresyon gruplarında arttığı, alamandin uygulanan gruplarda ise belirgin biçimde azalarak kontrol grubuna yaklaştığı gözlemlenmiştir. GABAAR α 1 ekspresyon düzeyi ise yalnızca alamandin tedavisi uygulanan grupta en fazla artışı göstermiştir. Her ne kadar bu sonuçlar literatürdeki stres ve depresyon çalışmalarının birçoğu ile uyumsuz gibi görünse de daha önce de belirtildiği gibi strese maruziyetin süresi ve biçimi muhtemel sorumlu gibi görünmektedir. Öte yandan, GABA_Aerjik sinaptik iletimi düzenleyen anahtar moleküllerden biri BDNF'dir. BDNF, Cl⁻ taşınmasının postsinaptik düzenlenmesi yoluyla GABA_Aerjik iletimi dolaylı olarak modüle eder [194]. Depresyon gruplarındaki GABA artışı aynı zamanda BDNF düzeylerindeki azalma ile ilişkili olabilir. Buna ek olarak GABA balansındaki değişimler bilişsel beceriler üzerinde de olumsuz etki yaratmaktadır [191]. Literatürle ve önceki çalışmalarımızla uyumlu olarak, depresyon gruplarında artan GABA_Aerjik aktivite bilişsel fonksiyon bozukluğuna katkıda bulunan etmenlerden biri olabilir. Gao ve diğ. (2021) çalışmalarında Ang II enjeksiyonu yapılan farelerde NMDAR2A ekspresyonunun önemli ölçüde azaldığını buna karşın, GABAAR α 1 ekspresyonunun önemli ölçüde arttığını göstermiş ve uyarıcı/inhibitör dengesindeki değişikliğin, Ang II'nin neden olduğu davranışsal ve sinaptik plastisite anormallikleri ile ilişkili olabileceğini ileri sürmüşlerdir [158]. Bizim sonuçlarımıza göre ise, alamandin GABA_Aerjik aktiviteyi azaltmış, NMDAR2A ve GABAAR α 1 ekspresyon düzeyini artırmıştır. Ancak NMDAR2A ekspresyonundaki artış GABAAR α 1 ekspresyonundan çok daha fazladır.

Dolayısıyla uyarıcı/inhibitör dengesinin NMDA yönüne kayması bilişsel fonksiyonlardaki muhtemel iyileşmenin bir sebebi olabilir.

Depresyon, merkezi ve periferik inflamasyonun çeşitli belirteçlerinin düzeylerinde artışla karakterize edilmiştir. Depresyon süreci ilerledikçe HPA ekseninde hiperaktiviteye ve nöroinflamasyona, ardından duygu ve davranışın düzenlenmesinden sorumlu alanların boyutunda bir azalmaya neden olur. Beyinde, mikroglialar, astrositler ve oligodendrositler arasındaki çapraz etkileşim, nöral, bilişsel ve davranışsal işlevler üzerinde zararlı etkilerle birlikte inflamatuvar yanıtın artmasına neden olabilir [195]. IL-6, TNF- α , IL-1 β gibi üç temel proinflamatuvar sitokin ve NF- κ B kronik stresin ardından artar [196]. Transkripsiyon faktörü NF- κ B, hücre sağkalımının yanı sıra inflamasyon, stres ve bağışıklık tepkilerinin iyi bilinen bir düzenleyicisidir. NF- κ B, sitokinleri ve kemokinleri kodlayanlar dahil olmak üzere çeşitli proinflamatuvar genlerin ekspresyonunu indükler, sinir sisteminde ise kısa süreli belleği uzun süreli belleğe dönüştüren önemli bileşenlerden biridir. Sitokinler HPA ekseninin negatif geri bildirim döngüsünü bozar ve inflamatuvar reaksiyonları artırır [197]. Meta-analiz çalışmaları, akut inflamasyondan kronik inflamasyona geçişte anahtar rol oynayan IL-6'nın travma sonrası stres bozukluğu ve depresyonlu hastaların kanında sürekli olarak arttığını öne sürmektedir. Benzer şekilde, depresyonlu bireylerde, depresyonlu olmayanlara göre serum IL-6 ve TNF- α düzeylerinin daha yüksek olduğu rapor edilmiştir [198]. Ek olarak, depresyonlu ve önceden ilaç kullanmamış hastaların beyin-omurilik sıvısında IL-1 β 'nin daha yüksek konsantrasyonlara sahip olduğu bulunmuştur [199]. Maes ve diğ. (2012) IL-1 β seviyeleri ile kortizol seviyeleri arasında bir korelasyon olduğunu göstermiştir [200]. Hayvan modellerinde hipokampusta artan TNF- α düzeylerinin hipokampal nöron kaybıyla ve eksitotoksik hasar ile ilişkili olduğu ve artan bilişsel bozukluk riskine katkıda bulunduğu ileri sürülmüştür. Bunu destekleyecek şekilde yapılan bir çalışmada sağlıklı deneklere endotoksin uygulanmış ve bunun sonucunda IL-6, IL-1 β ve TNF- α seviyelerinde artış görülmüş ve buna depresif ruh hali ve bilişsel bozukluk eşlik etmiştir [200]. Wang ve diğ. (2018) 20 günlük KÖHS modeline maruz bırakılan sıçanların prefrontal korteksinde ve hipokampusunda NF- κ B aktivasyonunu ile IL-6 ve TNF- α ekspresyonunu arttırdığını bildirmişlerdir [201]. Çalışmamızda bu bilgilerle uyumlu olarak hipokampus, prefrontal korteks ve serum IL-6, IL-1 β ve TNF- α seviyeleri depresyon ve bloker uygulanan depresyon gruplarında önemli ölçüde artış göstermiştir. Ancak depresyon gruplarının hipokampal NF- κ B seviyelerinde sitokinlere oranla daha az artış meydana gelmiştir.

Buna ek olarak AT1R'nin de uyarılması, inflamasyon belirteçlerin salınmasına katkıda bulunur. Ang II, NADPH-oksidaz kompleksini, mikrogial RhoA/Rho kinaz yolunu, NF-kappa B'yi, indüklenabilir nitrik oksit sentazı (iNOS) ve siklooksijenaz-2'yi (COX-2) aktive ederek AT1R'lerle etkileşime girer. Buna karşılık, aktive edilmiş COX-2, merkezi sinir sisteminde inflamatuvar yanıt ile oksidatif ve nitroztatif strese sebep olur [202]. AT1R stimülasyonu ayrıca çeşitli nörodejeneratif bozukluklarda önemli olan ve hipotalamik-hipofiz-adrenal eksenin aktivasyonunu düzenleyen TNF- α 'nın salınımına sebep olur [202].

Siklooksijenaz-2 (COX-2), bir dizi inflamatuvar sitokinin üretiminde anahtar enzimdir. COX2, G proteinine bağlı reseptör aracılığıyla farklı biyolojik etkilere sahip prostaglandinleri üretmek için araşidonik asidi katalize edebilir. COX-2 ekspresyonundaki artış, cAMP sisteminin aktivitelerini düzenleyerek sadece ROT oluşumu ve inflamatuvar yanıtı etkilemez, aynı zamanda nöral plastisiteyi de etkiler [203]. Ayrıca COX-2 RAS'ın uygunsuz aktivasyonunun olduğu durumlarda, Ang II'nin zararlı etkilerinin modüle edilmesinde kritik bir rol oynar [204]. Stres kaynaklı depresif semptomların ortaya çıkmasıyla birlikte serum COX-2 ekspresyonunun önemli ölçüde arttığı ve COX-2 inhibitörünün depresif davranışları büyük ölçüde hafifletebildiği ileri sürülmektedir [205]. Wang ve diğ. (2015) çalışmalarında KÖHS modeli oluşturdukları sıçanlarda hipokampus ve frontal kortekste COX-2 aktivitesinde artış olduğunu göstermişlerdir [203]. Çalışmamızda tedavi edilmeyen her iki depresyon grubunda serum COX-2 seviyeleri artış göstermiş, alamandin tedavisi uygulanan gruplarda ise kontrol grubuna benzer sonuçlar elde edilmiştir. Bu sonuçlar inflamasyon belirteçleri sonuçlarıyla uyumludur.

Stresin önemli etkilerinden bir diğeri ROT üretimidir. Hücrelerdeki ROT hem enzimatik hem de enzimatik olmayan antioksidan savunma sistemleri tarafından nötralize edilir. Enzimatik antioksidan mekanizmalar arasında SOD ve katalaz en çok çalışılanlardır [206]. Ancak ROT ile antioksidanlar arasında bir dengesizlik varsa bu durum oksidatif strese neden olabilir [3]. Oksidatif stres de moleküler düzeyde genetik ve epigenetik değişikliklere yol açabilir. Oksidatif stres ile inflamasyon arasında karşılıklı bir ilişki vardır. İnflamasyon, oksidatif stresin hem nedeni hem de sonucu olabilir. Çeşitli hastalıkların patolojilerinin ilerlemesinde "ROT kaynaklı inflamasyon" önemli bir role sahiptir [207]. ROT'un patofizyolojik seviyeleri, transkripsiyon faktörlerinin ve proinflamatuvar genlerin yapısını değiştirerek inflamatuvar hastalıkların başlatılmasına ve ilerlemesine yol açabilecek sinyal basamaklarını tetikleyebilir. Öte yandan inflamasyon bölgesindeki bağışıklık hücreleri tarafından artan ROT üretimi, oksidatif strese ve doku hasarına katkıda bulunur. Oksidatif stres ile proinflamatuvar sitokinlerin üretimi arasındaki

ilişki önceki çalışmalarda bildirilmiştir. Oksidatif stres, p38'in aktivasyonu yoluyla proinflamatuvar yanıtın başlamasına neden olur [208]. Çalışmamızda hipokampus dokusunda lipid peroksidasyonunun göstergesi olan MDA düzeyleri tedavi uygulanmayan depresyon ve bloker uygulanan depresyon gruplarında belirgin ölçüde artış göstermişken, endojen antioksidanlar olan SOD ve CAT düzeyleri ise her iki grupta da belirgin bir azalma göstermiştir. Bu sonuçlar, inflamatuvar belirteçlerin artışı ile tutarlıdır. Buna ek olarak bulgularımızla benzer şekilde, KÖHS modeli oluşturulan sıçanlarla yapılan çalışmalarda sıçanların hipokampus dokularında artmış MDA seviyeleri ile azalan SOD ve katalaz seviyeleri tespit edilmiştir [209,210]. Bu bilgiler KÖHS modelinde lipid peroksidasyonuna karşı antioksidan savunmada bir eksiklik olabileceğini düşündürmektedir. Alamandin uygulaması ise bu durumu tersine çevirmiştir. Benzer şekilde depresyonlu grupların prefrontal korteks dokusunda da azalan katalaz seviyeleri tespit edilirken, MDA seviyesinde bir değişiklik meydana gelmemiştir. Bu bulgu prefrontal kortekste antioksidan aktivitenin MDA seviyesini dengede tutacak ölçüde yeterli olabileceği veya kronik stresin hipokampus üzerinde daha fazla etkili olabileceğini düşündürmektedir. Son olarak tedavi edilmeyen depresyonlu grupların serum MDA, SOD ve katalaz seviyelerinde belirgin bir değişiklik gözlemlenmezken alamandin uygulanan her iki grupta SOD seviyelerinde belirgin bir artış meydana gelmiştir. Bu bulgular alamandinin depresyon modelinde antioksidan etkiye sahip olabileceğini göstermektedir.

Anjiyotensin II ve diğer RAS bileşenlerinin farklı organ ve hastalıklar üzerinde birçok etkisi vardır. Bu karmaşık sistem özellikle beyin dokusunda inflamasyon ve oksidatif stresin ilerlemesine de katkıda bulunur. Ang II, aynı zamanda proinflamatuvar bir aracı olarak tanınmaktadır. Ang II'nin oksidatif strese katkısı birçok yolla meydana gelmektedir. Bunlardan ilki AT1R üzerinden NF- κ B gibi transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonuna yol açan çok sayıda hücre içi sinyal yolunu aktive ederek ROT üretimini uyarmasıdır. Bir diğer yol çeşitli proinflamatuvar sitokinlerin üretimine neden olan NADPH oksidazlar yoluyla ROT üretimini tetiklemesidir [211]. Bunlara ek olarak dolaşımda artan Ang II seviyelerinin, kan-beyin bariyeri bütünlüğünü bozarak, dolaşımdaki Ang II'nin beyin parankimine erişmesine ve AT1R'yi doğrudan tetikleyerek oksidatif stres ve beyin inflamasyonuna neden olmasına olanak tanıdığı düşünülmektedir [212]. Klasik RAS, stresin neden olduğu negatif değişikliklerde yer alırken, alamandin/MrgD ekseninin böbrek, kalp ve vasküler doku üzerinde antifibrotik, anti-inflamatuvar, antioksidan etkilere sahip olduğu gösterilmiştir [141]. Gonçalves ve diğ. (2022) serebral iskemide alamandinin intraserebroventriküler enjeksiyonunun antiinflamatuvar ve

antioksidan etkileri olduğunu göstermişlerdir. Çalışmada iskemi hasarı sonrası alamandin tedavisinin TNF- α , IL-1 β , IL-6 düzeylerini düşürdüğü, azalan SOD ve katalaz aktivitelerini arttırdığını tespit etmişlerdir [213]. Bu bilgiler çalışmamızla tutarlı olup bulgularımız alamandinin merkezi sinir sisteminde de antiinflamatuvar ve antioksidan etkilerinin olduğu desteklemektedir.

Tüm bunlara ek olarak, artan Ang II düzeyi depresyon, anksiyete, HPA ekseninin hiperaktivitesi, stres, motor aktivite, kaygı, öğrenme ve hafıza ile önemli ölçüde ilişkilendirilmektedir [157]. Çalışmamızda depresyon gruplarının hipokampus dokusunda azalan anjiyotensinojen aktivitesi strese bağlı artan Ang II seviyeleriyle ilişkili olabilir. İlginç bir şekilde Agt aktivitesi yalnızca alamandin uygulanan grupta kontrol grubuna benzerken, A779 ve alamandinin birlikte uygulandığı gruplarda azalmıştır. Prefrontal korteks ve serum Agt düzeylerinde ise belirgin bir fark tespit edilememiştir. Anjiyotensin (1-7) Seviyeleri ise A779 uygulanan her iki grupta artış göstererek blokajın gerçekleştiğini teyit etmektedir. Bloker ve alamandinin birlikte uygulandığı grupta Agt seviyesindeki azalmanın muhtemel sebebi Ang II artışı ve buna bağlı Ang (1-7) dönüşümünde artış olarak gözükmektedir. Ancak alamandin uygulanmayan depresyon gruplarında tespit ettiğimiz düşük Agt seviyeleri literatürde de önceden belirtildiği gibi depresyonla direkt ilişkilidir [214]. Anjiyotensin II'nin anksiyete üzerindeki etkisini araştıran çalışmalarda sıçanlara Ang II uygulamasının açık alan testi, zorunlu yüzme testi gibi testlerde performans kaybına sebebiyet vererek bilişsel bozulmaya ve kaygı benzeri davranışlara neden olduğu gösterilmiştir [215]. Çalışmalarda Ang II reseptör blokeri losartanın anksiyolitik etkiye sahip olduğu tespit edilmiş ve bu bulgular Ang II'nin anksiyete patogenezinde rol oynadığı görüşünü desteklemiştir.

Depresyon gibi duygudurum bozukluğu modelleri üzerine yapılan hayvan çalışmaları, RAS'ın ACE/Ang II/AT1R klasik ekseninin inhibisyonu yoluyla davranışsal ve/veya bilişsel semptomların tersine çevrilmesine odaklanmıştır. RAS'ı bloke etmek, anti-inflamatuvar ve anti-oksidatif stres etkilerine sahip olabilir ve bu da anksiyete ve depresyonun gelecekteki tedavisi için teorik bir temel sağlar. Buna ek olarak, duygudurum bozukluklarında ACE inhibitörleri veya AT1R blokerleri uygulanması ile elde edilen düşük seviyelerde RAS bileşenleri iyileşen duygudurum belirtileri ile ilişkilendirilmiştir. Yapılan çalışmalar ACE inhibitörleri veya ARB kullanımındaki olumlu etkiye ACE2/Ang-(1-7) /MasR ekseninin yol açtığını ileri sürmektedir [214]. ACE2, ACE2/Ang-(1-7) /Mas reseptörü ile ACE/Ang II/AT1R yolu arasındaki dengenin korunması için gereklidir. ACE2'nin ana işlevi, Ang II biyoyararlanımını azaltarak ve Ang-(1-

7) seviyelerini artırarak ACE aktivitesini inhibe etmektir. Dolayısıyla ACE2'nin aşırı ekspresyonu sadece AT2R ve Mas reseptörlerinin up-regülasyonu ile değil aynı zamanda AT1R ve ACE'nin down-regülasyonu ile de ilişkilidir [157]. Yüksek ACE2 aktivitesi, erkek farelerde anksiyete benzeri davranışları azaltır ve HPA ekseninin stres kaynaklı aktivasyonunu inhibe eder [216]. Bu bilgiyi destekleyecek şekilde çalışmamızda en düşük ACE2 gen ekspresyonu tedavi edilmeyen depresyon grubunda tespit edilmiş, alamandin ve bloker uygulanan grupların ekspresyon düzeyinde ise depresyon grubuna göre bir artış şekillenmiştir. Ang-(1-7), depresif ve endişeli davranışların azalmasıyla ilişkilidir [216]. Transgenik sıçanlarla yapılan bir çalışmada Ang-(1-7)'nin ekspresyonundaki artışın, sıçanların yükseltilmiş artı labirent testinde açık kolda geçirdiği süreyi arttırarak anksiyolitik etkiye yol açtığı gösterilmiştir [214]. Mas reseptörü antagonistinin merkezi olarak enjekte edilmesi, ACE2 ve Ang-(1-7) kaynaklı anksiyolitik etkileri tersine çevirir; bu, Mas reseptörlerini aktive etmesi nedeniyle ACE2/Ang-(1-7)/MasR yolunun anksiyolitik etkilerine işaret etmektedir [217]. Bunu destekleyecek şekilde Kangussu ve diğ. (2017) yapılan bir çalışmada seçici Mas reseptör antagonisti olan A779 ile ön tedavi yapılan sıçanlarda zorunlu yüzme testi ve yükseltilmiş artı labirent testlerinde performans kaybına sebep olarak, anksiyete benzeri davranışları meydana getirdiğini ileri sürülmüşlerdir [136]. Bizim çalışmamızda da bu bilgilerle tutarlı olarak depresyon modeli oluşturulup yalnızca A779 enjeksiyonu yapılan deney grubunda hem anksiyete testlerinde hem de biyokimyasal ve genetik belirteçlerde depresyon gelişimi gerçekleştiği tespit edilmiştir.

RAS'ın kalsik ekseninin inhibisyonu yoluyla aktiveşebilecek diğer koruyucu RAS yolağı alamandin/MrgD eksenidir. Alamandin ve Ang (1-7)'nin biyolojik etkilerinin çoğu önemli ölçüde benzerdir ancak bu iki peptidin bağlandıkları reseptörler farklıdır. Angiotensin (1-7) etkilerini MasR üzerinden gösterirken, alamandin MrgD reseptörü ile etkileşime girer ve Mas reseptör antagonisti olan A-779 tarafından bloke edilmez [8]. Alamandinin merkezi sinir sistemi üzerindeki etkilerini gösteren çalışmalar sınırlı olsa da Almeida-Santos ve diğ. (2021), çalışmalarında alamandinin MrgD reseptörü aracılığıyla, düşük beyin anjiyotensinojeni olan transgenik sıçanlarda antidepresan benzeri etkiyi indüklediğini göstermiştir [147]. Ek olarak, merkezi sinir sisteminde alamandinin MrgD reseptörünün aracılık ettiği süperoksit anyon üretimini indükleyerek NADPH oksidaz aktivitesini arttırdığı da ileri sürülmüştür [146]. Biyokimyasal bulgularımıza göre MrgD reseptör düzeyi hipokampus ve prefrontal kortekste alamandin uygulanan gruplarda artış göstermiştir. Prefrontal kortekste blokerle birlikte alamandin uygulanan grupta bu artış daha belirgindir. Buna benzer şekilde hipokampal MrgD

gen ekspresyon düzeylerine bakıldığı zaman alamandin uygulanan gruplarda artış meydana geldiği, ancak blokerle birlikte alamandin uygulanan grupta bu artışın çok daha belirgin olduğu tespit edilmiştir. Bu belirgin artıştaki muhtemel neden bir diğer koruyucu yolak olan Ang-(1-7) yolağının blokajı sonucu alamandinin tek başına koruyucu etki göstermesinden ileri gelmektedir.

Çalışmamızda A779 ve alamandini birlikte uygulayarak, alamandinin etkilerini ACE2/Ang-(1-7) /MasR yolağından bağımsız bir şekilde tespit etmeyi amaçladık. Alamandin uygulanan her iki grupta depresyon benzeri davranışlar gerilerken aynı zamanda Morris su labirent testinde bilişsel becerilerde artış meydana gelmiş ve bu artış moleküler belirteçlerde de tespit edilmiştir. Buna göre alamandinin Ang-(1-7)'ye benzer bir diğer etkisinin bilişsel becerileri artırıcı yönde olduğu da anlaşılmıştır. Buna ek olarak alamandin inflamasyon ve oksidatif strese de gerilemeye sebep olmuş, ancak tüm bu olumlu etkilerde alamandin uygulanan grup ile A779 ile birlikte alamandin uygulanan grup arasında belirgin bir fark tespit edilememiştir. Bu sonuçlar, Ang-(1-7) ile alamandinin depresyon patofizyolojisinde benzer etkilere sahip olabileceğini göstermenin yanı sıra, literatürde ilk defa alamandinin kognitif fonksiyonlar üzerinde olumlu etkileri olduğunu da göstermektedir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Sonuçlarımız özetlenecek olursa;

1. Alamandinin depresif davranış modülasyonuna katkısı olduğu,
2. Depresyona bağlı bozulan uzamsal hafıza üzerinde olumlu etkisinin olduğu,
3. Ang-(1-7) ile benzer şekilde antiinflamatuvar ve antioksidan etkilere sahip olduğu,
4. Öğrenme-bellek ve anksiyete benzeri davranışları üzerindeki etkisini nöroinflamasyonu azaltarak BDNF, NMDAR2A ve GABA_AR α 1 modülasyonu ile gerçekleştirdiği ve sistemik uygulanmasının teröpatik potansiyelinin olabileceği sonucuna varılmıştır.

Alamandin ve anjiyotensin (1-7) bağlantısını göstermek için moleküler düzeyde daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır.

7. KAYNAKLAR

1. Solé B, Jiménez E, Martínez-Aran A, et al. Cognition as a target in major depression: new developments. *Eur Neuropsychopharmacol*. 2015 Feb;25(2):231-47.
2. Al-Harbi KS. Treatment-resistant depression: therapeutic trends, challenges, and future directions. *Patient Prefer Adherence*. 2012; 6:369-88.
3. Bakunina N, Pariante CM, Zunszain PA. Immune mechanisms linked to depression via oxidative stress and neuroprogression. *Immunology*. 2015 Mar;144(3):365-373.
4. Fernandes BS, Berk M, Turck CW, et al. Decreased peripheral brain-derived neurotrophic factor levels are a biomarker of disease activity in major psychiatric disorders: a comparative meta-analysis. *Mol Psychiatry*. 2014 Jul;19(7):750-1.
5. Cosarderelioglu C, Nidadavolu LS, George CJ, et al. Brain Renin-Angiotensin System at the Intersect of Physical and Cognitive Frailty. *Front Neurosci*. 2020; 14:586314.
6. Benicky J, Sánchez-Lemus E, Honda M, et al. Angiotensin II AT1 receptor blockade ameliorates brain inflammation. *Neuropsychopharmacology*. 2011 Mar;36(4):857-70.
7. Wright JW, Harding JW. Contributions by the Brain Renin-Angiotensin System to Memory, Cognition, and Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis*. 2019;67(2):469-480.
8. Villela DC, Passos-Silva DG, Santos RA. Alamandine: a new member of the angiotensin family. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2014 Mar;23(2):130-4.
9. Jesulola E, Micalos P, Baguley IJ. Understanding the pathophysiology of depression: From monoamines to the neurogenesis hypothesis model- are we there yet? *Behav Brain Res*. 2018 Apr 2; 341:79-90.
10. Cuijpers P, Beekman AT, Reynolds CF, 3rd. Preventing depression: a global priority. *Jama*. 2012 Mar 14;307(10):1033-4.
11. Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/depression>.
12. Wittchen HU, Jacobi F, Rehm J, et al. The size and burden of mental disorders and other disorders of the brain in Europe 2010. *Eur Neuropsychopharmacol*. 2011 Sep;21(9):655-79.
13. Walker J, Hansen CH, Martin P, et al. Prevalence, associations, and adequacy of treatment of major depression in patients with cancer: a cross-sectional analysis of routinely collected clinical data. *Lancet Psychiatry*. 2014 Oct;1(5):343-50.
14. Zhang Y, Chen Y, Ma L. Depression and cardiovascular disease in elderly: Current understanding. *J Clin Neurosci*. 2018 Jan; 47:1-5.

15. Bădescu SV, Tătaru C, Kobylinska L, et al. The association between Diabetes mellitus and Depression. *J Med Life*. 2016 Apr-Jun;9(2):120-5.
16. Michaelides A, Zis P. Depression, anxiety and acute pain: links and management challenges. *Postgrad Med*. 2019 Sep;131(7):438-444.
17. Nabeshima T, Kim HC. Involvement of genetic and environmental factors in the onset of depression. *Exp Neurobiol*. 2013 Dec;22(4):235-43.
18. Rajkowska G, O'Dwyer G, Teleki Z, et al. GABAergic neurons immunoreactive for calcium binding proteins are reduced in the prefrontal cortex in major depression. *Neuropsychopharmacology*. 2007 Feb;32(2):471-82.
19. Mahar I, Bambico FR, Mechawar N, et al. Stress, serotonin, and hippocampal neurogenesis in relation to depression and antidepressant effects. *Neurosci Biobehav Rev*. 2014 Jan; 38:173-92.
20. Francis TC, Lobo MK. Emerging Role for Nucleus Accumbens Medium Spiny Neuron Subtypes in Depression. *Biol Psychiatry*. 2017 Apr 15;81(8):645-653.
21. Flint J, Kendler KS. The genetics of major depression. *Neuron*. 2014 Feb 5;81(3):484-503.
22. Shadrina M, Bondarenko EA, Slominsky PA. Genetics Factors in Major Depression Disease. *Front Psychiatry*. 2018; 9:334.
23. López-León S, Janssens AC, González-Zuloeta Ladd AM, et al. Meta-analyses of genetic studies on major depressive disorder. *Mol Psychiatry*. 2008 Aug;13(8):772-85.
24. Opmeer EM, Kortekaas R, Aleman A. Depression and the role of genes involved in dopamine metabolism and signalling. *Prog Neurobiol*. 2010 Oct;92(2):112-33.
25. Delgado PL. Depression: the case for a monoamine deficiency. *J Clin Psychiatry*. 2000;61 Suppl 6:7-11.
26. Price JL, Drevets WC. Neurocircuitry of mood disorders. *Neuropsychopharmacology*. 2010 Jan;35(1):192-216.
27. Grace AA. Dysregulation of the dopamine system in the pathophysiology of schizophrenia and depression. *Nat Rev Neurosci*. 2016 Aug;17(8):524-32.
28. Li YF. A hypothesis of monoamine (5-HT)- Glutamate/GABA long neural circuit: Aiming for fast-onset antidepressant discovery. *Pharmacol Ther*. 2020 Apr; 208:107494.
29. Strawbridge R, Javed RR, Cave J, et al. The effects of reserpine on depression: A systematic review. *J Psychopharmacol*. 2023 Mar;37(3):248-260.
30. Moncrieff J, Cooper RE, Stockmann T, et al. The serotonin theory of depression: a systematic umbrella review of the evidence. *Mol Psychiatry*. 2023 Aug;28(8):3243-3256.

31. Salamone JD, Correa M, Yohn S, et al. The pharmacology of effort-related choice behavior: Dopamine, depression, and individual differences. *Behav Processes*. 2016 Jun; 127:3-17.
32. Thase ME. The role of monoamine oxidase inhibitors in depression treatment guidelines. *J Clin Psychiatry*. 2012;73 Suppl 1:10-6.
33. Hamon M, Blier P. Monoamine neurocircuitry in depression and strategies for new treatments. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2013 Aug 1; 45:54-63.
34. Ramesh M, Dokurugu YM, Thompson MD, et al. Therapeutic, Molecular and Computational Aspects of Novel Monoamine Oxidase (MAO) Inhibitors. *Comb Chem High Throughput Screen*. 2017;20(6):492-509.
35. Klimek V, Stockmeier C, Overholser J, et al. Reduced levels of norepinephrine transporters in the locus coeruleus in major depression. *J Neurosci*. 1997 Nov 1;17(21):8451-8.
36. Wang HQ, Wang ZZ, Chen NH. The receptor hypothesis and the pathogenesis of depression: Genetic bases and biological correlates. *Pharmacol Res*. 2021 May; 167:105542.
37. Zhang ZJ, Wang D, Man SC, et al. Platelet 5-HT (1A) receptor correlates with major depressive disorder in drug-free patients. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2014 Aug 4; 53:74-9.
38. Duman RS, Sanacora G, Krystal JH. Altered Connectivity in Depression: GABA and Glutamate Neurotransmitter Deficits and Reversal by Novel Treatments. *Neuron*. 2019 Apr 3;102(1):75-90.
39. Khodoruth MAS, Estudillo-Guerra MA, Pacheco-Barrios K, et al. Glutamatergic System in Depression and Its Role in Neuromodulatory Techniques Optimization. *Front Psychiatry*. 2022; 13:886918.
40. Calabrese F, Guidotti G, Molteni R, et al. Stress-induced changes of hippocampal NMDA receptors: modulation by duloxetine treatment. *PLoS One*. 2012;7(5): e37916.
41. Reznikov LR, Reagan LP, Fadel JR. Effects of acute and repeated restraint stress on GABA efflux in the rat basolateral and central amygdala. *Brain Res*. 2009 Feb 23; 1256:61-8.
42. Reznikov LR, Grillo CA, Piroli GG, et al. Acute stress-mediated increases in extracellular glutamate levels in the rat amygdala: differential effects of antidepressant treatment. *Eur J Neurosci*. 2007 May;25(10):3109-14.
43. Onaolapo AY, Onaolapo OJ. Glutamate and depression: Reflecting a deepening knowledge of the gut and brain effects of a ubiquitous molecule. *World J Psychiatry*. 2021 Jul 19;11(7):297-315.
44. Amidfar M, Woelfer M, Réus GZ, et al. The role of NMDA receptor in neurobiology and treatment of major depressive disorder: Evidence from translational research. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2019 Aug 30; 94:109668.

45. Sanz-Clemente A, Nicoll RA, Roche KW. Diversity in NMDA receptor composition: many regulators, many consequences. *Neuroscientist*. 2013 Feb;19(1):62-75.
46. Mullasseril P, Hansen KB, Vance KM, et al. A subunit-selective potentiator of NR2C- and NR2D-containing NMDA receptors. *Nat Commun*. 2010 Oct 5; 1:90.
47. Adell A. Brain NMDA Receptors in Schizophrenia and Depression. *Biomolecules*. 2020 Jun 23;10(6).
48. Yu SP, Jiang MQ, Shim SS, et al. Extrasynaptic NMDA receptors in acute and chronic excitotoxicity: implications for preventive treatments of ischemic stroke and late-onset Alzheimer's disease. *Mol Neurodegener*. 2023 Jul 3;18(1):43.
49. Lozovaya NA, Grebenyuk SE, Tsintsadze T, et al. Extrasynaptic NR2B and NR2D subunits of NMDA receptors shape 'superslow' afterburst EPSC in rat hippocampus. *J Physiol*. 2004 Jul 15;558(Pt 2):451-63.
50. Thomas CG, Miller AJ, Westbrook GL. Synaptic and extrasynaptic NMDA receptor NR2 subunits in cultured hippocampal neurons. *J Neurophysiol*. 2006 Mar;95(3):1727-34.
51. Kang M, Noh J, Chung JM. NMDA receptor-dependent long-term depression in the lateral habenula: implications in physiology and depression. *Sci Rep*. 2020 Oct 21;10(1):17921.
52. Anwyl R. Induction and expression mechanisms of postsynaptic NMDA receptor-independent homosynaptic long-term depression. *Prog Neurobiol*. 2006 Jan;78(1):17-37.
53. Torrisi SA, Rizzo S, Laudani S, et al. Acute stress alters recognition memory and AMPA/NMDA receptor subunits in a sex-dependent manner. *Neurobiol Stress*. 2023 Jul; 25:100545.
54. Zanos P, Gould TD. Mechanisms of ketamine action as an antidepressant. *Mol Psychiatry*. 2018 Apr;23(4):801-811.
55. Ayala-Rodríguez JD, García-Colunga J. Maternal separation modifies spontaneous synaptic activity in the infralimbic cortex of stress-resilient male rats. *PLoS One*. 2023;18(11):e0294151.
56. Karolewicz B, Szebeni K, Gilmore T, et al. Elevated levels of NR2A and PSD-95 in the lateral amygdala in depression. *Int J Neuropsychopharmacol*. 2009 Mar;12(2):143-53.
57. MacKenzie G, Maguire J. Chronic stress shifts the GABA reversal potential in the hippocampus and increases seizure susceptibility. *Epilepsy Res*. 2015 Jan; 109:13-27.
58. Lloyd KG, Zivkovic B, Scatton B, et al. The gabaergic hypothesis of depression. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 1989;13(3-4):341-51.
59. Godfrey KEM, Muthukumaraswamy SD, Stinear CM, et al. Effect of rTMS on GABA and glutamate levels in treatment-resistant depression: An MR spectroscopy study. *Psychiatry Res Neuroimaging*. 2021 Nov 30; 317:111377.

60. Schür RR, Draisma LW, Wijnen JP, et al. Brain GABA levels across psychiatric disorders: A systematic literature review and meta-analysis of (1) H-MRS studies. *Hum Brain Mapp.* 2016 Sep;37(9):3337-52.
61. Levinson AJ, Fitzgerald PB, Favalli G, et al. Evidence of cortical inhibitory deficits in major depressive disorder. *Biol Psychiatry.* 2010 Mar 1;67(5):458-64.
62. Hu W, Zhang M, Czéh B, et al. Stress impairs GABAergic network function in the hippocampus by activating nongenomic glucocorticoid receptors and affecting the integrity of the parvalbumin-expressing neuronal network. *Neuropsychopharmacology.* 2010 Jul;35(8):1693-707.
63. Huang J, Xu F, Yang L, et al. Involvement of the GABAergic system in PTSD and its therapeutic significance. *Front Mol Neurosci.* 2023; 16:1052288.
64. Li ZL, Wang Y, Zou HW, et al. GABA(B) receptors within the lateral habenula modulate stress resilience and vulnerability in mice. *Physiol Behav.* 2021 Mar 1; 230:113311.
65. Fee C, Prevot TD, Misquitta K, et al. Behavioral Deficits Induced by Somatostatin-Positive GABA Neuron Silencing Are Rescued by Alpha 5 GABA-A Receptor Potentiation. *Int J Neuropsychopharmacol.* 2021 Jul 14;24(6):505-518.
66. Luscher B, Shen Q, Sahir N. The GABAergic deficit hypothesis of major depressive disorder. *Mol Psychiatry.* 2011 Apr;16(4):383-406.
67. Heim C, Newport DJ, Mletzko T, et al. The link between childhood trauma and depression: insights from HPA axis studies in humans. *Psychoneuroendocrinology.* 2008 Jul;33(6):693-710.
68. Keller J, Gomez R, Williams G, et al. HPA axis in major depression: cortisol, clinical symptomatology and genetic variation predict cognition. *Mol Psychiatry.* 2017 Apr;22(4):527-536.
69. Nandam LS, Brazel M, Zhou M, et al. Cortisol and Major Depressive Disorder-Translating Findings From Humans to Animal Models and Back. *Front Psychiatry.* 2019; 10:974.
70. Juruena MF, Cleare AJ, Bauer ME, et al. Molecular mechanisms of glucocorticoid receptor sensitivity and relevance to affective disorders. *Acta Neuropsychiatr.* 2003 Dec;15(6):354-67.
71. Ghosal S, Hare B, Duman RS. Prefrontal Cortex GABAergic Deficits and Circuit Dysfunction in the Pathophysiology and Treatment of Chronic Stress and Depression. *Curr Opin Behav Sci.* 2017 Apr; 14:1-8.
72. Harsanyi S, Kupcova I, Danisovic L, et al. Selected Biomarkers of Depression: What Are the Effects of Cytokines and Inflammation? *Int J Mol Sci.* 2022 Dec 29;24(1).
73. Miller AH, Raison CL. The role of inflammation in depression: from evolutionary imperative to modern treatment target. *Nat Rev Immunol.* 2016 Jan;16(1):22-34.

74. McNally L, Bhagwagar Z, Hannestad J. Inflammation, glutamate, and glia in depression: a literature review. *CNS Spectr*. 2008 Jun;13(6):501-10.
75. Felger JC, Lotrich FE. Inflammatory cytokines in depression: neurobiological mechanisms and therapeutic implications. *Neuroscience*. 2013 Aug 29; 246:199-229.
76. Miller AH, Maletic V, Raison CL. Inflammation and its discontents: the role of cytokines in the pathophysiology of major depression. *Biol Psychiatry*. 2009 May 1;65(9):732-41.
77. Dantzer R. Cytokine, sickness behavior, and depression. *Neurol Clin*. 2006 Aug;24(3):441-60.
78. Shi R, Gwee X, Chua DQ, et al. Inflammatory markers and incident depression: Evidence in a population-based prospective study. *Psychoneuroendocrinology*. 2022 Aug; 142:105806.
79. Wang M, Jin G, Cheng Y, et al. Genetically predicted circulating levels of cytokines and the risk of depression: a bidirectional Mendelian-randomization study. *Front Genet*. 2023; 14:1242614.
80. Troubat R, Barone P, Leman S, et al. Neuroinflammation and depression: A review. *Eur J Neurosci*. 2021 Jan;53(1):151-171.
81. Hassamal S. Chronic stress, neuroinflammation, and depression: an overview of pathophysiological mechanisms and emerging anti-inflammatories. *Front Psychiatry*. 2023; 14:1130989.
82. Zou W, Feng R, Yang Y. Changes in the serum levels of inflammatory cytokines in antidepressant drug-naïve patients with major depression. *PLoS One*. 2018;13(6): e0197267.
83. Guo B, Zhang M, Hao W, et al. Neuroinflammation mechanisms of neuromodulation therapies for anxiety and depression. *Transl Psychiatry*. 2023 Jan 9;13(1):5.
84. Krishnan V, Han MH, Graham DL, et al. Molecular adaptations underlying susceptibility and resistance to social defeat in brain reward regions. *Cell*. 2007 Oct 19;131(2):391-404.
85. Raison CL, Rutherford RE, Woolwine BJ, et al. A randomized controlled trial of the tumor necrosis factor antagonist infliximab for treatment-resistant depression: the role of baseline inflammatory biomarkers. *JAMA Psychiatry*. 2013 Jan;70(1):31-41.
86. Jeon SW, Kim YK. Neuroinflammation and cytokine abnormality in major depression: Cause or consequence in that illness? *World J Psychiatry*. 2016 Sep 22;6(3):283-93.
87. Mikulska J, Juszczak G, Gawrońska-Grzywacz M, et al. HPA Axis in the Pathomechanism of Depression and Schizophrenia: New Therapeutic Strategies Based on Its Participation. *Brain Sci*. 2021 Sep 30;11(10).
88. Leonard BE. Inflammation and depression: a causal or coincidental link to the pathophysiology? *Acta Neuropsychiatr*. 2018 Feb;30(1):1-16.

89. Trifu SC, Trifu AC, Aluaş E, et al. Brain changes in depression. *Rom J Morphol Embryol*. 2020 Apr-Jun;61(2):361-370.
90. Bhatt S, Nagappa AN, Patil CR. Role of oxidative stress in depression. *Drug Discov Today*. 2020 Jul;25(7):1270-1276.
91. Bitanihirwe BK, Woo TU. Oxidative stress in schizophrenia: an integrated approach. *Neurosci Biobehav Rev*. 2011 Jan;35(3):878-93.
92. Bouayed J, Rammal H, Soulimani R. Oxidative stress and anxiety: relationship and cellular pathways. *Oxid Med Cell Longev*. 2009 Apr-Jun;2(2):63-7.
93. Wang J, Men Y, Wang Z. Polydatin Alleviates Chronic Stress-Induced Depressive and Anxiety-like Behaviors in a Mouse Model. *ACS Chem Neurosci*. 2023 Mar 1;14(5):977-987.
94. Price RB, Duman R. Neuroplasticity in cognitive and psychological mechanisms of depression: an integrative model. *Mol Psychiatry*. 2020 Mar;25(3):530-543.
95. Zhang E, Liao P. Brain-derived neurotrophic factor and post-stroke depression. *J Neurosci Res*. 2020 Mar;98(3):537-548.
96. Abelaira HM, Réus GZ, Neotti MV, et al. The role of mTOR in depression and antidepressant responses. *Life Sci*. 2014 Apr 17;101(1-2):10-4.
97. Lu B, Nagappan G, Lu Y. BDNF and synaptic plasticity, cognitive function, and dysfunction. *Handb Exp Pharmacol*. 2014; 220:223-50.
98. Khairova RA, Machado-Vieira R, Du J, et al. A potential role for pro-inflammatory cytokines in regulating synaptic plasticity in major depressive disorder. *Int J Neuropsychopharmacol*. 2009 May;12(4):561-78.
99. Duman RS, Aghajanian GK, Sanacora G, et al. Synaptic plasticity and depression: new insights from stress and rapid-acting antidepressants. *Nat Med*. 2016 Mar;22(3):238-49.
100. Köhler CA, Carvalho AF, Alves GS, et al. Autobiographical Memory Disturbances in Depression: A Novel Therapeutic Target? *Neural Plast*. 2015; 2015:759139.
101. Kandel ER, Schwartz, J. and Jessell, T.M. *Principles of Neural Science*. 4th Edition ed. New York.: McGraw-Hill Health Professions Division; 2000.
102. DeMaster D, Pathman T, Lee JK, et al. Structural development of the hippocampus and episodic memory: developmental differences along the anterior/posterior axis. *Cereb Cortex*. 2014 Nov;24(11):3036-45.
103. Knierim JJ. The hippocampus. *Curr Biol*. 2015 Dec 7;25(23): R1116-21.
104. <https://radiopaedia.org/articles/hippocampus>. Available from: <https://radiopaedia.org/articles/hippocampus>
105. Lüscher C, Malenka RC. NMDA receptor-dependent long-term potentiation and long-term depression (LTP/LTD). *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2012 Jun 1;4(6).

106. Kennedy MB. Synaptic Signaling in Learning and Memory. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2013 Dec 30;8(2): a016824.
107. Muller D, Nikonenko I. Chapter 6- Dendritic Spines. In: Rubenstein JLR, Rakic P, editors. *Neural Circuit Development and Function in the Brain.* Oxford: Academic Press; 2013. p. 95-108.
108. Alvarez VA, Sabatini BL. Anatomical and physiological plasticity of dendritic spines. *Annu Rev Neurosci.* 2007; 30:79-97.
109. Voglewede MM, Zhang H. Polarity proteins: Shaping dendritic spines and memory. *Dev Biol.* 2022 Aug; 488:68-73.
110. Leung CCY, Wong YH. Role of G Protein-Coupled Receptors in the Regulation of Structural Plasticity and Cognitive Function. *Molecules.* 2017 Jul 24;22(7).
111. Traynelis SF, Wollmuth LP, McBain CJ, et al. Glutamate receptor ion channels: structure, regulation, and function. *Pharmacol Rev.* 2010 Sep;62(3):405-96.
112. Basu S, Lamprecht R. The Role of Actin Cytoskeleton in Dendritic Spines in the Maintenance of Long-Term Memory. *Front Mol Neurosci.* 2018; 11:143.
113. Churchwell JC, Kesner RP. Hippocampal-prefrontal dynamics in spatial working memory: interactions and independent parallel processing. *Behav Brain Res.* 2011 Dec 1;225(2):389-95.
114. Preston AR, Eichenbaum H. Interplay of hippocampus and prefrontal cortex in memory. *Curr Biol.* 2013 Sep 9;23(17): R764-73.
115. Zhang FF, Peng W, Sweeney JA, et al. Brain structure alterations in depression: Psychoradiological evidence. *CNS Neurosci Ther.* 2018 Nov;24(11):994-1003.
116. Lucassen PJ, Pruessner J, Sousa N, et al. Neuropathology of stress. *Acta Neuropathol.* 2014 Jan;127(1):109-35.
117. Fuchs E, Flügge G. Experimental animal models for the simulation of depression and anxiety. *Dialogues Clin Neurosci.* 2006;8(3):323-33.
118. Planchez B, Surget A, Belzung C. Animal models of major depression: drawbacks and challenges. *J Neural Transm (Vienna).* 2019 Nov;126(11):1383-1408.
119. Cathomas F, Hartmann MN, Seifritz E, et al. The translational study of apathy-an ecological approach. *Front Behav Neurosci.* 2015; 9:241.
120. Zuckerman H, Pan Z, Park C, et al. Recognition and Treatment of Cognitive Dysfunction in Major Depressive Disorder. *Front Psychiatry.* 2018; 9:655.
121. Darcet F, Mendez-David I, Tritschler L, et al. Learning and memory impairments in a neuroendocrine mouse model of anxiety/depression. *Front Behav Neurosci.* 2014; 8:136.

122. Willner P. The chronic mild stress (CMS) model of depression: History, evaluation and usage. *Neurobiol Stress*. 2017 Feb; 6:78-93.
123. Willner P, Towell A, Sampson D, et al. Reduction of sucrose preference by chronic unpredictable mild stress, and its restoration by a tricyclic antidepressant. *Psychopharmacology (Berl)*. 1987;93(3):358-64.
124. Hill MN, Hellemans KG, Verma P, et al. Neurobiology of chronic mild stress: parallels to major depression. *Neurosci Biobehav Rev*. 2012 Oct;36(9):2085-117.
125. Kanugula AK, Kaur J, Batra J, et al. Renin-Angiotensin System: Updated Understanding and Role in Physiological and Pathophysiological States. *Cureus*. 2023 Jun;15(6):e40725.
126. Lappin. JHFJKSL. Renin Angiotensin System. In: Aboubakr S, editor. *Physiology: StatPearls Publishing*; 2023.
127. Mehta JK, Kaur G, Buttar HS, et al. Role of the renin-angiotensin system in the pathophysiology of coronary heart disease and heart failure: Diagnostic biomarkers and therapy with drugs and natural products. *Front Physiol*. 2023; 14:1034170.
128. Kaschina E, Unger T. Angiotensin AT1/AT2 receptors: regulation, signalling and function. *Blood Press*. 2003;12(2):70-88.
129. Tibi S, Zeynalvand G, Mohsin H. Role of the Renin Angiotensin Aldosterone System in the Pathogenesis of Sepsis-Induced Acute Kidney Injury: A Systematic Review. *J Clin Med*. 2023 Jul 8;12(14).
130. de Souza-Neto FP, Carvalho Santuchi M, de Moraes ESM, et al. Angiotensin-(1-7) and Alamandine on Experimental Models of Hypertension and Atherosclerosis. *Curr Hypertens Rep*. 2018 Mar 14;20(2):17.
131. Rodrigues-Ferreira S, Nahmias C. G-protein coupled receptors of the renin-angiotensin system: new targets against breast cancer? *Front Pharmacol*. 2015; 6:24.
132. Qaradakhi T, Apostolopoulos V, Zulli A. Angiotensin (1-7) and Alamandine: Similarities and differences. *Pharmacol Res*. 2016 Sep; 111:820-826.
133. Zhang Y, Liu J, Luo JY, et al. Upregulation of Angiotensin (1-7)-Mediated Signaling Preserves Endothelial Function Through Reducing Oxidative Stress in Diabetes. *Antioxid Redox Signal*. 2015 Oct 10;23(11):880-92.
134. Simões e Silva AC, Silveira KD, Ferreira AJ, et al. ACE2, angiotensin-(1-7) and Mas receptor axis in inflammation and fibrosis. *Br J Pharmacol*. 2013 Jun;169(3):477-92.
135. Wang L, de Kloet AD, Pati D, et al. Increasing brain angiotensin converting enzyme 2 activity decreases anxiety-like behavior in male mice by activating central Mas receptors. *Neuropharmacology*. 2016 Jun; 105:114-123.

136. Almeida-Santos AF, Kangussu LM, Moreira FA, et al. Anxiolytic- and antidepressant-like effects of angiotensin-(1-7) in hypertensive transgenic (mRen2)27 rats. *Clin Sci (Lond)*. 2016 Jul 1;130(14):1247-55.
137. Jiang T, Gao L, Guo J, et al. Suppressing inflammation by inhibiting the NF- κ B pathway contributes to the neuroprotective effect of angiotensin-(1-7) in rats with permanent cerebral ischaemia. *Br J Pharmacol*. 2012 Dec;167(7):1520-32.
138. Jiang T, Tan L, Gao Q, et al. Plasma Angiotensin-(1-7) is a Potential Biomarker for Alzheimer's Disease. *Curr Neurovasc Res*. 2016;13(2):96-9.
139. Gard PR. Angiotensin as a target for the treatment of Alzheimer's disease, anxiety and depression. *Expert Opin Ther Targets*. 2004 Feb;8(1):7-14.
140. Shah AK, Yadav S, Yeganehjoo H. Implications of Renin-Angiotensin System in Health and Disease. In: Bhullar SK, Tappia PS, Dhalla NS, editors. *The Renin Angiotensin System in Cancer, Lung, Liver and Infectious Diseases*. Cham: Springer International Publishing; 2023. p. 3-15.
141. Hrenak J, Paulis L, Simko F. Angiotensin A/Alamandine/MrgD Axis: Another Clue to Understanding Cardiovascular Pathophysiology. *Int J Mol Sci*. 2016 Jul 20;17(7).
142. Lautner RQ, Villela DC, Fraga-Silva RA, et al. Discovery and characterization of alamandine: a novel component of the renin-angiotensin system. *Circ Res*. 2013 Apr 12;112(8):1104-11.
143. Liu C, Yang CX, Chen XR, et al. Alamandine attenuates hypertension and cardiac hypertrophy in hypertensive rats. *Amino Acids*. 2018 Aug;50(8):1071-1081.
144. Silva MM, de Souza-Neto FP, Jesus ICG, et al. Alamandine improves cardiac remodeling induced by transverse aortic constriction in mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2021 Jan 1;320(1):H352-h363.
145. Marins FR, Oliveira AC, Qadri F, et al. Alamandine but not angiotensin-(1-7) produces cardiovascular effects at the rostral insular cortex. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2021 Sep 1;321(3):R513-r521.
146. Jesus ICG, Scalzo S, Alves F, et al. Alamandine acts via MrgD to induce AMPK/NO activation against ANG II hypertrophy in cardiomyocytes. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2018 Jun 1;314(6):C702-c711.
147. Almeida-Santos AF, de Melo LA, Gonçalves SCA, et al. Alamandine through MrgD receptor induces antidepressant-like effect in transgenic rats with low brain angiotensinogen. *Horm Behav*. 2021 Jan; 127:104880.
148. Xu M, Li J, Zhang Z, et al. Mas-related G protein-coupled receptor D is involved in modulation of murine gastrointestinal motility. *Exp Physiol*. 2021 Dec;106(12):2502-2516.
149. Nishimura S, Uno M, Kaneta Y, et al. MRGD, a MAS-related G-protein coupled receptor, promotes tumorigenesis and is highly expressed in lung cancer. *PLoS One*. 2012;7(6):e38618.

150. Willner P. Validity, reliability and utility of the chronic mild stress model of depression: a 10-year review and evaluation. *Psychopharmacology (Berl)*. 1997 Dec;134(4):319-29.
151. Hu C, Luo Y, Wang H, et al. Re-evaluation of the interrelationships among the behavioral tests in rats exposed to chronic unpredictable mild stress. *PLoS One*. 2017;12(9): e0185129.
152. Porsolt RD, Anton G, Blavet N, et al. Behavioural despair in rats: a new model sensitive to antidepressant treatments. *Eur J Pharmacol*. 1978 Feb 15;47(4):379-91.
153. File SE. Animal models for predicting clinical efficacy of anxiolytic drugs: social behaviour. *Neuropsychobiology*. 1985;13(1-2):55-62.
154. Morris R. Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *J Neurosci Methods*. 1984 May;11(1):47-60.
155. Lackamp J, Schlachet R, Sajatovic M. Assessment and management of major depressive disorder in older adults. *Psychiatr Danub*. 2016 Sep;28(Suppl-1):95-98.
156. Gong S, Deng F. Renin-angiotensin system: The underlying mechanisms and promising therapeutical target for depression and anxiety. *Front Immunol*. 2022; 13:1053136.
157. Ali NH, Al-Kuraishy HM, Al-Gareeb AI, et al. Role of brain renin-angiotensin system in depression: A new perspective. *CNS Neurosci Ther*. 2023 Nov 12.
158. Gao N, Wang H, Xu X, et al. Angiotensin II induces cognitive decline and anxiety-like behavior via disturbing pattern of theta-gamma oscillations. *Brain Res Bull*. 2021 Sep; 174:84-91.
159. Alqurashi GK, Hindi EA, Zayed MA, et al. The Impact of Chronic Unpredictable Mild Stress-Induced Depression on Spatial, Recognition and Reference Memory Tasks in Mice: Behavioral and Histological Study. *Behav Sci (Basel)*. 2022 May 29;12(6).
160. López López AL, Escobar Villanueva MC, Brianza Padilla M, et al. CHRONIC UNPREDICTABLE MILD STRESS PROGRESSIVELY DISTURBS GLUCOSE METABOLISM AND APPETITE HORMONES IN RATS. *Acta Endocrinol (Buchar)*. 2018 Jan-Mar;14(1):16-23.
161. Wei H, Zhou T, Tan B, et al. Impact of chronic unpredicted mild stress-induced depression on repaglinide fate via glucocorticoid signaling pathway. *Oncotarget*. 2017 Jul 4;8(27):44351-44365.
162. Meng C, Feng S, Hao Z, et al. Antibiotics exposure attenuates chronic unpredictable mild stress-induced anxiety-like and depression-like behavior. *Psychoneuroendocrinology*. 2022 Feb; 136:105620.
163. Dhabhar FS, McEwen BS. Acute stress enhances while chronic stress suppresses cell-mediated immunity in vivo: a potential role for leukocyte trafficking. *Brain Behav Immun*. 1997 Dec;11(4):286-306.

164. Pariante CM, Lightman SL. The HPA axis in major depression: classical theories and new developments. *Trends Neurosci.* 2008 Sep;31(9):464-8.
165. Fonseca-Rodrigues D, Gonçalves J, Laranjeira I, et al. Sucrose intake and preference by Wistar Han rats are not influenced by sex or food/water deprivation. *Pharmacol Biochem Behav.* 2022 May; 216:173387.
166. Scheggi S, De Montis MG, Gambarana C. Making Sense of Rodent Models of Anhedonia. *Int J Neuropsychopharmacol.* 2018 Nov 1;21(11):1049-1065.
167. Prut L, Belzung C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. *Eur J Pharmacol.* 2003 Feb 28;463(1-3):3-33.
168. Zhang Z, Cai X, Yao Z, et al. EA Ameliorated Depressive Behaviors in CUMS Rats and Was Related to Its Suppressing Autophagy in the Hippocampus. *Neural Plast.* 2020; 2020:8860968.
169. Denmark A, Tien D, Wong K, et al. The effects of chronic social defeat stress on mouse self-grooming behavior and its patterning. *Behav Brain Res.* 2010 Apr 2;208(2):553-9.
170. Carola V, D'Olimpio F, Brunamonti E, et al. Evaluation of the elevated plus-maze and open-field tests for the assessment of anxiety-related behaviour in inbred mice. *Behav Brain Res.* 2002 Aug 21;134(1-2):49-57.
171. Walf AA, Frye CA. The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents. *Nat Protoc.* 2007;2(2):322-8.
172. Liu H, Du Y, Liu LL, et al. Anti-depression-like effect of Mogroside V is related to the inhibition of inflammatory and oxidative stress pathways. *Eur J Pharmacol.* 2023 Sep 15; 955:175828.
173. Kim EJ, Pellman B, Kim JJ. Stress effects on the hippocampus: a critical review. *Learn Mem.* 2015 Sep;22(9):411-6.
174. Schoenfeld TJ, Gould E. Stress, stress hormones, and adult neurogenesis. *Exp Neurol.* 2012 Jan;233(1):12-21.
175. Cunha C, Brambilla R, Thomas KL. A simple role for BDNF in learning and memory? *Front Mol Neurosci.* 2010; 3:1.
176. Kingir E, Sevinc C, Unal G. Chronic oral ketamine prevents anhedonia and alters neuronal activation in the lateral habenula and nucleus accumbens in rats under chronic unpredictable mild stress. *Neuropharmacology.* 2023 May 1; 228:109468.
177. Chen JL, Zhang DL, Sun Y, et al. Angiotensin-(1-7) administration attenuates Alzheimer's disease-like neuropathology in rats with streptozotocin-induced diabetes via Mas receptor activation. *Neuroscience.* 2017 Mar 27; 346:267-277.
178. Miranda M, Morici JF, Zanoni MB, et al. Brain-Derived Neurotrophic Factor: A Key Molecule for Memory in the Healthy and the Pathological Brain. *Front Cell Neurosci.* 2019; 13:363.

179. Dwivedi Y, Rizavi HS, Conley RR, et al. Altered gene expression of brain-derived neurotrophic factor and receptor tyrosine kinase B in postmortem brain of suicide subjects. *Arch Gen Psychiatry*. 2003 Aug;60(8):804-15.
180. Chauhan VS, Khan SA, Kulhari K. Correlation of brain-derived neurotrophic factor with severity of depression and treatment response. *Med J Armed Forces India*. 2023 Jul-Aug;79(4):451-457.
181. Radecki DT, Brown LM, Martinez J, et al. BDNF protects against stress-induced impairments in spatial learning and memory and LTP. *Hippocampus*. 2005;15(2):246-53.
182. Bruhns RP, Sulaiman MI, Gaub M, et al. Angiotensin-(1-7) improves cognitive function and reduces inflammation in mice following mild traumatic brain injury. *Front Behav Neurosci*. 2022; 16:903980.
183. Miranda M, Kent BA, Morici JF, et al. NMDA receptors and BDNF are necessary for discrimination of overlapping spatial and non-spatial memories in perirhinal cortex and hippocampus. *Neurobiol Learn Mem*. 2018 Nov; 155:337-343.
184. Zhou J, Wang F, Zhang J, et al. The interplay of BDNF-TrkB with NMDA receptor in propofol-induced cognition dysfunction : Mechanism for the effects of propofol on cognitive function. *BMC Anesthesiol*. 2018 Apr 5;18(1):35.
185. Bannerman DM, Niewoehner B, Lyon L, et al. NMDA receptor subunit NR2A is required for rapidly acquired spatial working memory but not incremental spatial reference memory. *J Neurosci*. 2008 Apr 2;28(14):3623-30.
186. Li R, Huang FS, Abbas AK, et al. Role of NMDA receptor subtypes in different forms of NMDA-dependent synaptic plasticity. *BMC Neurosci*. 2007 Jul 26; 8:55.
187. Prévot T, Sibille E. Altered GABA-mediated information processing and cognitive dysfunctions in depression and other brain disorders. *Mol Psychiatry*. 2021 Jan;26(1):151-167.
188. Nam MH, Cho J, Kwon DH, et al. Excessive Astrocytic GABA Causes Cortical Hypometabolism and Impedes Functional Recovery after Subcortical Stroke. *Cell Rep*. 2020 Jul 7;32(1):107861.
189. Jo S, Yarishkin O, Hwang YJ, et al. GABA from reactive astrocytes impairs memory in mouse models of Alzheimer's disease. *Nat Med*. 2014 Aug;20(8):886-96.
190. Hasler G, van der Veen JW, Grillon C, et al. Effect of acute psychological stress on prefrontal GABA concentration determined by proton magnetic resonance spectroscopy. *Am J Psychiatry*. 2010 Oct;167(10):1226-31.
191. Hasler G, van der Veen JW, Tumonis T, et al. Reduced prefrontal glutamate/glutamine and gamma-aminobutyric acid levels in major depression determined using proton magnetic resonance spectroscopy. *Arch Gen Psychiatry*. 2007 Feb;64(2):193-200.
192. Nutt DJ. Neurobiological mechanisms in generalized anxiety disorder. *J Clin Psychiatry*. 2001;62 Suppl 11:22-7; discussion 28.

193. Mejo SL. Anterograde amnesia linked to benzodiazepines. *Nurse Pract.* 1992 Oct;17(10):44, 49-50.
194. Wardle RA, Poo MM. Brain-derived neurotrophic factor modulation of GABAergic synapses by postsynaptic regulation of chloride transport. *J Neurosci.* 2003 Sep 24;23(25):8722-32.
195. Kohler O, Krogh J, Mors O, et al. Inflammation in Depression and the Potential for Anti-Inflammatory Treatment. *Curr Neuroparmacol.* 2016;14(7):732-42.
196. Agarwal V, Kaushik AS, Rehman M, et al. Interleukin-6 expression and its modulation by diacerein in a rat model of chronic stress induced cardiac dysfunction. *Heliyon.* 2021 Dec;7(12): e08522.
197. Farooq RK, Asghar K, Kanwal S, et al. Role of inflammatory cytokines in depression: Focus on interleukin-1 β . *Biomed Rep.* 2017 Jan;6(1):15-20.
198. Liu Y, Ho RC, Mak A. Interleukin (IL)-6, tumour necrosis factor alpha (TNF- α) and soluble interleukin-2 receptors (sIL-2R) are elevated in patients with major depressive disorder: a meta-analysis and meta-regression. *J Affect Disord.* 2012 Aug;139(3):230-9.
199. Levine J, Barak Y, Chengappa KN, et al. Cerebrospinal cytokine levels in patients with acute depression. *Neuropsychobiology.* 1999 Nov;40(4):171-6.
200. Wachowska K, Gałeczki P. Inflammation and Cognition in Depression: A Narrative Review. *J Clin Med.* 2021 Dec 14;10(24).
201. Wang Y, Xu J, Liu Y, et al. TLR4-NF- κ B Signal Involved in Depressive-Like Behaviors and Cytokine Expression of Frontal Cortex and Hippocampus in Stressed C57BL/6 and ob/ob Mice. *Neural Plast.* 2018; 2018:7254016.
202. Vian J, Pereira C, Chavarria V, et al. The renin-angiotensin system: a possible new target for depression. *BMC Med.* 2017 Aug 1;15(1):144.
203. Wang JM, Yang LH, Zhang YY, et al. BDNF and COX-2 participate in anti-depressive mechanisms of catalpol in rats undergoing chronic unpredictable mild stress. *Physiol Behav.* 2015 Nov 1; 151:360-8.
204. O'Connor AT, Clark MA. Angiotensin II induces cyclooxygenase 2 expression in rat astrocytes via the angiotensin type 1 receptor. *Neuropeptides.* 2019 Oct; 77:101958.
205. He Y, Han Y, Liao X, et al. Biology of cyclooxygenase-2: An application in depression therapeutics. *Front Psychiatry.* 2022; 13:1037588.
206. López-López AL, Jaime HB, Escobar Villanueva MDC, et al. Chronic unpredictable mild stress generates oxidative stress and systemic inflammation in rats. *Physiol Behav.* 2016 Jul 1; 161:15-23.
207. di Penta A, Moreno B, Reix S, et al. Oxidative stress and proinflammatory cytokines contribute to demyelination and axonal damage in a cerebellar culture model of neuroinflammation. *PLoS One.* 2013;8(2): e54722.

208. Djindjic B, Dzopalic T, Dunjic M, et al. Effects of silica-rich water on systemic and peritoneal inflammation in rats exposed to chronic low-level (900-MHz) microwave radiation. *Gen Physiol Biophys*. 2019 Jan;38(1):83-90.
209. liu S, Li T, Liu H, et al. Resveratrol exerts antidepressant properties in the chronic unpredictable mild stress model through the regulation of oxidative stress and mTOR pathway in the rat hippocampus and prefrontal cortex. *Behav Brain Res*. 2016 Apr 1; 302:191-9.
210. Li X, Wu T, Yu Z, et al. Apocynum venetum leaf extract reverses depressive-like behaviors in chronically stressed rats by inhibiting oxidative stress and apoptosis. *Biomed Pharmacother*. 2018 Apr; 100:394-406.
211. Dandona P, Dhindsa S, Ghanim H, et al. Angiotensin II and inflammation: the effect of angiotensin-converting enzyme inhibition and angiotensin II receptor blockade. *J Hum Hypertens*. 2007 Jan;21(1):20-7.
212. Zhang M, Mao Y, Ramirez SH, et al. Angiotensin II induced cerebral microvascular inflammation and increased blood-brain barrier permeability via oxidative stress. *Neuroscience*. 2010 Dec 15;171(3):852-8.
213. Gonçalves SCA, Bassi BLT, Kangussu LM, et al. Alamandine Induces Neuroprotection in Ischemic Stroke Models. *Curr Med Chem*. 2022;29(19):3483-3498.
214. Kangussu LM, Almeida-Santos AF, Bader M, et al. Angiotensin-(1-7) attenuates the anxiety and depression-like behaviors in transgenic rats with low brain angiotensinogen. *Behav Brain Res*. 2013 Nov 15; 257:25-30.
215. Ranjbar H, Aghaei I, Moosazadeh M, et al. Angiotensin II type 1 receptor blocker losartan attenuates locomotor, anxiety-like behavior, and passive avoidance learning deficits in a sub-chronic stress model. *Iran J Basic Med Sci*. 2018 Aug;21(8):856-862.
216. de Kloet AD, Cahill KM, Scott KA, et al. Overexpression of angiotensin converting enzyme 2 reduces anxiety-like behavior in female mice. *Physiol Behav*. 2020 Oct 1; 224:113002.
217. Kangussu LM, Almeida-Santos AF, Moreira FA, et al. Reduced anxiety-like behavior in transgenic rats with chronically overproduction of angiotensin-(1-7): Role of the Mas receptor. *Behav Brain Res*. 2017 Jul 28; 331:193-198.

İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI

DEPRESYON MODELİ OLUŞTURULAN SIÇANLARDA ALAMANDİNİN KOGNİTİF FONKSİYONLARA VE NÖROİNFLAMASYONA ETKİSİ

ORJİNALLİK RAPORU

% **19**

BENZERLİK ENDEKSİ

% **17**

İNTERNET KAYNAKLARI

% **6**

YAYINLAR

% **8**

ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1

acikbilim.yok.gov.tr

İnternet Kaynağı

% **9**

2

openaccess.bezmialem.edu.tr

İnternet Kaynağı

% **1**

3

Submitted to Erciyes Üniversitesi

Öğrenci Ödevi

% **1**

4

Submitted to The Scientific & Technological
Research Council of Turkey (TUBITAK)

Öğrenci Ödevi

% **1**

5

abis-files.marmara.edu.tr

İnternet Kaynağı

% **1**

6

abakus.inonu.edu.tr

İnternet Kaynağı

<% **1**

7

nek.istanbul.edu.tr:4444

İnternet Kaynağı

<% **1**

8

openaccess.ogu.edu.tr:8080

İnternet Kaynağı

<% **1**

ETİK KURUL İZİN YAZISI

Uyarı: Canlı denekler üzerinde yapılan tüm araştırmalar için Etik Kurul Belgesi alınması zorunludur.

- ☒ Etik Kurul izni gerekmektedir.
- ☐ Etik Kurul izni gerekmemektedir.

Aysu KILIÇ



T.C.
BEZMÎÂLEM VAKIF ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU
KARAR METNİ

SAYI: 2022/22

21.02.2022

KONU: Sn. Prof. Dr. Nuran DARIYERLİ

Sayın, Prof. Dr. Nuran DARIYERLİ

“Depresyon Modeli Oluşturulan Sıçanlarda Renin-Anjiyotensin Sistemin Yeni Komponenti Olan Alamandinin Kognitif Fonksiyonlara ve Nöroinflamasyona Etkisi” başlıklı projenize ait başvurunuz 21.02.2022 tarihinde yapılan Yerel Etik Kurul toplantısında değerlendirilmiş ve onanmıştır.

Çalışılacak Hayvanın	Türü	Sıçan
	Sayısı	35

Prof. Dr. Fahri AKBAŞ

Doç. Dr. Birsan ELİBOL

Doç. Dr. Özgün Yusuf ÖZYILMAZ

- Etik kurulumuzdan onam alan her proje için, çalışma başlamadan üç ay önce çalışılacak hayvan rezervinin uygunluğunu (tür, yaş, cinsiyet) belirlemek amacıyla Deney Hayvanları Laboratuvarına başvurulmalıdır.

KURUM İZNİ YAZILARI

Uyarı: Canlı ve cansız deneklerle yapılan tüm çalışmalar için kurum izin belgelerinin eklenmesi zorunludur. Gizlilik ve mahremiyet içeren durumlarda kurum adı kapatılmalıdır.

- ☐ Kurum izni gerekmektedir.
- ☒ Kurum izni gerekmemektedir.

Aysu KILIÇ



ÖZGEÇMİŞ



