



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
MARMARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**SIÇANLARDA OLUŞTURULAN DEPRESYON MODELİNDE
NOD BENZERİ RESEPTÖR PROTEİNİ 3 İNFLAMAZOMU
ARACILI İNFLAMATUVAR YOLAKLAR VE NİTRİDERJİK
SİSTEM ARASINDAKİ İLİŞKİNİN ARAŞTIRILMASI**

CEREN ÖZKARTAL
DOKTORA TEZİ

FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN
Prof. Dr. Feyza Arıcıoğlu

2017-İSTANBUL



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
MARMARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**SIÇANLARDA OLUŞTURULAN DEPRESYON MODELİNDE
NOD BENZERİ RESEPTÖR PROTEİNİ 3 İNFLAMAZOMU
ARACILI İNFLAMATUVAR YOLAKLAR VE NİTRİDERJİK
SİSTEM ARASINDAKİ İLİŞKİNİN ARAŞTIRILMASI**

CEREN ÖZKARTAL
DOKTORA TEZİ

FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN
Prof. Dr. Feyza Arıcıoğlu

2017-İSTANBUL

TEZ ONAYI

Kurum : Marmara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Programın seviyesi : Doktora
Anabilim Dalı : Farmakoloji
Tez Sahibi : Ceren Özkartal
Tez Başlığı : Sıçanlarda Oluşturulan Depresyon Modelinde NOD-benzeri reseptör proteini 3 İnflamazomu Aracılı İnflamatuvar Yolaklar ve Nitriderjik Sistem Arasındaki İlişkinin Araştırılması
Sınav Yeri : Farmakoloji Anabilim Dalı (Ecz)
Sınav Tarihi : 04.12.2017 (Saat 14:00)

Tez tarafımızdan okunmuş, kapsam ve kalite yönünden Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Danışman (Unvan, Adı, Soyadı)
Prof. Dr. Feyza ARICIOĞLU

Kurumu
Marmara Üni. Eczacılık Fak.
Farmakoloji AbD

İmza


Sınav Jüri Üyeleri (Unvan, Adı, Soyadı)

Prof. Dr. Levent KABASAKAL

Marmara Üni. Eczacılık Fak.
Farmakoloji AbD



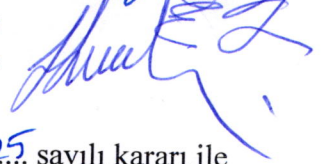
Prof. Dr. Ece GENÇ

Yeditepe Üni. Tıp Fak.
Farmakoloji AbD



Prof. Dr. Erdem TÜZÜN

İstanbul Üni. Sinirbilim AbD
İstanbul Üni. Sinirbilim AbD



Yrd. Doç. Dr. Cem İsmail KÜÇÜKALİ

Yukarıdaki jüri kararı Enstitü Yönetim Kurulu'nun 07/12/2017 tarih ve 25 sayılı kararı ile onaylanmıştır.



Prof. Dr. Göksel ŞENER
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmayla 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 olmadığı beyan ederim.

Ceren ÖZKARTAL

Tarih: 07.11.2017

İmza:

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim süresince TÜBİTAK (Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu) BİDEB (Bilim İnsanı Destekleme Daire Başkanlığı) tarafından, Yurt İçi Genel Doktora Burs Programı (2211/A) kapsamında şahsıma verilen motive edici burs desteği için ***TÜBİTAK'a***

Doktora eğitimime ve bilimsel gelişimime her yönüyle ışık olan, çok değerli bilgi birikimi ve engin tecrübelerinden öğrenebilmeyi şans saydığım, kararlılığı, çalışkanlığı, öğrenme aşkı ve aynı zamanda renkli, pozitif ve yenilikçi kişilik özelliklerini her zaman takdir ettiğim ve örnek aldığım, bizlere kazandırdığı uluslararası vizyona her zaman ayrıca müteşekkir olacağım ve öğrencisi olmaktan her daim büyük gurur ve mutluluk duyacağım çok sevgili tez danışmanım ***Sn. Prof. Dr. Feyza Arıcıoğlu'na,***

Değerli bilgi birikimleri ile eğitimime önemli katkılarda bulunan, maddi, manevi desteklerini her zaman hissettiren ***Sn. Prof. Dr. Levent Kabasakal, Sn. Prof. Dr. Göksel Şener*** ve üzerimde emeği geçen diğer Farmakoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyelerine,

Doktora dönemimde tanışmış olmaktan büyük kıvanç duyduğum, değerli bilimsel katkıları ve sağladıkları sayısız olanaklarla tez çalışmamın moleküler analizlerinin gerçekleştirilmesini mümkün kılan İstanbul Üniversitesi Sinirbilim Anabilim Dalı Öğretim Üyeleri, benim için çok kıymetli ve sevgili ***Sn. Prof. Dr. Erdem Tüzün*** ve ***Sn. Yrd. Doç. Dr. Cem İsmail Küçükali'ye***

Moleküler analizlerdeki desteği ve özverisi için ***Arş. Gör. Canan Ulusoy*** başta olmak üzere emeği geçen tüm Sinirbilim ailesine, immünohistokimyasal analizlerdeki desteklerinden dolayı ***Sn. Prof. Dr. Serap Şirvancı*** ve ***Cansu Kandemir'e*** ve davranış deneylerindeki desteklerinden dolayı sevgili arkadaşım ***Arş. Gör. Rümeyza Keleş'e,***

Lisansüstü eğitimimin ilk durağında bilimsel gelişimime olağanüstü katkılarda bulunan, her daim örnek aldığım, değer ve desteklerini hissettiğim, üzerimde sayısız emeği bulunan çok özel ve sevgili Klinik Eczacılık Anabilim Dalı Öğretim Üyelerinden ***Sn. Prof. Dr. Mesut Sancar, Sn. Prof. Dr. Şule Rabuş, Sn. Yrd. Doç.***

Dr. Betül Okuyan, Sn. Prof. Dr. Fikret Vehbi İzzettin'e ve çatısı altındaki güzel Klinik Eczacılık ailesine,

Lisans eğitimimde büyük emeği olan, bana Farmakolojiyi sevdirek akademik alanda ilerleme isteğimi yeşerten, azmi ve çalışkanlığıyla örnek aldığım, Anadolu Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyelerinden çok kıymetli ve sevgili **Sn. Doç. Dr. Özgür Devrim Can'a**,

Bana kazandırdığı tüm inanılmaz deneyimler için Manchester Üniversitesi Psikofarmakoloji Departmanı Başkanı çok sevgili **Sn. Prof. Jo Neill'a**,

Bu yolculukta beraberce ilerlemekten ve ekip olmaktan her zaman büyük keyif aldığım, desteğini ve güzel dileklerini hiçbir zaman esirgemeyen, dünya iyisi, çok kıymetli dostum ve çalışma arkadaşım **Arş. Gör. Dr. Gökhan Ünal'a**, manevi desteklerini her zaman hissettiren, yardımsever ve azimli çok değerli çalışma arkadaşlarım **Arş. Gör. Ayşe Nur Hazar Yavuz, Arş. Gör. Büşra Ertaş ve Arş. Gör. Dr. Muhammet Emin Çam'a**,

Can Dostum **Dr. Ece Erdağ'a**

Beni hoşgörü, saygı, dürüstlük ve hakkaniyet değerleriyle yetiştiren, yaşamın her aşamasında bu değerlerin ışığında ilerleyebilmeyi, paylaşabilmeyi ve her koşulda bir olabilme bilincini öğreten, her daim hedeflerimde sınırsız, arzularımda ise bilinçli olmayı öğütleyen, koşulsuz ve en büyük destekçim, en iyi kulak verenim, rol modelim ufku engin **canım aileme** bu süreçteki eşsiz manevi destekleri için,

Doktoramın bana bir ömürlük armağanı; biricik eşim ve can yoldaşım **Selçuk'a** ve varlıklarıyla beni ayrıcalıklı kılan çok kıymetli **ikinci aileme** sonsuz anlayışları ve özverileri için,

Minnetlerimi sunarım.

Bu çalışma Marmara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu Başkanlığı tarafından SAG-C-DRP-110915-0417 numaralı proje ile desteklenmiştir.

Ceren ÖZKARTAL, 2017

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

BEYAN	i
TEŞEKKÜR	ii
Tablolar Listesi	vii
Şekiller Listesi	viii
Resimler Listesi	x
Kısaltmalar ve Simgeler Listesi	xi
1. ÖZET	1
2. SUMMARY	2
3. GİRİŞ ve AMAÇ	3
4. GENEL BİLGİLER	8
4.1. Depresyon	8
4.1.1. Tanım ve tarihçesi	8
4.1.2. Tanı kriterleri	9
4.1.3. Epidemiyolojisi	10
4.1.4. Etiyolojisi ve risk faktörleri	12
4.1.5. Prognozu	13
4.1.6. Nöroanatomisi	14
4.1.7. Nörobiyolojisi	16
4.1.8. Tedavisi	19
4.2. Depresyon ve İnflamasyon	23
4.2.1. Sitokin sinyallerinin iletimi	28
4.2.2. Sitokinler ve nörotransmitter metabolizması	29
4.2.3. Sitokinler ve nöroendokrin fonksiyonlar	34
4.2.4. Sitokinler ve nöronal plastisite	36
4.2.5. Sitokinler, mikroglia aktivasyonu ve nöroinflamasyon	37
4.3. Depresyon ve İnflamazom	39
4.3.1. Doğal immün sistem kalıp tanıma reseptörleri	40
4.3.2. NLR ailesi ve inflamazomlar	42
4.3.3. MSS inflamazomları	44

4.3.3.1. NLRP1 inflamazomu	44
4.3.3.2. NLRP2 inflamazomu	45
4.3.3.3. NLRP3 inflamazomu	45
4.3.3.4. AIM2 inflamazomu	47
4.3.4. İnflamazom aktivasyonu	47
4.3.5. İnflamazom patolojileri	51
4.3.5.1. Stres ve depresyonda inflamazom aktivasyonu	54
4.4. Depresyon ve Nitridanjik Sistem	68
4.5. Agmatin	71
4.5.1. Ekzojen kaynakları	71
4.5.2. Biyosentezi ve metabolizması	73
4.5.3. Kinetik profili	77
4.5.4. Vücuttaki dağılımı	78
4.5.5. Temel etki mekanizması	83
4.5.5.1. Reseptör etkileşimleri	83
4.5.5.2. NOS inhibisyonu	84
4.5.6. Biyolojik etkileri	86
4.5.6.1. Sinir sistemindeki etkileri	89
4.6. Agmatin ve Depresyon	93
4.6.1. Agmatin, depresyon ve inflamasyon ilişkisi	100
4.7. Deneysel Depresyon Modelleri	105
4.7.1. Deneysel depresyon modellerinde geçerlilik kavramı	105
4.7.2. Antidepresan aktivite tarama testleri	106
4.7.2.1. Zorunlu yüzme testi	107
4.7.2.2. Kuyruktan asma testi	108
4.7.3. Stresle oluşturulan depresyon modelleri	109
4.7.3.1. Öğrenilmiş çaresizlik modeli	110
4.7.3.2. Erken yaşam stres modelleri	111
4.7.3.3. Sosyal yenilgi stres modelleri	112
4.7.3.4. KÖHS modeli	113
4.7.4. Diğer modeller	115
5. GEREÇ ve YÖNTEM	119
5.1. Kimyasal Maddeler	119

5.2. Deney Hayvanları ve Ortam Koşulları	119
5.3. Deney Grupları	120
5.4. KÖHS Modeli	121
5.5. Davranış Testleri	123
5.5.1. Sükroz tercih testi	123
5.5.2. Zorunlu yüzme testi	126
5.6. Moleküler Analizler	128
5.6.1. Dekapitasyon ve fiksasyon	128
5.6.2. Gen ekspresyon analizleri	128
5.6.2.1. RNA izolasyonu	128
5.6.2.2. cDNA sentezi	130
5.6.2.3. Real-time PCR	130
5.6.3. Western blot protein ekspresyon analizleri	131
5.7. İmmünohistokimyasal Analizler	133
5.8. Verilerin İstatistiksel Analizi	134
6. BULGULAR	135
6.1. Vücut Ağırlığı Bulguları	135
6.2. Davranış Bulguları	136
6.2.1. Sükroz tercih testi	136
6.2.2. Zorunlu yüzme testi	141
6.3. Moleküler Analiz Bulguları	141
6.3.1. Real-time PCR analizleri	141
6.3.1.1. Prefrontal korteks gen ekspresyonları	142
6.3.1.2. Hipokampus gen ekspresyonları	146
6.3.2. Western blot analizleri	149
6.4. İmmünohistokimyasal Analizler	153
7. TARTIŞMA ve SONUÇ	155
8. KAYNAKLAR	177
9. ÖZGEÇMİŞ	223
Ek-1 Bilimsel Faaliyetler	
Ek-2 Etik Kurul Onayı	

TABLolar LİSTESİ

	Sayfa No
Tablo 1. Depresyon tanı kriterleri (ICD-10 ve DSM-5)	10
Tablo 2. NLRP3 inflamazomu aktivasyonunun gösterildiği stres ve depresyon çalışmaları	61
Tablo 3. Agmatin içeren bazı besin kaynakları	73
Tablo 4. Agmatinin doku dağılımı	79
Tablo 5. Agmatinin beyin bölgelerindeki dağılımı	82
Tablo 6. Agmatinin çeşitli reseptör ve bağlanma bölgelerindeki K_i/IC_{50} değerleri	85
Tablo 7. Agmatinin antidepresan-benzeri etkilerinin gösterildiği çalışmalar	101
Tablo 8. Haftalık KÖHS prosedürü takvimi	122
Tablo 9. Çalışmada kullanılan primer dizileri	131
Tablo 10. Deney grupları ağırlık bulguları (g)	135

ŞEKİLLER LİSTESİ

Sayfa No

Şekil 1.	Majör depresyonun yıllık ortalama prevalansı	11
Şekil 2.	Depresyonda en fazla etkilediği kabul edilen beyin bölgeleri	15
Şekil 3.	Depresyon nörobiyolojisinde rol oynayan temel mekanizmalar	17
Şekil 4.	Antidepresan ilaçların tarihsel gelişim süreci	20
Şekil 5.	Antidepresan ilaçların etki mekanizmaları	22
Şekil 6.	Sitokinler ve depresyon nörobiyolojisindeki rolleri	27
Şekil 7.	Proinflamatuvar sitokinlerin serotonin biyoyararlanımı üzerine etkileri	30
Şekil 8.	Triptofan metabolizması ve kinürenin yolağı	31
Şekil 9.	Kinürenin yolağının nörotoksik ve eksitotoksik etkileri	32
Şekil 10.	Proinflamatuvar sitokinlerin dopamin biyoyararlanımı üzerine etkileri	33
Şekil 11.	Stres, proinflamatuvar sitokinler ve HPA eksenin aktivasyonu	35
Şekil 12.	Sitokinler ve GR fonksiyonları	36
Şekil 13.	Doğal immün sistem kalıp tanıma reseptör aileleri	41
Şekil 14.	NLR ailesi	43
Şekil 15.	NLRP multiprotein kompleksi (NLRP inflamazomu)	44
Şekil 16.	NLRP, ASC ve pro-kaspaz-1'in moleküler organizasyonları ve inflamazom formasyonu	46
Şekil 17.	İnflamazom aktivatörleri	48
Şekil 18.	NLRP inflamazomunun iki aşamalı aktivasyon mekanizması	50
Şekil 19.	P2X4/7 reseptörleri ve panneksin-1 kanalının inflamazom aktivasyonundaki rolleri	51
Şekil 20.	Stres ve depresyonda nitridojik sistemin rolü	69
Şekil 21.	L-arjinin metabolizması	74
Şekil 22.	Agmatin metabolizması, poliaminler ve NO	76
Şekil 23.	Agmatinerjik sinaps	91
Şekil 24.	Agmatin ve sinir sistemi etkileri	92

Şekil 25.	Stres modelinde NLRP3 aktivasyonu ve agmatinin etkisi	104
Şekil 26.	Zorunlu yüzme ve kuyruktan asma testleri	109
Şekil 27.	Sükroz tercih testinin yapılışı	124
Şekil 28.	Çalışmanın tasarımı	127
Şekil 29.	Deney gruplarının bazal sükroz tercih değerleri	136
Şekil 30.	Kontrol ve KÖHS gruplarının sükroz tercihleri	137
Şekil 31.	İmipramin grubunun sükroz tercihi	138
Şekil 32.	Agmatin grubunun sükroz tercihi	138
Şekil 33.	Aminoguanidin grubunun sükroz tercihi	139
Şekil 34.	3-Br-7-NI grubunun sükroz tercihi	140
Şekil 35.	KÖHS ve uygulanan tedavilerin sükroz tercihi üzerine etkileri	140
Şekil 36.	KÖHS ve uygulanan tedavilerin immobilité süreleri üzerine etkileri	141
Şekil 37.	NLRP inflamazom bileşenlerinin prefrontal korteks mRNA düzeyleri	143
Şekil 38.	Proinflamatuvar sitokinlerin prefrontal korteks mRNA düzeyleri	144
Şekil 39.	NOS izoenzimlerinin prefrontal korteks mRNA düzeyleri	145
Şekil 40.	NLRP inflamazom bileşenlerinin hipokampus mRNA düzeyleri	146
Şekil 41.	Proinflamatuvar sitokinlerin hipokampus mRNA düzeyleri	148
Şekil 42.	NOS izoenzimlerinin hipokampus mRNA düzeyleri	149
Şekil 43.	NLRP1 ve NLRP3 prefrontal korteks protein ekspresyon düzeyleri	150
Şekil 44.	Kaspaz-1 prefrontal korteks protein ekspresyon düzeyleri	151
Şekil 45.	ASC prefrontal korteks protein ekspresyon düzeyleri	152
Şekil 46.	IL-1 β prefrontal korteks protein ekspresyon düzeyleri	153
Şekil 47.	Hipokampal GFAP immünopozitif hücre sayısı	154

RESİMLER LİSTESİ

	Sayfa No
Resim 1. KÖHS modelinde uygulanan bazı stresörler	123
Resim 2. Sükroz tercih testi düzeneği	125
Resim 3. Zorunlu yüzme testi düzeneği	127
Resim 4. Paraformaldehit perfüzyon fiksasyonu	129
Resim 5. Western blot deneyleri	132
Resim 6. Mikrotom cihazında kesit alınması ve antikor uygulaması	134
Resim 7. NLRP1 ve NLRP3 western blot protein bandı görüntüleri	150
Resim 8. Kaspaz-1 western blot protein bandı görüntüleri	151
Resim 9. ASC western blot protein bandı görüntüleri	152
Resim 10. IL-1 β western blot protein bandı görüntüleri	153
Resim 11. GFAP immünoboyamaları	154

KISALTMALAR ve SİMGELER LİSTESİ

KISALTMALAR

3-Br-7-NI	:	3-Bromo-7-nitroindazol
5-HT	:	5-hidroksitriptamin
ACTH	:	Adrenokortikotropik hormon (Adrenocorticotrophic hormone)
ADK	:	Arjinin dekarboksilaz
AIM2	:	Absent in melanoma-2
AMPA	:	(alfa) Amino-3-hidroksi-5-metil-4-izoksazolpropiyonik asit
ASC	:	Apoptoz ile ilişkili speck-benzeri CARD yapısı taşıyan protein (Apoptosis associated speck-like protein containing CARD)
ATP	:	Adenozin trifosfat
BDNF	:	Beyin-kaynaklı nörotrofik faktör (Brain-derived neurotrophic factor)
BH ₄	:	Tetrahidrobiopterin
BOS	:	Beyin omurilik sıvısı
CARD	:	Kaspaz toplanma yapısı (caspase recruitment domain)
CLR	:	C-tipi lektin reseptörü (C-type lectine receptor)
CRH	:	Kortikotropin salgılatıcı hormon (Corticotropin-releasing hormone)
CRP	:	C-reaktif protein
DAMP	:	Tehlike/hasarlanma ile ilişkili moleküler kalıplar (Danger/damage associated molecular patterns)
DAO	:	diaminoksidaz
DSM	:	Ruhsal Bozuklukların Tanısal ve İstatistiksel El Kitabı (Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders)
DSÖ	:	Dünya Sağlık Örgütü
eNOS	:	Endotelyal nitrik oksit sentetaz
GABA	:	Gama-amino-bütirik asit
GFAP	:	Glial fibriller asidik protein

GR	:	Glukokortikoid reseptörü
GSK	:	Glikojen sentaz kinaz
HMGB1	:	Yüksek mobilite grup box 1 (high mobility group box 1)
HPA	:	Hipotalamo-pitüiter-adrenal (aks)
ICD	:	Uluslararası Hastalıkların Sınıflandırılması (International Classification of Diseases)
IDO	:	İndolamin 2,3-dioksijenaz
IFN	:	İnterferon
IL	:	İnterlökin
i.c.v.	:	intraserebroventriküler
i.p.	:	İntraperitoneal
i.v.	:	intravenöz
iNOS	:	İndüklenebilir nitrik oksit sentetaz
KBB	:	Kan-beyin bariyeri
KÖHS	:	Kronik öngörülemeyen hafif stres
L-DOPA	:	L-3,4-dihroksifenilalanin
LPS	:	Lipopolisakkarit
LRR	:	Lösinden zengin tekrar yapısı (leucin rich repeat domain)
MAO	:	Monoamino oksidaz
MAPK	:	Mitojen ile aktive olan protein kinaz
MSS	:	Merkezi sinir sistemi
mTOR	:	Mammalian target of rapamycin
NACHT	:	Nükleotid bağlayan oligomerizasyon yapısı (Nucleotide-binding oligomerization domain)
NARİ	:	Seçici noradrenalin reuptake inhibitörü
NDRI	:	Noradrenalin ve dopamin reuptake inhibitörü
NF-κB	:	Nükleer faktör kappa B
NLRP	:	NOD-benzeri reseptör pirin yapısı taşıyan proteini (NOD-like receptor pyrin domain containing)
NLR	:	NOD-benzeri reseptör
NMDA	:	N-metil-D-aspartat

nNOS	:	Nöronal nitrik oksit sentetaz
NO	:	Nitrik oksit
NOS	:	Nitrik oksit sentetaz
NPY	:	Nöropeptid Y
Nrf2	:	Eritroid kaynaklı nükleer faktör 2
ODK	:	Ornitin dekarboksilaz
P2X7	:	Pürinerjik 2X7
PAMP	:	Patojen ile ilişkili moleküler kalıplar (Pathogen associated molecular patterns)
PI3K	:	Fosfoinozidit 3-kinaz (Phosphoinositide 3-kinase)
PPAR- γ	:	Peroksizom proliferator ile aktive edilen reseptör gama
PVDF	:	Poliviniliden florid
RIG	:	Retinoik asit-indüklenebilir gen
SDS	:	Sodyum dodesil sülfat
SNRİ	:	Serotonin ve noradrenalin reuptake inhibitörü
SSAT	:	Spermidin/spermin asetil transferaz
SSRİ	:	Seçici serotonin geri reuptake inhibitörü
STAT5	:	Sinyal transdüktörü ve transkripsiyon 5 faktör aktivatörü
TLR	:	Toll-benzeri reseptör (Toll-like receptor)
TNF	:	Tümör nekroz faktör
TSA	:	Trisiklik antidepresan

SİMGELER

α	:	Alfa
β	:	Beta
γ	:	Gama
κ	:	Kappa
μ	:	Mü
σ	:	Sigma



Sıçanlarda oluşturulan depresyon modelinde NOD benzeri reseptör proteini 3 inflamazomu aracılı inflamatuvar yollar ve nitriderjik sistem arasındaki ilişkinin araştırılması

Öğrencinin Adı: Ceren Özkartal

Danışmanı: Prof. Dr. Feyza Arıcıoğlu

Anabilim Dalı: Farmakoloji

1. ÖZET

Amaç: Bu çalışmada kronik öngörülemez hafif stres (KÖHS) modelinde agmatin, indüklenabilir ve nöronal nitrik oksit sentetaz inhibitörleri (iNOSi ve nNOSi) ile yapılan tedavilerin NOD-benzeri reseptör proteini (NLRP) inflamazomu aracılı nöroinflamatuvar yollar ve depresyon üzerindeki etkisinin araştırılması amaçlandı.

Gereç ve Yöntem: Erişkin erkek Sprague-Dawley sıçanlar 6 gruba ayrıldı: Kontrol, KÖHS, KÖHS+İMİ (İmipramin; 10 mg/kg/gün), KÖHS+AGM (Agmatin; 40 mg/kg/gün), KÖHS+iNOSi (Aminoguanidin; 50 mg/kg/gün) ve KÖHS+nNOSi (3-Br-7-NI; 20 mg/kg/gün). KÖHS modeli 6 hafta süreyle, tedaviler ise modelin son 3 haftası boyunca günde 1 kez intraperitoneal (i.p.) olarak uygulandı. Depresyon-benzeri davranışlar; sükröz tercih ve zorunlu yüzme testleriyle değerlendirildi. NLRP inflamazom bileşenleri, proinflamatuvar sitokinler ve NOS düzeyleri prefrontal korteks ve hipokampüste araştırıldı. Gen ve protein analizleri; real-time PCR ve western blot, astroglial aktivasyon ise immünohistokimyasal yöntemle incelendi.

Bulgular: KÖHS modelinde depresyon-benzeri davranışlara NLRP inflamazom bileşenleri, proinflamatuvar sitokinler, iNOS, eNOS düzeyleri ve astroglial aktivasyonda artış eşlik ettiği, bu artışın uygulanan tedavilerle bölge ve değerlendirilen parametre bazında farklı düzeylerde baskılandığı görüldü. NLRP3 düzeylerinin agmatin tedavisiyle, NLRP1 düzeylerinin ise NOS inhibitörleri ile daha güçlü şekilde baskılandığı saptandı.

Sonuçlar: Kronik stres maruziyeti ile gelişen depresyona NLRP3 yanında NLRP1 inflamazom aktivasyonunun da eşlik edebileceği, inflamazom yolağının baskılanması aracılığıyla antidepresan etki oluşabileceği ve nitriderjik sistem modülasyonunun terapötik bir değerinin olabileceği gösterildi.

Anahtar Sözcükler: Depresyon, inflamazom, NLRP, agmatin, NOS inhibitörleri

Investigating the association between NOD like receptor protein 3 inflammasome mediated inflammatory pathways and nitridergic system in a rat model of depression

Student's name: Ceren Özkartal

Supervisor: Prof. Feyza Arıcıoğlu

Department: Pharmacology

2. SUMMARY

Objective: The aim of the present study was to investigate the effects of agmatine, inducible and neuronal nitric oxide synthase inhibitors (iNOSi and nNOSi) on NOD-like receptor protein (NLRP) inflammasome-mediated neuroinflammatory pathways and depression in chronic unpredictable mild stress (CUMS) rat model of depression.

Materials and Methods: Adult male Sprague-Dawley rats were divided into 6 groups: Control, CUMS, CUMS+IMI (Imipramine; 10 mg/kg/day), CUMS+AGM (Agmatine; 40 mg/kg/day), CUMS+iNOSi (Aminoguanidine; 50 mg/kg/day) and CUMS+nNOSi (3-Br-7-NI; 20 mg/kg/day). CUMS model was applied for 6 weeks and the treatments were daily administered via intraperitoneal (i.p.) route for the last 3 weeks. Depression-like behaviors were assessed by sucrose preference and forced swim tests. NLRP inflammasome components, proinflammatory cytokines and NOS levels were investigated in prefrontal cortex and hippocampus. The gene and protein analysis were conducted by real-time PCR and western blot while astroglial activation was assessed immunohistochemically.

Results: CUMS-induced depression-like behaviors accompanied with increased NLRP inflammasome components, proinflammatory cytokines, iNOS, eNOS levels and astroglial activation were suppressed by the treatments in different levels based on the region and parameter. NLRP3 and NLRP1 levels were suppressed more efficiently by agmatine and NOS inhibitors treatments, respectively.

Conclusions: It was demonstrated that the activation of NLRP1 and NLRP3 inflammasomes together may be involved in CUMS-induced depression, the inhibition of inflammasome pathway may be associated with antidepressant effects and the modulation of nitridergic system might have therapeutic significance.

Key words: Depression, inflammasome, NLRP, agmatine, NOS inhibitors

3. GİRİŞ ve AMAÇ

Major depresyon, dünyada yaygın olarak görülen, ciddi ve yaşam kalitesini önemli ölçüde olumsuz etkileyebilen kompleks bir psikiyatrik hastalıktır (Kessler, 2012). Depresif duygudurum, haz veren aktivitelere karşı ilgide ve öz saygıda azalma, kendini değersiz ve suçlu hissetme, uyku ve yeme bozuklukları ile bilişsel fonksiyonlarda bozulma gibi temel belirtilerle karakterize bir hastalık olan depresyon; ölüm ve intihar düşüncelerinin eşlik edebildiği yaşamı tehdit edebilen önemli bir sağlık sorunudur (Skolnick, 2002). Hastalıkların topluma getirdiği sosyal ve ekonomik yük boyutu bakımından incelendiği Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) raporuna göre depresyonun 2020 yılında iskemik kalp hastalığından sonra ikinci sırada; 2030 yılında ise dünya genelinde ilk sırada yer alacağı öngörülmektedir (Lepine ve Briley, 2011).

Depresyonun etiyolojisi günümüzde halen tam olarak aydınlatılabilmiş değildir (Palazidou, 2012). Yaklaşık 50 yıl önce antidepressan ilaçların keşfiyle birlikte depresyonun beyinde monoamin yapısındaki nörotransmitterlerin azalmasıyla oluşabileceği öne sürülmüş ve bu görüş günümüz depresyon tedavisini şekillendiren ‘monoamin hipotezi’ olarak kabul görmüştür (Millan ve ark., 2015). Bugün depresyon tedavisi halen temel olarak monoaminerjik aşırımı güçlendirerek etkisini gösteren antidepressan ilaçlarla sağlanmaktadır (Otte ve ark., 2016). Tedavide geçmişe kıyasla gelişmeler olmasına karşın, yaklaşık her üç hastadan birinin söz konusu tedavilere yanıt vermiyor olması ve yanıt alınan hastalarda ise antidepressan etkilerin geç ortaya çıkması önemli sorunlar olarak görülmektedir (Block ve Nemeroff, 2014; Montes ve ark., 2004). Bu durum hastanın tedaviye uyuncunu olumsuz etkileyerek istenilen zamanda ve düzeyde tedavi yanıtının sağlanamaması problemini beraberinde getirmektedir (Block ve Nemeroff, 2014; Montes ve ark., 2004). Bu doğrultuda; gerek etkili yeni tedavi stratejilerinin gündeme getirilebilmesi gerekse depresyon patofizyolojisinin daha iyi anlaşılabilmesine yönelik yapılan çalışmalar önem arz etmektedir.

Özellikle son yıllarda edinilen bilgiler depresyon ve inflamasyon arasındaki ilişkiye işaret etmektedir (Cai ve ark., 2015; Miller ve ark., 2009; Raison ve ark., 2006;

Reus ve ark., 2015). Depresyon prevalansının birçok otoimmün ve/veya kronik inflamatuvar hastalık varlığında arttığı, çeşitli proinflamatuvar sitokinlerin tedavi/uygulamalarının insan/hayvanlarda depresyon benzeri tablo meydana getirdiği, diğer taraftan bazı antiinflamatuvar yaklaşımların antidepresan etkiler oluşturduğu gösterilmiştir (Faridhosseini ve ark., 2014; Haroon ve ark., 2014; Iwata ve ark., 2013; Koo ve Duman, 2008; Raison ve ark., 2006; Sahin ve ark., 2016b; Tying ve ark., 2006). Klinik meta analiz çalışmalarında antidepresan tedaviye direnç gelişmesi ile inflamasyon arasında bir ilişki olabileceği de rapor edilmiştir (Strawbridge ve ark., 2015). Buradan hareketle; hastalığın tanısı ve antidepresan tedavi seçimi/planlanması aşamasında proinflamatuvar sitokin düzeylerinin belirlenmesinin, tedavi başarısı için bir belirteç olabileceği, sitokin düzeyleri yüksek bulunan hastalarda, tedaviye antiinflamatuvar ilaçların adjuvan olarak eklenebileceği gibi önemli klinik çıktılar öngörülmektedir. Bu kapsamda inflamatuvar sitokinlerden özellikle interlökin (IL)-1 β düzeylerindeki değişikliklerin başta depresyon ve diğer stresle ilişkili patolojilerde önemli bir biyobelirteç olabileceği düşünülmektedir (Ellul ve ark., 2016; Iwata ve ark., 2013; Kaufmann ve ark., 2017; Koo ve Duman, 2008; Strawbridge ve ark., 2015).

Depresyon ve inflamasyon arasındaki ilişkiden hareketle son dönemde inflamatuvar yanıtları başlatan mekanizmalar üzerine yoğunlaşmıştır (Kaufmann ve ark., 2017). Bu kapsamda; doğal immün sistem kalıp tanıma reseptörleri ailesinin bir üyesi olan NOD benzeri reseptör proteini (NLRP) 3 ve aktivasyonu ile oluşan multiprotein kompleks yapıdaki NLRP3 inflamazomunun özellikle IL-1 β yanıtlarını başlatması nedeniyle depresyon inflamasyon ilişkisine yeni bir boyut kazandırabileceği düşünülmektedir (Iwata ve ark., 2013). Beyinde mikroglia hücrelerinde bulunan sitozolik reseptör proteini NLRP3, normal koşullarda inaktif halde bulunurken; stres veya hasarlanma gibi tehlike uyaranları varlığında aktive olarak yapıya adaptör proteini apoptoz ile ilişkili speck-benzeri CARD yapısı taşıyan protein (ASC) ve pro-kaspaz-1'in bağlanmasıyla multiprotein kompleks bir yapı (inflamazom) kazanmaktadır. İnflamazom aktivasyonu sonucu pro-kaspaz-1'den kaspaz-1 serbestleşerek IL-1 β ve IL-18 proinflamatuvar sitokinlerinin üretimi ve salınımı gerçekleşmektedir (Davis ve ark., 2011; Kersse ve ark., 2011; Lamkanfi ve Dixit, 2012). Bu alanda son birkaç yılda yapılan deneysel ve küçük çaplı klinik

çalışmalarda stres ve depresyonda NLRP3 inflamazom aktivasyonu rapor edilmiştir (Alcocer-Gomez ve ark., 2014; Alcocer-Gomez ve ark., 2016; Baune, 2015; Iwata ve ark., 2013; Li ve ark., 2016; Lu ve ark., 2014; Pan ve ark., 2014; Sahin ve ark., 2016a; Xue ve ark., 2015; Zhang ve ark., 2015; Zhang ve ark., 2014). Diğer taraftan daha fazla nöronlarda eksprese olduğu bilinen NLRP1 inflamazomu ve depresyon nörobiyolojisindeki olası rolü hakkında literatürde bir bilgi bulunmamaktadır (Kigerl ve ark., 2014). Bu doğrultuda çalışmamızda her iki inflamazom proteini, NLRP1 ve NLRP3 aktivasyonunun irdelenmesi amaçlandı.

Nitrik oksit (NO) sinyal yolağının stresle ilişkili patolojilerin nörobiyolojisinde önemli rol oynadığı düşünölmektedir (Chen ve ark., 2015; Dhir ve Kulkarni, 2011; Kudlow ve ark., 2016). NO; L-arjininden NO sentetaz (NOS) enzimi aracılığıyla sentezlenir. NOS enziminin; nöronal NOS (nNOS), indöklenebilir NOS (iNOS) ve endotelyal NOS (eNOS) olmak üzere üç izoformu bulunmaktadır. Seçici veya seçici olmayan çeşitli NOS enzimi inhibitörlerinin antidepresan ve anksiyolitik benzeri etkiler meydana getirdiği, diğer taraftan paroksetin gibi klinikte yaygın kullanılan bazı antidepresan ilaçların NOS inhibisyonu yapabildiğinin gösterilmesi; depresyonda nitriderjik sistem modölyasyonunun potansiyel terapötik önemine işaret etmektedir (Wegener ve Volke, 2010). Diğer taraftan NO sinyal yolağı modölyasyonun depresyon veya kronik stres patolojilerinde inflamazom aktivasyonu ve steril inflamasyon yanıtları üzerindeki etkisinin irdelendiği bir çalışma bulunmamaktadır. Kaufmann ve arkadaşlarının 2017 tarihli gözden geçirme çalışmalarında da bu hususa dikkat çekilmiş; depresyonla ilişkisi bakımından NO sinyal yolağının inflamazom kompleksi üzerindeki olası rollerinin araştırılması önemli bir hedef olarak belirlenmiştir (Kaufmann ve ark., 2017).

Bu bilgiler işığında çalışmamızda NO sinyal yolağı modölyasyonunun depresyonda inflamazom aktivasyonu bakımından terapötik değerinin araştırılması amaçlandı. Bu kapsamda çalışmamızda antidepresan etki potansiyeline sahip seçici iNOS (aminoguanidin), nNOS (3-Bromo-7-nitroindazol; 3-Br-7-NI) ve endojen NOS inhibitörü agmatin tedavilerinin depresyonda NLRP inflamazom yolağı üzerine etkilerinin karşılaştırmalı olarak ele alınması planlandı.

Agmatin; vücutta yaygın olarak bulunan ve beyinde nörotransmitter, nöromodülatör işlevleri olabileceği düşünülen amin yapısında endojen bir maddedir (Reis ve Regunathan, 2000). Endojen agmatin NO gibi organizmada aminoasit L-arjinin'den sentezlenir. Kompleks bir farmakolojik etki profiline sahip olduğu düşünülen agmatinin; imidazolin reseptörleri ve α_2 -adrenerjik reseptörlere bağlandığı, N-metil-D-aspartat (NMDA) reseptörleri, nikotinik ve 5-hidroksitriptamin (5-HT) 3 gibi iyon kanalı ile çalışan reseptörleri bloke ettiği gösterilmiştir (Molderings ve Haenisch, 2012; Piletz ve ark., 2013; Regunathan, 2006). Bunların yanında NO sinyal yolağının endojen modülatörü olduğu, iNOS ve nNOS enzimlerini yarışmalı olarak inhibe ettiği ve eNOS'u stimüle ettiği bilinmektedir (Auguet ve ark., 1995; Galea ve ark., 1996; Mun ve ark., 2010). Bu şekilde çoklu etki kalıbına sahip agmatinin çeşitli MSS patolojilerinde terapötik önemi rapor edilmiştir (Freitas ve ark., 2016; Neis ve ark., 2017).

Yapılan deneysel ve klinik çalışmalarda endojen agmatin düzeylerinin stres ve depresyonda değiştiği gösterilmiş, bu bakımdan agmatinin duygudurum modülasyonunda rol oynayan bir molekül olabileceği fikri gündeme gelmiştir (Aricioglu ve ark., 2003c; Bernstein ve ark., 2012; Halaris ve Piletz, 2001; Halaris ve ark., 1999). Buradan hareketle ekzojen olarak uygulanan agmatinin özellikle stres, anksiyete ve depresyon üzerine etkileri deneysel çalışmalarda ele alınmış ve agmatinin antistres, antidepresan ve anksiyolitik-benzeri etkiler meydana getirdiği gösterilmiştir (Freitas ve ark., 2016b). Deneysel çalışmaların yanı sıra yakın tarihte major depresyon tanılı az sayıdaki hasta üzerinde gerçekleştirilen pilot bir klinik çalışmada agmatin tedavisinin hastalarda antidepresan etki meydana getirdiği rapor edilmiştir (Shopsin, 2013).

Agmatinin nöroprotektif ve antiinflamatuvar etki potansiyeline sahip olduğu da bilinmektedir (El-Agamy ve ark., 2014a; 2014b; Li ve ark., 2014). Bu kapsamda son yıllarda sınırlı sayıdaki çalışma ile agmatinin depresyonda inflamasyon hipotezine de katkı sağlayan yeni bir yaklaşım olabileceği öne sürülmektedir (Neis ve ark., 2014; Sahin ve ark., 2016a; Taksande ve ark., 2015). Buna karşın depresyon nörobiyolojisinde inflamasyon hipotezi açısından en güncel görüşlerden biri olan

inflamazom yolağı ile agmatinin antidepresan etkilerinin birlikte ele alındığı bir çalışma bulunmamaktadır.

2016 yılında ekibimiz tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada agmatinin sub-kronik kısıtlama stresi modelinde NLRP3 inflamazom aktivasyonu ve sitokinler aracılı inflamatuvar yanıtlar üzerine etkileri araştırılmıştır (Sahin ve ark., 2016a). Elde ettiğimiz verilere göre akut agmatin uygulaması, sıçanlarda stresle artan NLRP3 inflamazom aktivasyonunu ve proinflamatuvar sitokinler aracılığıyla gelişen inflamatuvar yanıtları baskılamıştır. Sözü edilen çalışma bir stres modeli olduğundan davranış düzeyindeki incelemelere yer verilememiştir (Sahin ve ark., 2016a).

Gerek agmatinin antiinflamatuvar potansiyeline dikkat çeken literatür birikimi gerekse önceki çalışma bulgularımız; endojen bir NO modülatörü olan agmatinin iyi valide edilmiş, geçerliliği ve güvenilirliği kanıtlanmış bir depresyon modelinde NLRP inflamazomu ve inflamatuvar yanıtlar ile davranış düzeyindeki etkilerinin ilişkilendirilerek araştırılması için önemli bir dayanak oluşturmuştur.

Bu doğrultuda çalışmamızda;

(i) Sıçanlarda kronik öngörülemez hafif stres (KÖHS) ile oluşturulan deneysel depresyon modelinde NLRP inflamazom aktivasyon mekanizmaları ve ilişkili nöroinflamasyon göstergelerinin araştırılması ve bu doğrultuda son yıllarda depresyonda önemine dikkat çekilen NLRP3 yanında NLRP1 aktivasyonunun da irdelenmesi,

(ii) KÖHS modelinde agmatinin antidepresan etki potansiyelinin inflamazom aktivasyon mekanizmaları ve nöroinflamasyon açısından ilişkilendirilerek incelenmesi,

(iii) NO sinyal yolağı modülasyonunun inflamazom aktivasyonu üzerindeki rolünün belirlenebilmesi için, iNOS inhibitörü aminoguanidin ve nNOS inhibitörü 3-Br-7-NI ile endojen NOS inhibitörü agmatinin etkilerinin karşılaştırmalı olarak incelenmesi amaçlanmıştır.

4. GENEL BİLGİLER

4.1. Depresyon

4.1.1. Tanım ve tarihçesi

Diğer psikiyatrik hastalıklar içerisinde depresyonun 2500 yıl öncesine dayanan uzun ve iyi aydınlatılmış bir tarihi geçmişe sahip olduğu söylenebilir (Horwitz ve ark., 2016). Yerini daha sonra bugün kullanılan depresyon terimine bırakacak olan melankoli (siyah safra) terimi ilk kez Antik Yunan döneminde Hipokrat metinlerinde kullanılmıştır (M.Ö. 460-370) (Ban, 2014). O dönemde melankoli; epilepsi, histeri ve transvestizm dışında kalan diğer akıl hastalıklarını kapsayan genel bir terim olarak kullanılmaktaydı (Jackson, 2008). İlk kez 1. yüzyılda Celsus'un 'De Medicina' isimli eserinde melankoli terimi, üzüntü ve acı anlamları ile ilişkilendirilmiştir. Bundan yaklaşık 400 yıl sonra, 5. yüzyılda Caelius Aurelianus tarafından 'manevi ızdırap, elem, keder, sessizlik, yas tutma, ağlama durumu' gibi ifadeler karşılık olarak kullanılmıştır. 2. yüzyılda Galen, Hipokrat'ın 'Beden Sıvıları' kuramını yeniden ele almış; siyah safra ve sarı safra ayrımı yaparak sarı safranın melankolik duygudurumdan sorumlu olduğu kabulünde bulunmuştur. Buna göre siyah safrayı hastalık nedeni olarak gören eski otoritelerin aksine Galen; sarı safra, diyet eksikliği ve duygulanım gibi etkenleri de hastalığın nedenleri olarak görmüştür. Galen'in geliştirdiği kavram orta çağ boyunca Rönesans Dönemi'ne kadar melankoliye bakış açısını belirlemiştir (Ban, 2014). İlk kez 17. yüzyılda Robert R. Burton'un kaleme aldığı dönemin ünlü incelemelerinden 'The Anatomy of Melancholy (Melankolinin Anatomisi)' adlı eserde 'depresyon' ifadesi tıp literatürüne girmiştir (Horwitz ve ark., 2016). Burton; depresyonun üç temel boyutuna dikkat çekmiştir. Bunlar duygudurum, kognisyon ve fiziksel belirtilerdir.

19. yüzyıl; Emil Kraepelin, Sigmund Freud, Adolf Meyer gibi tarihte yer edinmiş ünlü psikiyatri hekimlerinin psikiyatrik hastalıklara getirdiği yeni yaklaşımlara tanıklık etmiş ve bugün depresyonun da aralarında bulunduğu psikiyatrik hastalıkların tanı ve teşhisinde kullanılan uluslararası kriterlerin oluşmasına öncülük etmiştir (Horwitz ve ark., 2016). Bu çalışmaların bir ürünü olan, 1972 yılında yayınlanan

Feighner Kriterleri ise bugün geliştirilerek, güncellenen depresyonun tanımını doğurmuştur (Feighner ve ark., 1972). Feighner Kriterleri'ne göre depresyon tanımının en az 3 kriteri sağlaması gerekmektedir: (1) Elem, keder, ümitsizlik ile karakterize disforik duygudurum, (2) iştah kaybı, uyku problemi, ajitasyon, enerjisizlik, ilgi kaybı, düşünce güçlüğü suçluluk duygusu, tekrarlayan intihar düşünceleri belirtilerinden en az 5 tanesinin bulunması, (3) bu belirtilerin en az 1 ay süreyle devam ediyor olmasıdır (Feighner ve ark., 1972; Horwitz ve ark., 2016).

4.1.2. Tanı kriterleri

Depresyon, toplumda yaygın olarak görülen, ciddi ve ilerleyici yönüyle yaşam kalitesini büyük ölçüde etkileyen kompleks bir psikiyatrik hastalıktır (Kessler, 2012). Depresif ruh hali, haz veren aktivitelere karşı ilgide azalma, kişinin kendine duyduğu öz saygının azalması, kendini değersiz ve suçlu hissetme, uyku ve yeme bozuklukları ile bilişsel fonksiyonlarda bozulma gibi temel belirtilerle karakterize bir duygudurum hastalığı olan depresyon; günümüzde halen önemli bir sağlık sorunu olmaya devam etmektedir (Skolnick, 2002).

Psikiyatrik bozuklukların tanımlanması ve sınıflandırılmasında DSÖ ve Amerikan Psikiyatri Birliği tarafından düzenlenen ve belli aralıklarla güncellenen iki farklı sınıflandırma sistemi yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu sınıflandırma sistemlerinde 'Depresif Bozukluk' veya 'Depresif Epizod' terimleri altında sınıflandırılan depresyonun; ilgili sınıflandırmalar üzerinden birçok farklı alt tipi de tanımlanmıştır. Amerikan Psikiyatri Birliği'nin yayımladığı 'Ruhsal Bozuklukların Tanısal ve İstatistiksel El Kitabı (Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders; DSM)' sınıflandırma sistemi içerisinde 'Depresif Bozukluklar' bölümü altında tanımlanan 'Majör Depresif Bozukluk' tekli epizod ve tekrarlayan epizodlar alt tipleri ile sınıflandırılmıştır. 2013 yılında güncellenen DSM-5 kriterlerine göre majör depresif bozukluk; duygudurum ve haz veren aktivitelere karşı olan ilginin değişmesi ile karakterize, bilişsel ve vejetatif belirtilerin eşlik ettiği, en az iki hafta süreyle devam eden depresif epizod veya epizodlar olarak tanımlanmaktadır (Otte ve ark., 2016). DSÖ'nün kullandığı sınıflandırma sistemi ise 'Uluslararası Hastalıkların

Sınıflandırılması (International Classification of Diseases; ICD)’ olup; tüm hastalıkları kapsayan daha genel bir sınıflandırma sistemidir. 2016 yılında güncellenen ICD-10’un 5. bölümü ‘Mental ve Davranış ile İlişkili Hastalıklar’ kısmına ayrılmıştır. Bu bölümde depresyon, ‘Duygudurum Hastalıkları’ başlığı altında ‘Depresif Epizod’ ve alt tipleri ile ‘Tekrarlayan Depresif Bozukluk’ ve alt tipleri şeklinde sınıflandırılmaktadır (<http://apps.who.int/classifications/> Erişim Tarihi: 22 Ağustos 2017). Aşağıda da görüldüğü üzere depresyon teşhisinde kullanılan ICD-10 ve DSM-5 kriterleri büyük oranda benzerlik göstermesine karşın aralarında bazı farklılıklar mevcuttur (Tablo 1).

Tablo 1. Depresyon tanı kriterleri (ICD-10 ve DSM-5).

ICD-10 Tanı Kriterleri ¹	DSM-5 Tanı Kriterleri ²
Depresif duygudurum*	Depresif duygudurum (üzüntü, boşluk, ümitsizlik hisleri)*
Zevk veren aktivitelere karşı olan ilginin azalması veya kaybolması (anhedoni) *	Zevk veren aktivitelere karşı olan ilginin azalması veya kaybolması (anhedoni) *
Vücut ağırlığı ve iştah değişiklikleri	Dikkate değer kilo kaybı, kilo alımı veya iştah artışı (1 ay içerisinde vücut ağırlığının %5 ve üzeri kadar değişim)
Uyku bozuklukları	Uyku bozuklukları (insomnia veya hipersomnia)
Psikomotor ajitasyon veya retardasyon	Psikomotor ajitasyon veya retardasyon
Bitkinlik, enerjisizlik *	Bitkinlik, enerjisizlik
Özgüvenin azalması, kaybolması, mantık dışı suçluluk hissi	Kendini değersiz ve suçlu hissetme
Düşünme ve konsantrasyonda güçlük, karar verme yeteneğinin zayıflaması	Düşünme ve konsantrasyonda güçlük, karar verme yeteneğinin zayıflaması
Tekrarlayan ölüm ve intihar düşünceleri	Tekrarlayan ölüm ve intihar düşünceleri

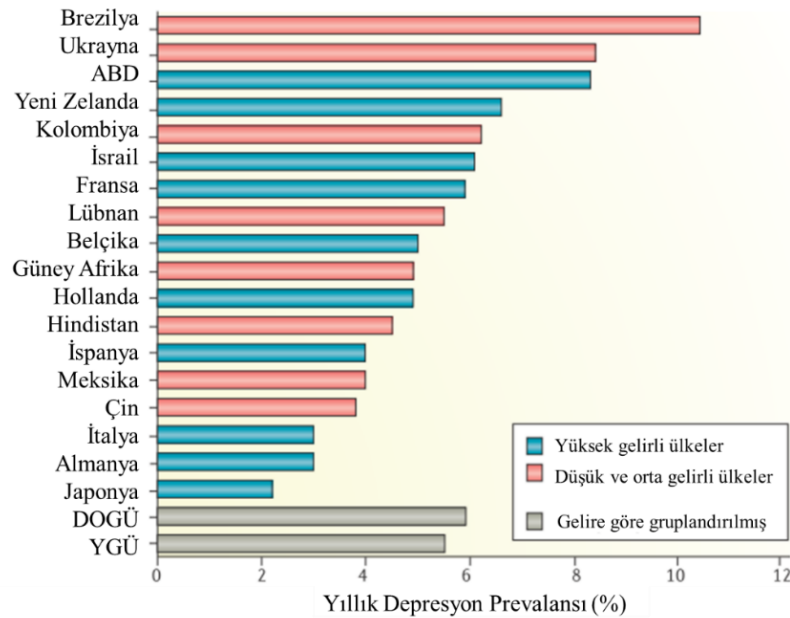
¹ Tanı için; en az iki tanesi * ile gösterilen, en az iki tanesi ise diğer belirtilerden olacak şekilde en az 4 belirtinin en az 2 hafta süreyle devam etmesi gerekmektedir. ² Tanı için; en az bir tanesi * ile gösterilen belirtilerden olmak kaydıyla toplam en az 5 belirtinin bulunması en az 2 hafta süreyle devam etmesi gerekmektedir.

4.1.3. Epidemiyolojisi

Majör depresyonun toplumda yetişkinlerde görülme sıklığı dünya genelinde yaklaşık %6 düzeylerinde rapor edilmektedir (Bromet ve ark., 2011). Bu oran 12 aylık hastalık prevalansını ifade etmektedir. Yaşam boyu depresyon prevalansının ise yaklaşık 3 katı düzeyinde yani %18 olduğu tahmin edilmektedir. Buna göre dünya

genelinde yaklaşık her 6 bireyden 1'inin yaşamlarının bir bölümünde depresyona girdikleri kabul edilmektedir (Otte ve ark., 2016).

Dünya genelinde 18 ülkede ve yaklaşık 90 000 bireyde majör depresyonun yıllık prevalansının incelendiği Dünya Ruh Sağlığı Anketi (World Mental Health Survey), sonuçlarına göre yıllık prevalans en düşük %2,2 oranında Japonya'da görülürken; en yüksek %10,4 oranında Brezilya'da tespit edilmiştir (Otte ve ark., 2016) (Şekil 1). İlgili raporda depresyonunun toplumda görülme sıklığı ile ülkelerin gelir düzeyleri arasındaki ilişki de incelenmiştir. Buna göre araştırmaya dahil edilen yüksek gelir düzeyine sahip 10 ülkede görülen ortalama yıllık depresyon prevalansı (%5,5) ile düşük ve orta gelirli 8 ülkenin yıllık ortalama prevalansı (%5,9) birbirlerine çok benzer düzeylerde bulunmuştur (Şekil 1). Bu veri depresyonun sıklıkla yorumlandığı gibi bir 'modern dünya' sağlık problemi olmadığını ve çok ötesinde irdelenmesi gereken faktörler olduğuna işaret etmiştir. Dahası, depresyonun ilk ortaya çıktığı ortalama yaş aralığı, şiddeti, semptom profili ile sosyodemografik ve çevresel faktörler (cinsiyet, eğitim, yaşanan olumsuz deneyimler gibi) gibi etmenlerin toplumlar arasında ülke ve kültür yapısından çoğunlukla bağımsız bir şekilde benzer olduğu da gösterilmiştir (Otte ve ark., 2016).



Şekil 1. Majör depresyonun yıllık ortalama prevalansı. Düşük ve Orta Gelirli Ülkeler; DOĞÜ, Yüksek Gelirli Ülkeler; YGÜ (Otte ve ark., 2016).

Kadınlarda depresyon erkek bireylere kıyasla yaklaşık 2 kat fazla görülmektedir (Seedat ve ark., 2009). Bu fark; depresif epizod süresinin uzunluğundan çok; epizodların sıklığının erkeklere göre fazla oluşu ve benzer biçimde tedaviye alınan yanıtın daha düşük olması ile ilişkilendirilmiştir (Otte ve ark., 2016). Her iki cinsiyette de depresyonun ilk kez ortaya çıktığı yaş; ortalama 25 olarak raporlanmaktadır. Depresyona yakalanma riskinin en yüksek olduğu yaş aralığı ise orta ve geç ergenlik döneminden 40 yaşına kadar olan dönem olarak ifade edilmektedir (Bromet ve ark., 2011).

4.1.4. Etiyolojisi ve risk faktörleri

Depresyonun etiyolojisi günümüzde halen tam olarak aydınlatılmış ve net bir şekilde anlaşılabilmiş değildir. Genetik etmenler ve çevresel stres faktörleri ile tetiklenen biyolojik süreçler arasındaki kompleks etkileşimin hastalığın etiyolojisini oluşturduğu düşünülmektedir (Palazidou, 2012).

Depresyonda genetik yatkınlık önemli bir etiyolojik risk faktörü olarak karşımıza çıkmaktadır. Majör depresyon hastalarının birinci dereceden akrabalarında depresyon gelişme riskinin 3 kat arttığı bilinmektedir. Aileler ve ikiz çalışmalarından elde edilen bulgularla hastalığın kalıtım yoluyla aktarılma derecesinin %35 civarında olduğu tahmin edilmektedir (Geschwind ve Flint, 2015). Günümüzde depresyona neden olan özel bir gen veya gen grubunun varlığına ilişkin genel kabul görmüş bir bilimsel kanıt bulunmamakla birlikte; genetik çerçevede ele alındığında depresyonun zayıf etkili birçok gen ile ilişkili poligenik bir hastalık olduğu ifade edilmektedir (Hyman, 2014; Otte ve ark., 2016).

Genetik yatkınlık dışında çevresel stres maruziyeti; depresyonun gelişmesinde rol oynayan temel risk faktörlerinin başında gelmektedir (Kessler, 1997). Partner kaybı (ölümü, boşanma, ayrılık gibi), aile ferdi veya yakın bir kişinin ölümü, hastalık, finansal ve sosyal problemler, işsizlik gibi deneyimlenen olumsuz olaylar bireylerde depresyon gelişme riskini arttırmaktadır. Bu gibi stres yaratan olumsuz olayların yatkınlığı olan bireylerde genellikle 1 yıl gibi bir süre içinde depresyon gelişmesine neden olabildiği rapor edilmiştir (Kessler, 1997; Otte ve ark., 2016). Bunun yanında

özellikle son yıllarda elde edilen kanıtlar çocukluk döneminde yaşanan şiddet, cinsel istismar ve benzeri erken dönem travmalarının yetişkinlik döneminde depresyon gelişme riskini önemli ölçüde artırdığını göstermiştir (Hovens ve ark., 2012). Bu riskin travmaya maruz kalmamış bireylere göre 2 kat fazla olduğu ve semptomların şiddeti, hastalığın seyri ile tedaviye alınan yanıtın daha düşük olmasıyla da ilişkili olabileceği gösterilmiştir (Heim ve Binder, 2012). Eğitim düzeyi ve sosyoekonomik durumun da depresyona yatkınlığı belirleyen çevresel etmenler arasında yer aldığı ifade edilmektedir (Otte ve ark., 2016).

4.1.5. Prognozu

Majör depresyonun prognozu; olgular arasında büyük değişkenlik gösterebilen kronik seyri ve remisyon düzeyi bakımından pleomorfik özelliğe sahiptir (Otte ve ark., 2016). Çocukluk çağı travmaları, eşlik eden diğer psikiyatrik hastalıkların varlığı ve semptomların şiddeti hastalarda prognozu olumsuz etkilemektedir (Kessler, 1997). Depresif epizodun süresi 13 ile 30 hafta arasında değişebilmektedir. Tedavi ile alan hastaların yaklaşık %70-90 kadarında 1 yıl içerisinde remisyonun sağlanabildiği, ayaktan tedavi gören hastaların ise yaklaşık 25'inin 6 ay içinde iyileşebildiği; bu hastaların yaklaşık yarısında ise tedavi başlangıcından 2 yıl sonra depresyonun kronik seyrinin sürdürmeye devam ettiği gösterilmiştir (Spijker ve ark., 2002; Wells ve ark., 1992). Hastalarda birtakım rezidüel semptomlar ve fonksiyon kayıpları da devam edebilmektedir (Ormel ve ark., 2004). Remisyona giren hastalarda yaşam boyu en az bir kez hastalığın nüks ettiği bilinmekte ve nüks oranının yaklaşık %80 olduğu rapor edilmektedir (Vos ve ark., 2004). Hastalarda yaşın artmasıyla prognozun kötüleştiği de bilinmektedir.

Depresyonun diyabet, kalp hastalığı, inme, hipertansiyon, obezite, kanser gibi hastalıkların ortaya çıkma riskini artırdığı gösterilmiştir. Bu durumun depresyonun beraberinde getirdiği hastalık yükünün daha da artmasına katkıda bulunduğu düşünülmektedir (Otte ve ark., 2016). Kontrol altına alınamayan depresyonun beraberinde getirdiği intihar riski, hastalığın prognozunu olumsuz etkileyerek yaşamı tehdit eden ciddi boyutunu ortaya koymaktadır. Her yıl dünya genelinde görülen

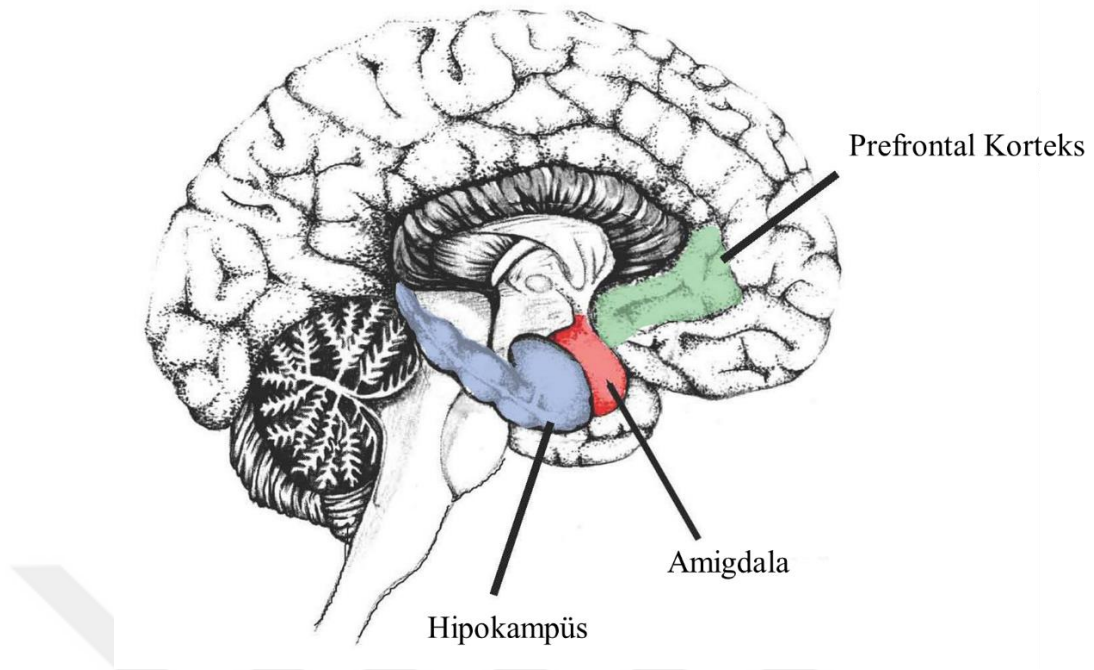
800 000 civarındaki intihar vakasının yaklaşık yarısı depresif epizod geçirmekte olan bireylerden oluşmaktadır (http://www.who.int/mental_health/suicide-prevention/en/ Son Erişim Tarihi: 22 Ağustos 2017). Nitekim intihar kaynaklı ölüm oranının majör depresyon tanılı hastalarda genel topluma göre 20 kat fazla olduğu düşünülmektedir (Chesney ve ark., 2014). Majör depresyonunun toplumda mortalite riskini %60-80 oranında arttırdığı bilinmekte ve genel mortaliteye katkısının %10 düzeyinde olduğu ifade edilmektedir (Cuijpers ve ark., 2014).

4.1.6. Nöroanatomi

Günümüzde modern tıpla birlikte gelişen nörogörüntüleme yöntemleri depresyonun nöroanatomik boyutunun aydınlatılmasına olanak tanımıştır. Hipokampus, prefrontal korteks ve amigdalanın depresyonda en fazla etkilenen beyin bölgelerinin başında geldiği bilinmektedir (Şekil 2) (Otte ve ark., 2016; Palazidou, 2012).

Yapısal manyetik rezonans görüntüleme çalışmaları ile elde edilen bulgular depresyon hastalarında prefrontal korteks (orbitofrontal, ventromedial, dorsolateral ve anterior singulat korteks), hipokampus, putamen ve kaudat bölgelerinde doku hacminin anlamlı ölçüde azaldığını göstermektedir (Otte ve ark., 2016). 193 çalışma ve 15 892 birey üzerinde gerçekleştirilen geniş kapsamlı bir meta-analiz çalışmasına göre şizofreni, bipolar bozukluk, obsesif-kompulsif bozukluk, anksiyete ve bağımlılık gibi diğer psikiyatrik bozukluklarla karşılaştırıldığında özellikle hipokampusun depresyona özgü etkilenen bir beyin bölgesi olabileceği öne sürülmüştür (Goodkind ve ark., 2015). Morfolojik değişimlerin yanı sıra; depresyonla ilişkili nöronal yolların tespiti, aktivasyon ve bağlantı kapasiteleri de fonksiyonel görüntüleme çalışmaları ile incelenebilmektedir. Bu kapsamda elde edilen en tutarlı bulgular amigdala ile ilişkili bulunmuştur (Palazidou, 2012).

Depresyonda amigdala hacminde tutarlı bir değişim gösterilmemesine karşın fonksiyonel görüntüleme çalışmaları anormal amigdala aktivasyonu ve bağlantılarına işaret etmiştir (Hamilton ve ark., 2012).



Şekil 2. Depresyonda en fazla etkilendiği kabul edilen beyin bölgeleri. (<https://psychpedia.blogspot.com.tr/2015/07/patients-with-recurrent-depression-have.html>, Erişim tarihi: 28 Ekim 2017)

Amigdala'ya ek olarak dorsal anterior singulat ve anterior insula bölgelerinde de depresyonda aktivite artışı izlenmiştir. Bu bölgelerdeki nöronal yolların aşırı aktivasyonunun kişide kendine dönük negatif düşünce eğiliminin artmasıyla ilişkili olduğu ve destekler nitelikte ventral striatal ödül yolağı ile ilişkili bölgelerde ise aktivitede azalma olduğu gösterilmiştir (Otte ve ark., 2016).

Depresyonda çeşitli bilişsel fonksiyonların yürütülmesinde görev alan frontoparyetal kognitif kontrol ağındaki bağlantılar zayıflamıştır ve bu durum özellikle dorsolateral prefrontal korteks hipoaktivasyonu açısından belirgindir. Ayrıca frontoparyetal hipoaktivasyonun özellikle negatif uyaranlar varlığında geliştirilen bilişsel algı bozukluğu ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. Diğer bir ifadeyle negatif olayları doğru algılama ve yorumlama yeteneği frontoparyetal hipoaktivasyonun gözlendiği bireylerde bozulmuştur (Otte ve ark., 2016).

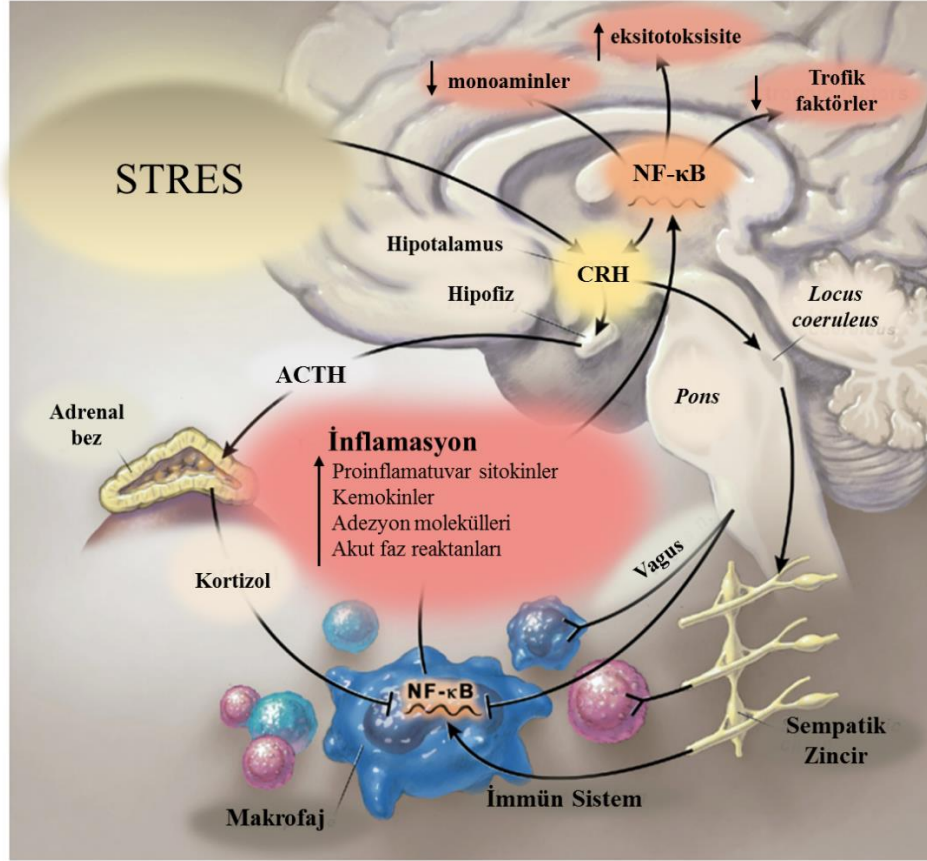
4.1.7. Nörobiyolojisi

Depresyon nörobiyolojisine ilişkin kabul edilen en eski hipotez ‘monoamin eksikliği’ hipotezidir. Depresyonun monoamin yapısındaki nörotransmitterlerin (serotonin, noradrenalin ve dopamin) eksikliğine bağlı olabileceğine ilişkin ilk görüşler; monoamin depleksiyonu yapan antihipertansif etkili rezerpinin depresyon tablosuna yol açmasından hareketle ortaya çıkmıştır (Otte ve ark., 2016; Schildkraut, 1965). 1950’li yıllarda antidepresan ilaçların keşfi ve izleyen yıllarda bu ilaçların etki mekanizmalarının aydınlatılması ile depresyonda monoamin hipotezi gündeme gelmiş ve post-mortem çalışmalarda depresyon hastalarının beyin dokularında serotonin düzeylerinin azaldığının gösterilmesi ile hipotez giderek güçlenmiştir (Sahin ve ark., 2016b). Buna göre beyinde monoamin yapıdaki nörotransmitter düzeylerindeki azalmanın depresyon tablosuna yol açabileceği, dolayısıyla ilgili nörotransmitter düzeylerinin yükseltilmesine yönelik tedavi yaklaşımlarının antidepresan etki meydana getirebileceği fikri ortaya atılmıştır (Millan ve ark., 2015).

Monoamin hipotezinin ortaya konulmasından yarım asrı aşkın süre sonra, bugün geldiğimiz noktada depresyon tedavisi halen çoğunlukla monoaminergik aşırımı kuvvetlendirerek etkisini gösteren mevcut antidepresan ilaçlarla sağlanmaktadır (Millan ve ark., 2015). Ancak çoğu olguda mevcut tedavilere yeterli ölçüde yanıt alınamaması; monoamin hipotezinin depresyon patofizyolojisini açıklamada tek başına yeterli olmadığı ortak görüşünü beraberinde getirmiştir (Block ve Nemeroff, 2014).

Son yıllarda yapılan çalışmaların katkılarıyla depresyon nörobiyolojisi günümüzde giderek daha iyi anlaşılmasına karşın; hastalığı tümüyle açıklayabilen bir mekanizma henüz keşfedilememiştir (Otte ve ark., 2016). Bu doğrultuda elde edilen bilgiler depresyon patofizyolojisinde hipotalamo-pitüiter-adrenal (HPA) eksen hiperaktivitesi ile karakterize bozukluklar, artmış inflamasyon yanıtları, glutamat eksitotoksitesisi ve değişen nöroplastisite mekanizmalarının rol oynadığını göstermektedir (Şekil 3). Bahsi geçen mekanizmaların birbiriyle yoğun etkileşimi sonucu; nörotrofik faktör düzeylerinin azalması, değişen nörotransmitter metabolizması (monoamin eksikliği gibi), nitrozatif ve oksidatif hasar gibi depresyona

eşlik eden önemli patolojik süreçlerin tetiklendiği ve sonuç olarak davranış/duygudurum belirtilerinin ortaya çıktığı düşünülmektedir (Cai ve ark., 2015; Kaster ve ark., 2016; Otte ve ark., 2016; Palazidou, 2012).



Şekil 3. Depresyon nörobiyolojisinde rol oynayan temel mekanizmalar (Miller ve ark., 2009).

Depresyona artmış HPA eksen aktivitesi ve yüksek kortizol düzeylerinin eşlik ettiği bilinmektedir (Horowitz ve Zunszain, 2015; Stetler ve Miller, 2011; Zunszain ve ark., 2011). Bunun yanında HPA eksen hiperaktivitesi hastalığın semptom şiddeti ve kötü prognozu ile yakından ilişki göstermektedir (Otte ve ark., 2016). Artmış HPA eksen hiperaktivitesinin, erken dönemde geçirilen travmaların ilerleyen dönemde ortaya çıkan geç etkilerinden sorumlu önemli bir mekanizma olduğu düşünülmektedir. Çocukluk döneminde cinsel veya şiddet kaynaklı istismara uğramış bireylerde stres maruziyeti veya uygulanan endokrin testlere yanıt olarak HPA eksen aktivitesindeki artışın aşırı düzeyde olduğu gösterilmiştir. Bu tabloya azalmış reseptör fonksiyonları

ile karakterize glukokortikoid direnci eşlik etmekte ve bu da kortizolün immün yanıt üzerindeki baskılayıcı etkisini azaltarak, artmış inflamatuvar yanıtları beraberinde getirmektedir (Otte ve ark., 2016).

Depresyon nörobiyolojisine katkıda bulunan bir diğer önemli mekanizma da nörotrofik faktör düzeylerinin azalması ve nöroplastisite süreçlerinin olumsuz etkilenmesi ile ilişkilidir (Palazidou, 2012). Beyinde nöronal bağlantıların oluşturulması ve plastisite geliştirilmesi nörotrofik faktörler aracılığıyla sağlanmaktadır (Castrén ve ark., 2007). Nöroplastisite üzerindeki etkileri en iyi bilinen nörotrofik faktör ailesi nörotrofinler olup; sinir büyüme faktörü, beyin-kaynaklı nörotrofik faktör (BDNF), nörotrofin 3 ve 4 bu grupta yer almaktadır. Sözü edilen nörotrofik faktörlerden özellikle BDNF düzeylerinde görülen azalma ile depresyon arasında önemli ilişki olduğu düşünülmektedir (Castrén ve ark., 2007). Depresyonda en fazla etkilenen beyin bölgelerinden hipokampus; nöronal büyüme, canlılık, olgunlaşma, dendritik dallanma ve sinaptik plasitenin sağlanmasından sorumlu BDNF açısından oldukça zengin bir limbik bölgedir (Palazidou, 2012). Psikolojik stresin hipokampal BDNF sentezini azalttığı, diğer taraftan antidepresan ilaçların hipokampus ve prefrontal kortekste azalan BDNF sentezini ve sinyal iletimini düzelttiği gösterilmiştir. Depresyon hastalarında BDNF düzeyleri normal bireylere göre anlamlı ölçüde az seyrederken ve bu azalmanın depresif semptomların şiddeti ile korelasyon gösterdiği ifade edilmektedir. Diğer taraftan antidepresan ilaç tedavisi veya elektrokonvülsif terapiler ile azalan düzeyler yerine konabilmektedir. Benzer bulgular postmortem depresyon çalışmalarında da elde edilmiştir (Palazidou, 2012). BDNF'ye ek olarak insülin büyüme faktörü, fibroblast büyüme faktörü ve vasküler endotelial büyüme faktörü gibi diğer nörotrofik faktörlerin de depresyonda rolü olabileceği bilinmektedir (Castrén ve ark., 2007).

Son yıllarda depresyon patofizyolosinde giderek önem kazanan bir diğer yaklaşım da glutamatejik NMDA reseptör hiperaktivasyonu ve glutamat eksitotoksisite reaksiyonları ile ilişkili 'glutamat hipotezi'dir (Dantzer ve Walker, 2014; Mathews ve ark., 2012). Depresyonda HPA eksen hiperaktivitesi ve inflamatuvar yanıtlar ile tetiklenen nöroinflamasyonun bir sonucu olarak glutamat ve beraberinde sitotoksik NMDA reseptör ligandlarının sinaptik ve ekstrasinaptik bölgede düzeyleri artmakta ve

bu tablo glutamat eksitotokisitesisi, nitrozatif ve oksidatif stres ile ilerleyen nörodejeneratif süreçlere yol açmaktadır (Cai ve ark., 2015; Kaster ve ark., 2016).

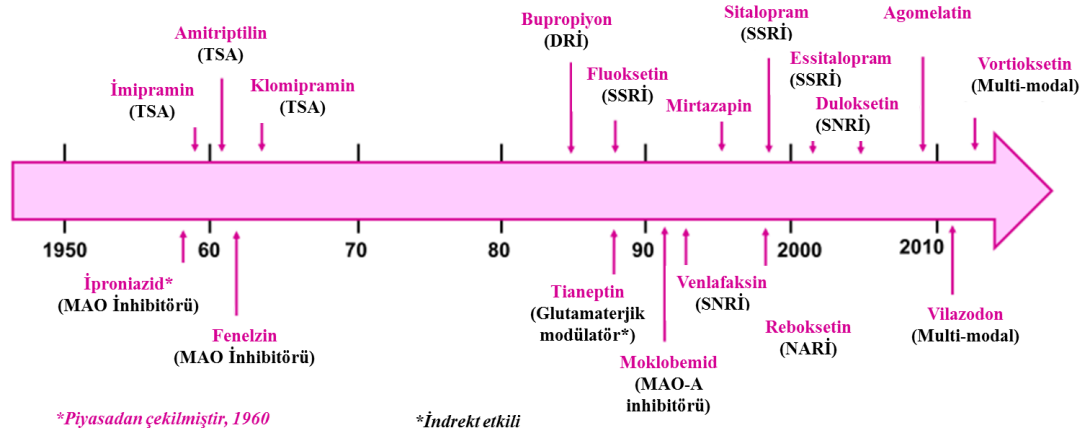
4.1.8. Tedavisi

Majör depresyonda basamak tedavi yaklaşımı uygulanmaktadır. Birinci basamakta psikoterapi ve farmakoterapinin sırasıyla tek başlarına veya kombine olarak uygulanması önerilmektedir. Hafif olgularda tek başına psikoterapi ile etkili yanıt alınabilmektedir. Ancak hastanın tercihleri, geçmiş ilaç ve hastalık öyküsü dikkate alınmalıdır. Orta ve ciddi depresyon olgularında ise farmakoterapi ve psikoterapi birlikte önerilmekte ve tedavi başarısına bağlı olarak farmakolojik tedavide kombinasyonlara gidilebilmektedir. Daha ağır ve kompleks vakalarda ise elektrokonvülsif terapi tedaviye eklenmektedir (Otte ve ark., 2016).

İlk kez 1950’li yıllarda trisiklik iminodibenzil yapısındaki molekülün antidepresan etki meydana getirdiğinin keşfedilmesi; trisiklik antidepresan (TSA) ilaçların doğuşuna aracılık etmiş ve 1959 yılında imipramin ilk onay alınan antidepresan ilaç olarak tedavide kullanıma girmiştir (Kuhn, 1957). Bunu izleyen dönemde gerçekleştirilen çalışmalar ile TSA’ların noradrenalin ve serotonin geri-alınımını bloke ettiği ve depresyon hastalarının post-mortem beyin dokularında başta serotonin olmak üzere monoamin yapıdaki nörotransmitter düzeylerinin düşük olduğuna ilişkin elde edilen bulgular depresyonda azalan ‘monoamin hipotezi’ni gündeme getirmiştir (Millan ve ark., 2015). Bugün depresyon tedavisinde kullanmakta olduğumuz antidepresan ilaçların büyük çoğunluğu beyinde monoaminerjik transmisyonu çeşitli mekanizmalarla artırmaya yönelik olarak geliştirilmiş; yan etki ve farmakolojik etki profili açısından geliştirilen yeni türevlerle günümüze kadar ulaşmıştır (Şekil 4).

Her ne kadar geçmişte bu ilaçlar ile elde edilen antidepresan etkinin altında yatan temel mekanizma sinaptik aralıktaki artan monoamin düzeyleri ile ilişkilendirilmiş olsa da; bugün bu yaklaşım çeşitli kanıt ve dayanaklarla dışlanmış durumdadır (Otte ve ark., 2016). Sinaptik aralıktaki monoamin düzeylerinin bu ilaçlarla hemen yükseltilmesine karşın belirtilerdeki düzelmenin 2-4 hafta gibi görece geç ortaya

çıkması farmakolojik etki profilinin monoamin düzeyleri ile kısıtlı bir şekilde açıklanamayacağı görüşünü beraberinde getirmiştir (Block ve Nemeroff, 2014)



Şekil 4. Antidepresan ilaçların tarihsel gelişim süreci. Trisiklik antidepresanlar; TSA, monoamino oksidaz; MAO, dopamin reuptake inhibitörü; DRİ, seçici serotonin reuptake inhibitörleri; SSRİ, serotonin ve noradrenalin reuptake inhibitörleri; SNRİ, seçici noradrenalin reuptake inhibitörü; NARİ (Millan ve ark., 2015).

Yapılan çalışmalarla; geç başlayan ve haftalar sonra ortaya çıkan farmakolojik etkilerin hücre içi sinyal yollarının modülasyonu, BDNF gibi nörotrofik faktörlerin gen transkripsiyonunun artması, nöronal ve sinaptik plastisitenin aktive edilmesi gibi adaptif mekanizmalar ile ilişkili olabileceği gösterilmiştir. Dolayısıyla sinaptik aralıkta artan monoamin düzeylerinin antidepresan etkinin ortaya çıkmasında ilk aşama olduğu ve diğer adaptif süreçleri başlatıcı rol üstlendiği görüşü güçlenmiştir (Otte ve ark., 2016).

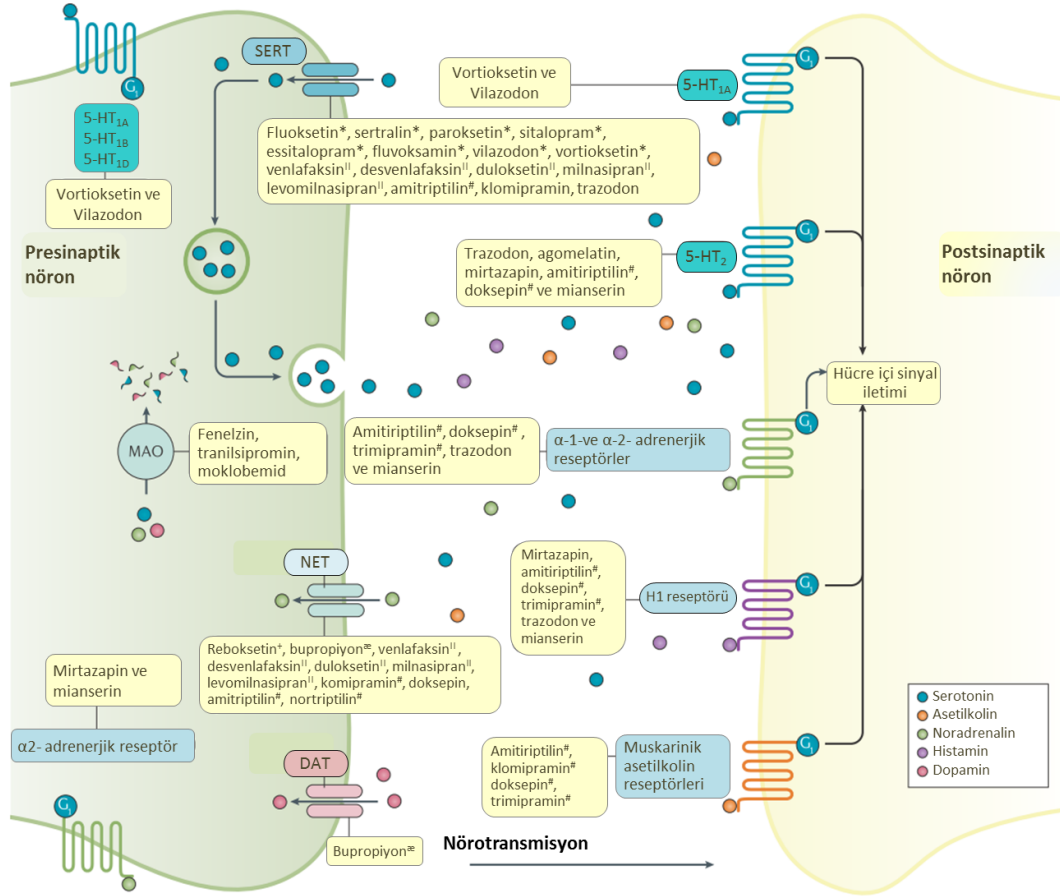
Farmakolojik etki profiline göre sınıflandırıldığında bugün tedavide kullanılan antidepresan ilaç grupları başlıca; (1) Monoamin Oksidaz (MAO) İnhibitörleri (örn. moklobemid), (2) TSA İlaçlar (örn. imipramin), (3) Seçici Serotonin Geri Alım (Reuptake) İnhibitörleri (SSRİ'ler) (örn. fluoksetin), (4) Serotonin ve Noradrenalin Reuptake İnhibitörleri (SNRİ'ler) (örn. venlafaksin), (5) Noradrenalin-Dopamin Reuptake İnhibitörleri (NDRİ) (örn. bupropiyon), (6) Seçici Noradrenalin Reuptake İnhibitörleri (NARİ) (örn. reboksetin) ile (7) Atipik İlaçlar (örn. mirtazapin, agomelatin) ve son dönemde geliştirilen (8) Multi-modal İlaçlar (örn. vortiksetin, vilazodon) olarak sayılabilir (Millan ve ark., 2015). Monoaminerjik aşırımı;

presinaptik nörona geri alınımından sorumlu özelleşmiş taşıyıcılar veya nörotransmitter metabolizmasından sorumlu enzim sistemlerinin inhibisyonu aracılığıyla arttırmaya yönelik tipik antidepresan ilaç grupları (1-6) yanında atipik türevler etkilerini çeşitli reseptörlerin modülasyonu aracılığıyla göstermektedir. Serotonerjik ve adrenerjik reseptör blokörü olarak etki gösteren mirtazapin ve melatonin reseptör agonisti agomelatin bu ilaçlara örnek olarak verilebilir. Son yıllarda ise bahsi geçen geleneksel antidepresan ilaçlardan farklı olarak, ‘multi-modal’ serotonerjik etki profiline sahip yeni türevler tedaviye girmiştir (örn. vortiksetin, vilazodon). Multi-modal etki; bir ilacın farklı mekanizmaları kullanarak oluşturduğu etki olarak tanımlanabilir. Bu ilaçların örneğin serotonin reuptake inhibisyonu yanında reseptör modülasyonu da yaparak tedavide üstünlük sağlayabileceği düşünülmüştür (Şekil 5) (Millan ve ark., 2015).

Bugün kullanmakta olduğumuz yukarıda sözü edilen ilaçlar olguların yaklaşık %30’unda yeterli terapötik etki sağlayamamaktadır. Bu ilaçlarla sadece monoterapide değil kombinasyonlarıyla yapılan tedavide de yeterli başarının sağlanamadığı rapor edilmiştir (Block ve Nemeroff, 2014; Montes ve ark., 2004). Mevcut antidepresan ilaçlara ilişkin diğer önemli sorun ise semptomlardaki iyileşmenin geç (ilaca başlandıktan en az 2-4 hafta sonra) ortaya çıkmasıdır. Bu durum; tedaviye uyuncu düşük ve intihar riski yüksek olan majör depresyon hastaları için belki de en önemli klinik sorundur (Block ve Nemeroff, 2014; Montes ve ark., 2004). Bahsi geçen sorunlardan hareketle son yıllarda depresyon tedavisinde hem daha güçlü hem de hızlı etki yapabilecek yeni tedavi stratejilerinin gündeme getirilebilmesi için hastalığın patofizyolojisinin aydınlatılmasına yönelik yapılan çalışmaların sayısı giderek artmıştır.

Geçtiğimiz yıllarda disosiyatif anestezi ve ağrı tedavisinde kullanılan non-kompetitif NMDA reseptör antagonisti ketaminin tedaviye dirençli olgularda hızlı antidepresan etkisinin keşfedilmesi bilim çevrelerinde büyük etki uyandırmıştır (Naughton ve ark., 2014). Ketaminin sub-efektif dozda tek infüzyonu ile tedaviye dirençli depresyon hastalarında 4-7 saat gibi kısa bir süre içerisinde tüm semptomlarda

düzelme sağlamış ve bu etki farklı merkezlerde tekrarlanmıştır (Berman ve ark., 2000; Zarate ve ark., 2006).



Şekil 5. Antidepresan ilaçların etki mekanizmaları. Seçici serotonin reuptake inhibitörleri (SSRİ; * ile gösterilmiştir.); serotonin taşıyıcısına (SERT) bağlanarak serotoninin presinaptik nörona geri alınımını engellerler. Seçici noradrenalin reuptake inhibitörleri (NARI; + ile gösterilmiştir.); noradrenalin taşıyıcısına (NET) bağlanarak noradrenalinin presinaptik nörona geri alınımını engellerler. Trisiklik antidepresanlar (TSA; # ile gösterilmiştir.), diğer siklik yapıdaki ilaçlar, serotonin ve noradrenalin reuptake inhibitörleri (SNRI; II ile gösterilmiştir.) serotonin ve noradrenalin taşıyıcılarını farklı oranlarda bloke ederek sinaptik aralıktaki düzeylerini artırır. TSA'lar farklı düzeylerde histaminerjik-1 (H₁), 5-HT₂, asetilkolin ve α₁-adrenerjik reseptörleri bloke ederler. Bu etkileri; TSA'ların diğer gruplardan daha fazla yan etki oluşturmalarına sebep olur. Noradrenalin-dopamin reuptake inhibitörleri (NDRI; ∞ ile gösterilmiştir.); NET ve DAT'I bloke ederler. α₂-adrenerjik reseptör blokörleri (mianserin ve mirtazapin) α₂-otoreseptörleri bloke ederek serotonin ve noradrenalin salınımlarını artırır. Görece seçici serotonin reseptör agonist/antagonistleri 5-HT₂ reseptörlerine bağlanırlar. Agomelatin melatonin-1 (M1) ve M2 reseptör agonisti olup; 5-HT_{2C} reseptörlerini bloke eder (Otte ve ark., 2016).

Günümüzde ketamin ve onun izomeri olan esketaminin intravenöz (i.v.) infüzyon ve intranazal formları tedaviye dirençli depresyon hastalarının tedavisinde kullanılmak üzere faz 3 aşamasına gelmiştir (Otte ve ark., 2016). Depresyon tedavisinde başa çıkılmaya çalışılan iki temel sorun olan tedaviye direnç ve yavaş etki göz önünde bulundurulduğunda ketaminin bu etkileri nasıl oluşturduğunun anlaşılması yeni tedavi yaklaşımlarının geliştirilebilmesi için kritik önem taşımaktadır. Tüm bu avantajlarına rağmen ketaminin potansiyel toksisite, psikotrop etkileri ve dolayısıyla suiistimal riski klinikte kullanımını kısıtlayan önemli faktörlerdir. Son yıllarda ketamin ile elde edilen bulgulardan hareketle hızlı ve potent farmakolojik etki kalıbına sahip yeni antidepresan ilaçların geliştirilmesi amacıyla glutamaterjik sistem modülatörleri üzerine yoğunlaşmıştır (Krystal ve ark., 2013; Mathews ve ark., 2012).

4.2. Depresyon ve İnflamasyon

Depresyonda inflamasyon ve ilişkili sitokin yanıtlarının rol oynayabileceğine dair ilk görüşler 1990'lı yılların başında ortaya atılmış ve o dönemde 'depresyonda makrofaj teorisi' adı altında incelenmiştir (Dantzer ve ark., 2008; Smith, 1991)

İzleyen yıllarda, gerek deneysel gerekse klinik çalışmaları kapsayan çok sayıda araştırma ile depresyon ve inflamasyon arasındaki ilişki giderek güçlenerek 'depresyonda sitokin hipotezi'ni doğurmuştur (Cai ve ark., 2015; Kaster ve ark., 2016; Miller ve Raison, 2016; Reus ve ark., 2015; Sahin ve ark., 2016b). Bugün gelinen noktada; immün sistem ve ilişkili inflamatuvar yanıtların depresyonun gelişmesinde rol oynayan önemli patofizyolojik mekanizmalardan biri olduğu kabul edilmektedir. Depresyonda görülen artmış inflamatuvar yanıtların tedaviye direncin öngörülmesinde bir gösterge olabileceği ve bundan hareketle tedavinin bireye özgü belirlenmesinde inflamatuvar medyatörlerin biyobelirteç olarak işlev görebileceğine ilişkin güçlenen görüşler söz konusudur (Ellul ve ark., 2016; Faridhosseini ve ark., 2014; Miller ve Raison, 2016; Sahin ve ark., 2016b).

Depresyonun toplumda görülme sıklığının kronik inflamatuvar hastalıklar varlığında arttığı, sağlıklı popülasyonda yaklaşık %10,3 düzeyinde olan prevalansının tip II diyabette yaklaşık %26, kardiyovasküler hastalıklarda %17-27, romatoid artrit

ise %13-20 düzeylerine yükselebildiği görülmüştür (Evans ve ark., 2005; Iwata ve ark., 2013). Bu nedenle depresyon ‘inflatuar bir hastalık’ olarak da nitelendirilmeye başlamıştır. Destekleyen bulgu olarak çeşitli kanser tiplerinde ve viral enfeksiyonlarda immün sistem aktivatörü olarak yaygınlıkla kullanılan interferon (IFN) tedavisinin doza bağımlı bir şekilde depresyon prevalansını %50'lere yükselttiği rapor edilmiş ve bu tablo ‘IFN ile indüklenen depresyon’ adı altında tıp literatürüne girmiştir. Nitekim IFN; IL-1 β , IL-6, tümör nekroz faktör (TNF)- α ve gibi proinflatuar sitokinlerin potent bir indükleyicisidir (Raison ve ark., 2006).

Organizmada inflamasyonun göstergelerinden IL-6, TNF- α , IL- β gibi çeşitli proinflatuar sitokinler, C-reaktif proteini (CRP) gibi akut faz reaktanları, kemokinler ve adezyon moleküllerini de içeren çeşitli inflamatuvar medyatörlerin serum seviyelerinin major depresyon hastalarında yüksek seyrettiği çok sayıda çalışmada rapor edilmiştir (Dowlati ve ark., 2010; Ellul ve ark., 2016; Eyre ve ark., 2016; Valkanova ve ark., 2013). Meta analiz çalışmaları; periferik kanda değerlendirilen IL-6, TNF- α , IL-1 β ve CRP düzeylerinin depresyon hastalarında inflamasyon açısından güvenilir biyobelirteçler olarak kabul edilebileceğini göstermektedir (Miller ve ark., 2009; Miller ve Raison, 2016). IL-1 β , TNF- α , ve CRP gibi inflamatuvar medyatörleri kodlayan genlerde meydana gelen polimorfizmler ile de depresyonun gelişmesi ve tedavi yanıtı arasında ilişki olabileceği rapor edilmiştir (Bufalino ve ark., 2013).

Deney hayvanları üzerinde yapılan çalışmaların sonuçları da klinik verileri destekler niteliktedir. IL-1 β ve TNF- α gibi proinflatuar sitokinlerin veya bakteriyel lipopolisakkarit (LPS) gibi sitokin yanıtını artıran uygulamaların insandaki hastalık semptomlarına benzer davranışlara yol açtığı gösterilmiş ve bu fenomen; ‘hastalık davranışı (sickness behavior)’ olarak adlandırılmıştır (Dantzer ve ark., 2008; Schiepers ve ark., 2005). Bu belirtiler; yorgunluk, bitkinlik, iştah ve uyku bozuklukları gibi somatik belirtiler başta olmak üzere disfori, anksiyete, anhedoni gibi duygudurum değişiklikleri ile karakterize olup; bu yönüyle depresif belirtiler ile büyük ölçüde benzerlik gösterdiği kabul edilmektedir (Dantzer ve ark., 2008; Iwata ve ark., 2013). İnflamasyonun bu şekilde ekzojen yolla uygulanan maddeler yanında psikolojik stres

uygulanması ile de oluşturulabilmesi; depresyon ve inflamasyon arasındaki iki yönlü ilişkinin önemini vurgulamaktadır (Kaufmann ve ark., 2017; Raison ve ark., 2006).

Antiinflamatuvar etkili çeşitli terapötik yaklaşımlar ile klinikte antidepresan etki elde edilmesi, diğer taraftan tedavide kullanılan bazı antidepresan ilaçların da inflamasyon yanıtlarını baskılamasına ilişkin bulgular; depresyonda inflamasyon hipotezinin önemini daha da ileriye taşımıştır. TNF- α antagonisti, etanersept tedavisi alan psöriazis hastaları üzerinde yapılan büyük çaplı çift-kör plasebo kontrollü bir çalışmada hastalarda plaseboya kıyasla depresif belirtilerin önemli ölçüde gerilediği ve bu etkinin hastalığın kontrol altına alınmasından bağımsız olduğu gösterilmiştir (Tyring ve ark., 2006). Bir başka çalışmada fluoksetin tedavisine yanıt vermeyen depresyon hastalarında ek olarak uygulanan non-selektif siklooksijenaz inhibitörü asetil salisilik asitin remisyon düzeyini artırdığı gösterilmiştir (Mendlewicz ve ark., 2006). Benzer şekilde bir diğer çalışmada inflamatuvar hastalığı olmayan depresif olgularda antidepresan tedaviye ek olarak başlanan siklooksijenaz-2 inhibitörü, selekoksib'in semptomlarda düzelmeye yol açtığı rapor edilmiştir (Muller ve ark., 2006). Sitokin antagonistleri ve bazı antiinflamatuvar ilaçların deney hayvanlarında depresyon-benzeri davranışları geri çevirdiğinin gösterilmesi, klinikte raporlanan bu etkileri deneysel çalışmalarla da desteklemiştir (Dantzer ve ark., 2008; Miller ve ark., 2009).

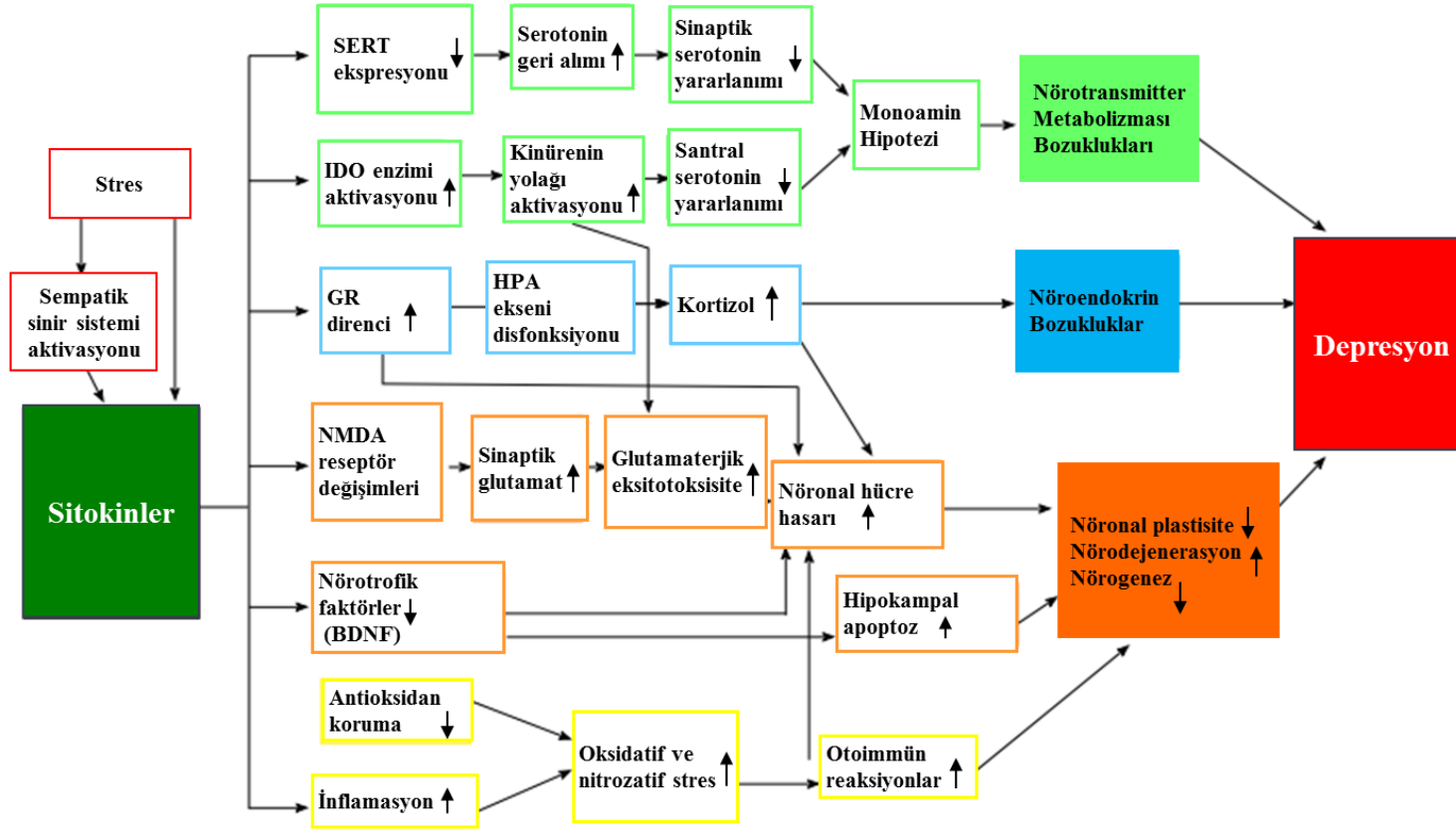
Depresyon ve inflamasyon arasındaki ilişkiye dikkat çeken söz konusu bulgulardan hareketle özellikle son yıllarda hastalığın nörobiyolojisinde inflamatuvar mekanizmaların olası rollerinin aydınlatılmasına yönelik yapılan çalışmalar giderek hız kazanmıştır. Bu doğrultuda güncel mevcut bilgiler; nöroinflamasyonun depresyona eşlik eden çeşitli mekanizmalarla etkileşen önemli bir patofizyolojik süreç ve bu yönüyle depresyon gelişiminde kritik önem taşıyan bir faktör olduğunu düşündürmektedir (Miller ve ark., 2009; Miller ve Raison, 2016; Raison ve ark., 2006; Reus ve ark., 2015; Sahin ve ark., 2016b).

Nöroimmünolojik açıdan ele alındığında beynin periferik dolaşımdaki immün hücrelerden ve inflamatuvar yanıtlardan etkilenmeyen izole bir organ olduğu düşüncesi bugün dışlanmış durumdadır (Schiepers ve ark., 2005). Geçtiğimiz yıllar

içinde yapılan çalışmalarla immün sistem ve merkezi sinir sistemi (MSS) arasında nöronal, nöroendokrin ve immün mekanizmalar aracılığıyla gerçekleşen iki yönlü bir iletişim bulunduğu gösterilmiştir (Kronfol ve Remick, 2000).

Organizmada lenfosit, makrofaj gibi immün sistem hücreleri tarafından algılanan sinyaller ile düzenlenen immün yanıtlar; bu hücreler tarafından üretilen bir grup mesajcı molekül olan sitokinler ile sağlanmaktadır (Schiepers ve ark., 2005). Sitokinler; her biri birbirinden farklı biyolojik etkiler gösterebilen geniş ve heterojen bir inflamatuvar medyatör ailesi olup; temel olarak iki kategoride incelenebilmektedir. Bunlardan ilki; inflamatuvar yanıtları direkt veya indirekt yollarla uyaran proinflamatuvar sitokin ailesidir. IL-1, IL-6, TNF- α ve IFN- γ gibi sitokinler bu grupta yer almaktadır. İkinci grup ise inflamatuvar yanıtları immün hücre aktivasyonu ve/veya sitokin yanıtlarını baskılamak yoluyla azaltan antiinflamatuvar sitokinlerden oluşmaktadır. IL-4, IL-10 ve IL-13 bu gruptaki sitokinlere örnek olarak verilebilir. Diğer taraftan pro- veya antiinflamatuvar etkinlik gösterebilen IL-8 gibi sitokinler de bulunmaktadır (Schiepers ve ark., 2005). Periferde üretilen sitokin düzeyleri akut veya kronik inflamasyon, doku hasarı, enfeksiyon gibi organizmada immün sistem aktivasyonuna yol açan bir patolojik durum varlığında yükselir. Geçmiş tarihli görüşler görece hidrofilik ve büyük molekül (~15-25 kD) özellikteki sitokinlerin normal fizyolojik şartlar altında kan-beyin bariyerini (KBB'yi) geçemediği ve MSS'ye ulaşamadığını savunmaktaydı (Miller ve Raison, 2016; Quan ve Banks, 2007).

Günümüzde sitokinlerin MSS'ye çeşitli yollarla geçebildiği ve beyinde nöroinflamasyon tablosuna yola açarak; depresyonla ilişkili birçok patofizyolojik süreci etkileyebilecekleri gösterilmiştir (Miller ve ark., 2009; Miller ve Raison, 2016; Raison ve ark., 2006; Reus ve ark., 2015). Nöroinflamasyonun nörotrofik faktör düzeylerinin azalması, bozulmuş HPA eksen aktivitesi, değişen nörotransmitter metabolizması (monoamin eksikliği gibi), glutamat eksitotoksitesisi, nitrozatif ve oksidatif hasar gibi depresyonda görülen temel bazı patofizyolojik mekanizmalar üzerindeki etkileri kısmen aydınlatılmıştır (Şekil 6).



Şekil 6. Sitokinler ve depresyon nörobiyolojisindeki rolleri. Beyin kaynaklı nörotrofik faktör; BDNF, glukokortikoid reseptörü; GR, hipotalamo-pitüiter-adrenal (aks); HPA, indolamin dioksijenaz; IDO, N-metil-D-aspartat; NMDA, serotonin taşıyıcısı; SERT (Jeon ve Kim, 2016).

4.2.1. Sitokin sinyallerinin iletimi

İnflamatuvar sinyalleri taşıyan periferik dolaşımdaki sitokinlerin beyne temel olarak 4 farklı mekanizmayla geçebildiği gösterilmiştir (Miller ve ark., 2009; Quan ve Banks, 2007; Schiepers ve ark., 2005). Bunlardan ilki; sitokinlerin KBB'nin olmadığı sirkümventriküler organlar veya zayıf olarak bulunduğu bölgelerden pasif difüzyon yoluyla beyin parankimasına geçebildiklerinin gösterilmesidir (Watkins ve ark., 1995). Benzer şekilde; travma, nörodejeneratif hastalıklar veya multipl skleroz gibi KBB yapısının bozulduğu çeşitli MSS patolojileri varlığında immün hücreler, sitokinler ve diğer inflamatuvar medyatörlerin büyük oranda pasif difüzyona uğrayarak beyindeki miktarlarının önemli ölçüde arttığı bilinmektedir (Merrill ve Murphy, 1997). Diğer taraftan TNF- α gibi sitokinlerin de KBB geçirgenliğini artırabildiği gösterilmiştir (Chandler ve ark., 1997; Schiepers ve ark., 2005).

İkinci olarak; sitokinler kendilerine özgü doyurulabilir transport sistemleri ile aktif transport yoluyla da beyne geçebilmektedirler. Örneğin IL-1 α , IL-1 β , IL-6 ve TNF- α gibi sitokinler için bu transport sistemleri tanımlanmıştır (Banks ve ark., 1995). Sitokinlerin taşıyıcı aracılı aktif transport ve KBB'nin olmadığı bölgelerden pasif difüzyonla beyne geçişleri dışında serebrovasküler endotel hücreleri veya perivasküler makrofaj hücrelerinde bulunan sitokin reseptörlerine bağlandıkları gösterilmiştir (Maier ve Watkins, 1998; Merrill ve Murphy, 1997; Schiepers ve ark., 2005; Watkins ve ark., 1995). Sitokin reseptörlerinin aktivasyonu ile MSS'de, NO, prostaglandinler ve proinflamatuvar sitokinler gibi inflamatuvar medyatörlerin salınımı tetiklenmektedir (Quan ve Banks, 2007).

Bahsi geçen bu üçüncü mekanizma sitokinlerin MSS'deki indirekt etkileri ile ilişkilendirilmektedir. Bir diğer indirekt mekanizma ise inflamatuvar sinyallerin vagus afferent sinir lifleri aracılığıyla MSS'ye iletimidir (Miller ve ark., 2009; Quan ve Banks, 2007; Watkins ve ark., 1995). Periferde immün yapıları inerve eden vagus aracılığıyla oluşan bu periferik inflamasyon sinyali hipotalamus ve beyin sapına (*nucleus tractus solitarii* vb.) iletilmektedir (Miller ve ark., 2009).

İnflamatuvar sinyallerin MSS'ye iletim yolları ile ilişkili bahsi geçen 4 farklı mekanizma; özellikle son dönemde yayımlanan raporlarda 'humoral' ve 'nöronal' iletim olmak üzere iki başlık altında toplanmaktadır (Miller ve Raison, 2016). Bu yaklaşıma göre sitokinlerin KBB'nin olmadığı bölgelerden pasif difüzyon veya taşıyıcı aracılı aktif transport ile beyne geçişi humoral olarak tanımlanırken; afferent vagus sinirinin uyarılması ile gerçekleşen iletim nöronal olarak tanımlanmıştır. Bunlara ek olarak periferdeki inflamatuvar sinyallerin MSS'ye taşınmasına yalnızca sitokinlerin değil aynı zamanda immün hücrelerin de katıldığı gösterilmiş ve bu mekanizma 'hücrel' iletim olarak adlandırılmıştır (D'Mello ve ark., 2009; Miller ve Raison, 2016). Buna göre periferde aktive olmuş monosit gibi immün hücrelerin beyin parankimasına göç edebildiği de gösterilmiştir (D'Mello ve ark., 2009).

IFN- α tedavisi alan hepatit C hastalarının beyin omurilik sıvısında (BOS) IFN- α düzeyleri yanında IL-6, kemokin ve monosit kemoatraktan protein-1 düzeylerinin de yüksek bulunmasıyla deneysel olarak gösterilen bu mekanizmalar klinik olarak da desteklenmiştir (Raison ve ark., 2009). Böylece periferde meydana gelen inflamatuvar sinyallerin sitokinler ve immün hücreler aracılığıyla beyne iletilerek nöroinflamasyonu tetikleyebileceği gösterilmiştir. Diğer taraftan psikolojik stresin sempatik sistem aktivasyonu aracılığıyla MSS inflamasyonunu direkt olarak da aktive ettiği bilinmektedir (Miller ve ark., 2009). Bunun sonucunda depresyonda görülen artmış HPA eksen aktivitesi, değişen nörotransmitter metabolizması (monoamin eksikliği gibi) glutamat eksitotoksitesisi, nörotrofik faktör düzeylerinin azalması gibi patofizyolojik mekanizmalar tetiklenmektedir (Şekil 6).

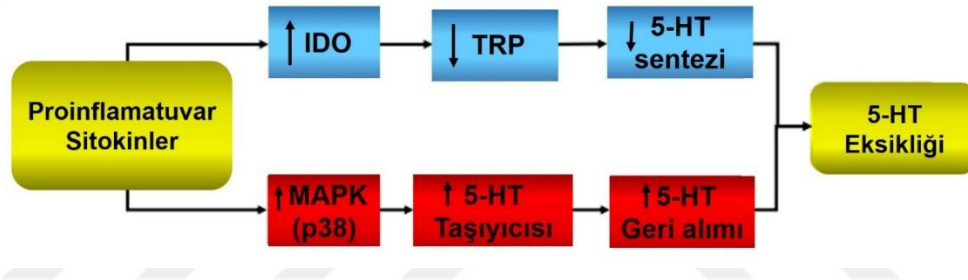
4.2.2. Sitokinler ve nörotransmitter metabolizması

Beyne iletilen inflamatuvar sitokin sinyallerinin; depresyonda duygudurumun düzenlenmesiyle ilişkili serotonin, noradrenalin, dopamin gibi monoaminler ve temel eksitator nörotransmitter olan glutamatın metabolizma, sentez, salınım ve geri alınımlarını farklı düzeylerde etkileyebildiği gösterilmiştir (Miller, 2009).

Bu kapsamda; sitokin üretimini arttıran uygulamaların monoamin nörotransmitter metabolizmasını etkilediği ve ayrıca bu görüşü destekler nitelikte serotonin ve/veya

noradrenalin reuptake inhibitörleri gibi monoamin düzeylerini artıran antidepresan ilaçların inflamatuvar depresyon tablosunu geri çevirebildiğine ilişkin güncel veriler söz konusudur (Miller ve ark., 2009; Yirmiya ve ark., 2001).

Sitokinlerin serotoninin öncü maddesi olan triptofanı kinürenine metabolize eden indolamin 2,3-dioksijenaz (IDO) enzimini, nükleer faktör kappa-B (NF- κ B), p38 mitojen ile aktive olan protein kinaz (MAPK) gibi hücre içi inflamatuvar sinyal yolları üzerinden aktive ettiği bilinmektedir (Fujigaki ve ark., 2006). Sitokinlerin triptofan metabolizmasını bu şekilde IDO enzimi üzerinden kinürenin yolağına kaydırması; bir diğer metabolizma ayağı olan triptofandan triptofan hidroksilaz ile serotonin oluşumunun ve dolayısıyla serotonin biyoyararlanımının azalmasına yol açmaktadır (Şekil 7) (Maes ve ark., 2011).

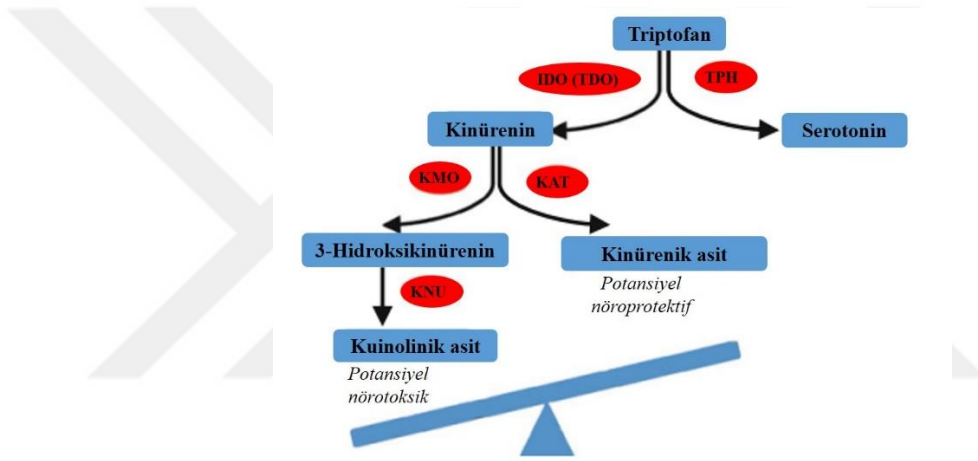


Şekil 7. Proinflamatuvar sitokinlerin serotonin biyoyararlanımı üzerine etkileri. Serotonin biyoyararlanımı sitokinler tarafından iki temel mekanizma ile azaltılmaktadır. Bunlardan ilki IDO enzimi aktivasyonu aracılı serotonin sentezinin azalması ile ilişkilidir. Diğer ise serotonin taşıyıcısı ekspresyonunun MAPK sinyal yolağı üzerinden artırılması ve sinaptik aralıkta serotonin düzeylerinin azaltılmasıdır. 5-hidroksitriptamin; 5-HT, indolamin 2,3-dioksijenaz; IDO, mitojen ile aktive olan protein kinaz; MAPK, triptofan; TRP (Miller, 2009).

Destekler nitelikte; IFN- α tedavisi alan bireylerde depresyon gelişimi kandaki triptofan düzeylerinin düşük ve kinürenin düzeylerinin yüksek olması ile yakın ilişkili bulunmuştur (Capuron ve ark., 2003). Bir başka çalışmada deney hayvanlarına dışarıdan kinürenin uygulamasının depresyon-benzeri davranışlara neden olduğu gösterilirken; IDO enziminin inhibisyonu ile deney hayvanlarında LPS ile oluşturulan depresyon-benzeri davranışların düzeldiği rapor edilmiştir (O'Connor ve ark., 2009).

Triptofandan IDO enzimi aracılığıyla oluşan kinürenin bir sonraki basamakta farklı enzim sistemleri üzerinden kinürenik asit ve nörotoksik özellikteki 3-

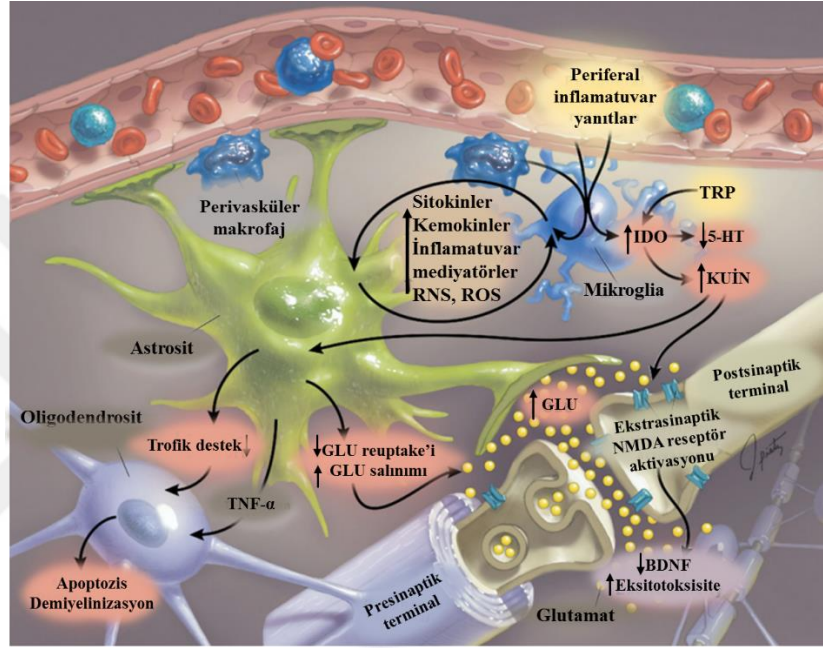
hidroksikinürenin ve kuinolinik asit metabolitlerine dönüşmektedir (Stone, 2001) (Şekil 8). MSS’de kinürenik asit astrositlerde; kuinolinik asit ise aktive olmuş mikrogliya hücrelerinde üretilmektedir (Schwarcz ve Pellicciari, 2002). Kinürenik asidin temel etkisi glutamat salınımının azaltılmasıdır. Bu noktada; glutamatın dopaminerjik nöronlar üzerindeki eksitator etkisinin azalması ve ilişkili olarak kinürenik asidin dopamin salınımını dolaylı yoldan azalttığı düşünülmektedir (Borland ve Michael, 2004; Miller ve ark., 2009; Schwarcz ve Pellicciari, 2002). Nitekim; kinürenik asidin intrastriatal uygulanması sonucu sıçan striatumunda ekstraselüler dopamin düzeylerinin önemli ölçüde azaldığı gösterilmiştir (Wu ve ark., 2007).



Şekil 8. Tryptofan metabolizması ve kinürenin yolağı. İndolamin 2,3-dioksijenaz; IDO, kinürenin aminotransferaz; KAT, kinürenin 3-monooksijenaz; KMO, kinüreninaz; KNU, triptofan 2,3-dioksijenaz; TDO, triptofan hidroksilaz; TPH; (Zunszain ve ark., 2013).

Diğer taraftan nörotoksik bir bileşik olan kuinolinik asit NMDA reseptörünün güçlü bir aktivatörü olup; gerek ekstrasinaptik bölge gerekse sinaptik aralıkta glutamaterjik transmisyonunu güçlü bir şekilde artırmaktadır. Kuinolinik asit ayrıca astrositlerden glutamat salınımını uyarırken, glutamatın astrositlere alınımını bloke etmektedir (Muller ve Schwarz, 2007; Schwarcz ve Pellicciari, 2002). Dolayısıyla inflamasyon varlığında kinürenin yolağının aktivasyonuna bağlı olarak artan kuinolinik asit düzeyleri depresyona eşlik ettiği bilinen glutamat eksitotoksitesisi ve nöronal hasar gibi süreçlerle yakından ilişkilidir (Miller ve Raison, 2016) (Şekil 9). Örneğin bir çalışmada IFN-α tedavisinin beyin glutamat düzeylerini yükselttiği ve

bunun hastalarda gözlenen depresif belirtiler ile yakından ilişkili olduğu gösterilmiştir (Haroon ve ark., 2014). Depresyon hastaları üzerinde yapılan bir başka çalışmada ise serum CRP düzeyleri yüksek hastalar düşük CRP'li hastalarla kıyaslandığında bazal gangliyonda glutamat düzeylerinin önemli ölçüde yüksek seyrettiği rapor edilmiştir. Dahası serum CRP ve glutamat düzeyi yüksek bulunan hastalarda depresif belirtilerin de görece daha şiddetli seyrettiği gösterilmiştir (Haroon ve ark., 2016).

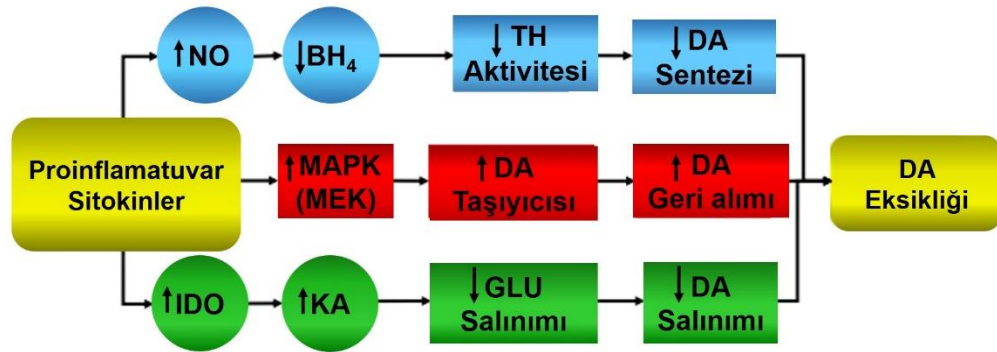


Şekil 9. Kinürenin yolağının nörotoksik ve eksitotoksik etkileri. 5-hidroksitriptamin; 5-HT, beyin-kaynaklı nörotrofik faktör; BDNF, glutamat; GLU, indolamin 2,3-dioksijenaz; IDO, kuinolinik asit; KUİN, reaktif nitrojen radikalleri; RNS, reaktif oksijen radikalleri; ROS, triptofan; TRP (Miller ve ark., 2009).

NMDA reseptörleri aracılı glutamaterjik nörotransmisyonun artması; BDNF gibi nörotrofik faktör düzeylerinin azalması sonucunu da beraberinde getirmektedir (Hardingham ve ark., 2002). Antidepresan etkinin ortaya çıkmasında nörojenezi desteklemesi bakımından kritik öneme sahip olan BDNF düzeylerinin stres ile artan IL-1 β gibi proinflamatuvar sitokinler ve ilişkili inflamatuvar yolların aktivasyonu ile azaldığı gösterilmiştir (Goshen ve ark., 2008; Koo ve ark., 2010).

Sitokinler monoamin yapıdaki nörotransmitter düzeylerini, sentez reaksiyonunda görev alan tetrahidrobiopterin (BH₄) kofaktörünün tüketimine bağlı olarak da

azaltabilmektedir (Miller ve ark., 2009; Miller ve Raison, 2016). MSS'ye ulaşan sitokinler; mikroglia hücrelerini aktive ederek NO başta olmak üzere çeşitli reaktif oksijen ve nitrojen türevlerinin salınmalarına neden olmaktadır. NO sentezinin gerçekleşebilmesi için BH₄ maddesinin kofaktör olarak reaksiyona katılması gereklidir. Dolayısıyla sitokin aracılı NO üretimi; MSS'de BH₄'nin büyük oranda tüketilmesine yol açmaktadır (Neurauter ve ark., 2008). Bu durumun; monoamin yapıdaki nörotransmitterlerin sentezinde de kofaktör olarak görev alan BH₄ biyoyararlanımı ve nörotransmitter sentezinin azalması sonuçlarını beraberinde getirdiği düşünülmektedir (Miller ve ark., 2009; Miller ve Raison, 2016). Depresyonda bu şekilde etkilendiği düşünülen nörotransmitterlerden biri de dopamindir (Şekil 10).



Şekil 10. Proinflamatuar sitokinlerin dopamin biyoyararlanımı üzerine etkileri. Proinflamatuar sitokinler dopamin biyoyararlanımını BH₄ kofaktör düzeylerinin azaltılması, taşıyıcı ekspresyonunun artırılması ve IDO yolağının aktivasyonu aracılığıyla sentez, geri alım ve salınım mekanizmaları üzerinden azaltabilmektedir. Tetrahidrobiopterin; BH₄, dopamin; DA, indolamin 2,3-dioksijenaz; IDO, glutamat; GLU, mitojen ile aktive olan protein kinaz; MAPK, nitrik oksit; NO, tirozin hidroksilaz; TH (Miller, 2009).

Dopamin sentezinde hız kısıtlayıcı basamak olan L-tirozinden tirozin hidroksilaz enzimi ile L-3,4-dihroksifenilalanin (L-DOPA) oluşumu BH₄'e bağımlı olarak gerçekleşmektedir. Deney hayvanlarına periferik yoldan IFN- α uygulamasının MSS'de BH₄ ve dopamin düzeylerinde azalmaya neden olduğu gösterilmiştir (Kitagami ve ark., 2003). Bir başka çalışmada; IFN- α tedavisi alan hastalarda BH₄ aktivitesinin bir göstergesi olan plazma fenilalanin/tirozin oranının BOS dopamin düzeyleri ve depresyon belirtileri ile korelasyon gösterdiği rapor edilmiştir (Felger ve ark., 2013).

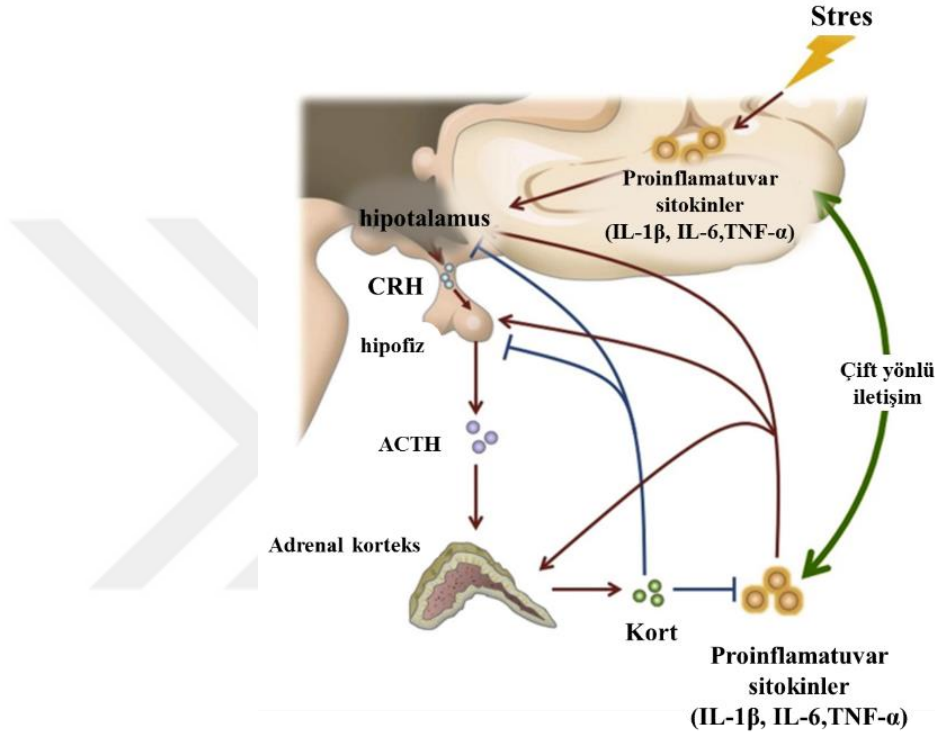
Sitokinlerin sinaptik aralıktaki monoamin nörotransmitter düzeylerini geri alım mekanizması üzerinden de azalttığı düşünülmektedir (Miller, 2009). Membran üzerinde bulunan serotonin, dopamin ve noradrenaline özgü geri alım pompalarının sitokinler ve inflamatuvar sinyallerin varlığında aktive olduğu gösterilmiştir (Zhu ve ark., 2006). Söz konusu etkide apoptozis, hücre proliferasyonu ve farklılaşması ya da inflamatuvar medyatörlerin gen ekspresyonlarının düzenlenmesi gibi etkilerden sorumlu MAPK, ekstraselüler sinyal ile regüle olan kinazlar 1,2 gibi sinyal yollarının aktivasyonunun rol oynadığı düşünülmektedir (Miller ve ark., 2009; Moron ve ark., 2003; Zhu ve ark., 2010). Örneğin IL-1 ve TNF- α 'nın sıçan beyinde p38 MAPK yolağının aktivasyonuna yol açarak sinaptozomlara serotonin geri alınımını artırdığı gösterilmiştir (Zhu ve ark., 2006). Bir başka çalışmada erken dönemde maternal ihmale maruz kalan maymunlarda mononükleer hücrelerde p38 MAPK aktivasyonu tespit edilmiş ve bu aktivasyona serotonin metaboliti 5-hidroksiindolasetik asidin BOS düzeylerinde azalmanın eşlik ettiği gösterilmiştir (Sanchez ve ark., 2007).

4.2.3. Sitokinler ve nöroendokrin fonksiyonlar

Depresyon gelişiminde önemli rol oynadığı düşünülen mekanizmalardan biri de nöroendokrin sistemde artmış HPA eksen aktivitesidir (Pariante, 2009). Büyük kapsamlı meta analiz çalışmaları sağlıklı bireylere oranla depresyon hastalarının yaklaşık %50'sinde kortizol düzeylerinin yüksek seyrettiğini göstermiştir. Bu oran şiddetli depresyon olgularında yaklaşık %80 düzeylerine ulaşmaktadır (Horowitz ve Zunszain, 2015). Bunun yanında depresyon hastalarında HPA eksen aktivitesinin negatif geribildirim ile düzenlenmesinde sinyal iletiminden sorumlu glukokortikoid reseptör (GR) fonksiyonlarının bozulduğu ve bunun depresyona eşlik eden glukokortikoid direncini beraberinde getirdiği gösterilmiştir (Pariante ve Miller, 2001). Yapılan çalışmalarla kronik stres veya depresyonda artan proinflamatuvar sitokinlerin çeşitli mekanizmalarla HPA eksenini aktive ettiği gösterilmiştir (Şekil 11).

Sitokinler hipotalamus ve hipofizden sırasıyla kortikotropin salgılatıcı hormon (CRH) ve adrenokortikotropik hormon (ACTH) salgısını ve adrenal bezden kortizol

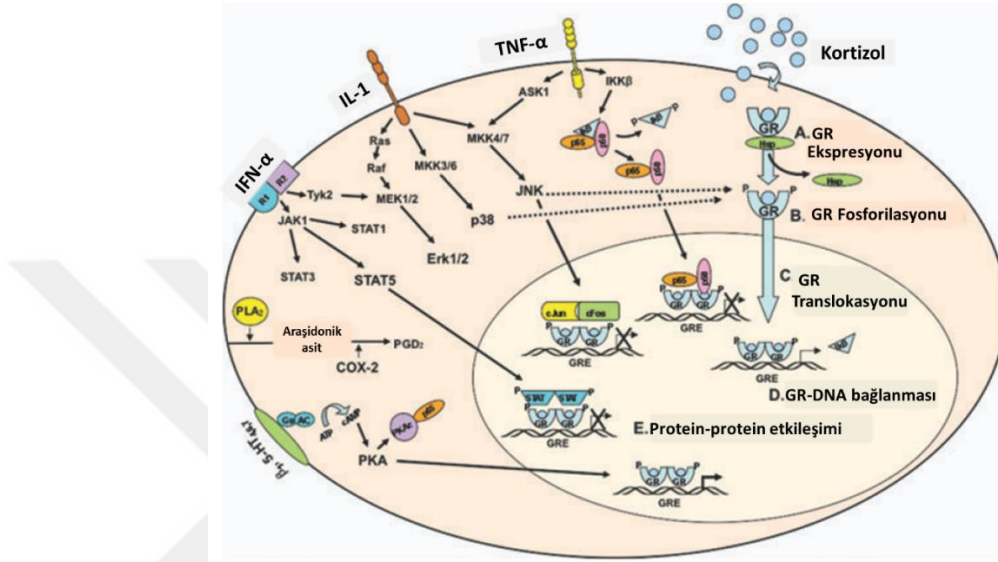
üretimini arttırmaktadır. Diğer taraftan sitokinlerin GR ekspresyonu ve fonksiyonlarını azaltarak HPA eksen aktivitesinin negatif geribildirimini bozduğu gösterilmiştir. Sitokinlerin GR fonksiyonları üzerindeki olumsuz etkilerinin; NF- κ B, p38 MAPK, sinyal transdüktörü ve transkripsiyon 5 faktör aktivatörü (STAT5) gibi hücre içi inflamatuvar sinyal yollarının aktive edilmesiyle ilişkili olduğu kabul edilmektedir (Pace ve Miller, 2009).



Şekil 11. Stres, proinflamatuvar sitokinler ve HPA eksen aktivasyonu (Iwata ve ark., 2013).

Sitokinlerin bahsi geçen sinyal yollarını aktive etmesi sonucu; sitoplazmadan nükleus içine GR translokasyonunun bozulması, protein-protein etkileşimleri ile GR-DNA bağlanmasının inhibisyonu gibi çeşitli mekanizmaları bozarak glukokortikoid direnci oluşturduğu düşünülmektedir (Horowitz ve Zunszain, 2015; Miller ve ark., 2009; Pace ve Miller, 2009) (Şekil 12). Sitokinler ayrıca GR'nin aktif formu olan GR(α) ekspresyon düzeyini azaltıp inaktif reseptör formu olan GR(β) ekspresyonunu artırmaktadır (Raison ve ark., 2006). Organizmada glukokortikoid direnci meydana gelmesi durumunda ise, immün sistem hücrelerinde bulunan GR'lerinin aktivasyonu sonucu oluşması beklenen immünoşüpresan etkiler engellenmektedir. Dolayısıyla

dolaşımdaki yüksek kortizol düzeylerine karşı intraselüler glukokortikoid sinyal iletimi önemli ölçüde azalmış olarak gözlenir. Bu da organizmada glukokortikoidlerin immün yanıtlar üzerindeki kontrolünün azalmasına ve sitokinler aracılığıyla oluşan inflamatuvar yanıtların daha da şiddetlenmesine yol açmaktadır (Horowitz ve Zunszain, 2015).



Şekil 12. Sitokinler ve GR fonksiyonları. Glukokortikoid reseptörü; GR (Pace ve Miller, 2009).

Sonuç olarak HPA ekseninin sitokinler tarafından aktive edilmesi sonucu glukokortikoid düzeylerinde artma, nörotransmitter metabolizmasında bozulma, eksitotoksikite, piramidal nöronlarında atrofi, nörogenez/nörotrofik faktörlerde azalma gibi depresyona eşlik eden patolojik süreçler etkilenmektedir (Horowitz ve Zunszain, 2015; Iwata ve ark., 2013; Miller ve ark., 2009).

4.2.4. Sitokinler ve nöronal plastisite

MSS'ye ulaşan IL-1 β , IL-6, TNF- α gibi inflamatuvar sitokinlerin nöronal plastisite ve nörogenez üzerinde iki yönlü etki oluşturdıkları söylenebilir (Borsini ve ark., 2015). Sitokinler; normal fizyolojik koşullarda nöronlara trofik desteğin sağlanması ve dolayısıyla nörogenezin desteklenmesinde görev alırken; uzun süre veya artmış inflamasyon varlığında buna zıt yönlü etkiler oluşturabilmektedirler. Bu kapsamda depresyonda görülen nörotrofik faktör düzeylerinin azalması, oksidatif stres

ve apoptozun tetiklenmesi, glutamaterjik aktivasyonun artması, glial ve nöronal hücreler arasındaki ilişkinin bozulması gibi patofizyolojik değişimlerde sitokinlerin önemli roller üstlendiği düşünülmektedir (Miller ve ark., 2009).

Gerek immün sataşma gerekse akut/kronik strese yanıt olarak periferde artan sitokinler aracılı immün aktivasyonun davranış ve bilişsel fonksiyonlarla ilişkili beyin bölgelerinde nörotrofik desteği ve nörojenezi azalttığı gösterilmiştir (Koo ve Duman, 2008). Örneğin; deney hayvanlarında periferik yoldan LPS uygulaması ile oluşan kognitif bozukluklara hipokampüste IL-1 ve TNF- α düzeylerinde azalma ve BDNF ve tirozin kinaz B reseptörü düzeylerinde artışın eşlik ettiği gösterilmiştir (Wu ve ark., 2007). IL-1 reseptör antagonisti uygulanması veya reseptör knock-out yaklaşımlar ile IL-1 yanıtlarının azaltıldığı çalışmalarda strese bağlı ortaya çıkan nöroenez ve davranış bozukluklarının geri çevrildiği gösterilmiştir (Barrientos ve ark., 2003; Ben Menachem-Zidon ve ark., 2008). Ayrıca sitokinler aracılı artan ekstrasinaptik glutamaterjik NMDA reseptör aktivasyonunun da BDNF gibi nörotrofik faktör desteğinin azalmasına yol açtığı bilinmektedir (Miller ve ark., 2009).

4.2.5. Sitokinler, mikroglia aktivasyonu ve nöroinflamasyon

Depresyona eşlik eden nöroinflamasyon ve buna bağlı gelişen patofizyolojik süreçlerde mikroglia aktivasyonu kritik roller üstlenmektedir. MSS hücrelerinin yaklaşık %10-15'i mikroglia hücrelerinden oluşmaktadır (Kaufmann ve ark., 2017). Miyeloid kökenli mikroglia hücreleri, fonksiyon ve yapısal benzerlikleri bakımından beynin makrofaj hücreleri olarak kabul edilmektedir (Kato ve Kanba, 2013). Normal şartlar altında inaktif halde bulunan mikroglia hücreleri; nöronlara trofik desteğin sağlanması, sinaptogenez gibi fizyolojik süreçlere katkıda bulunarak MSS homeostazının sürdürülmesinde görev almaktadırlar. Ancak MSS hasarı, stres veya beyne ulaşan sitokin sinyalleri gibi tehlike uyaranları varlığında istirahat halindeki mikroglia hücreleri M1 veya M2 aktif fenotiplerine dönüşerek MSS'de doğal ve adaptif immün yanıtların oluşturulmasından sorumludur (Kato ve Kanba, 2013; Nakagawa ve Chiba, 2014). M1 mikroglia hücreleri fagositik aktivite gösterebilen, proinflamatuvar sitokinler, kemokinler, NO ve reaktif oksijen radikalleri gibi çeşitli inflamatuvar medyatörlerin üretimi ve salınımından sorumlu bir mikroglia fenotipi

olarak inflamatuvar yanıtların şiddetlenmesiyle ilişkilidir. M2 mikroglia hücreleri ise salgıladıkları antiinflamatuvar sitokinler aracılığıyla M1 mikroglia hücrelerinin aktivasyonunu baskılanması, dolayısıyla inflamasyon yanıtlarının azaltılmasında rol oynamaktadır (Nakagawa ve Chiba, 2014).

MSS'yi tehdit eden bir tehlike uyararı varlığında mikroglia aktivasyonu aracılı gelişen inflamatuvar yanıtların; bahsi geçen zıt etkili fenotipler aracılığıyla adeta bir iç denetim mekanizmasının kontrolü altında tutulduğu söylenebilir. Ancak kronik stres, kontrol edilemeyen doku hasarı veya inflamasyon gibi patolojik durumlar; söz konusu dengenin M1 mikroglia polarizasyonu yönünde bozulmasına, dolayısıyla MSS'de nöroinflamasyonun şiddetlenmesine yol açmaktadır (Haapakoski ve ark., 2016; Kaufmann ve ark., 2017). Nitekim, kronik stres veya depresyon tablosunda mikroglia aktivasyonunun M1 polarizasyonu yönünde arttığı bilinmektedir. KÖHS, prenatal stres, kısıtlama stresi, sosyal yenilgi ve LPS ile oluşturulan çeşitli depresyon modellerinde, hipokampus, prefrontal korteks, nukleus akumbens, amigdala gibi farklı beyin bölgelerinde artmış mikroglia aktivasyonu rapor edilmiştir. Diğer yandan depresyona bağlı intihar olgularının postmortem beyin dokularında da reaktif mikroglia fenotipleri izlenmiştir (Kaufmann ve ark., 2017).

Stres ve/veya MSS'ye ulaşan inflamatuvar sinyaller mikroglia aktivasyonuna neden olarak; reaktif mikroglia hücrelerinden TNF- α , IL-6 ve IL-1 β gibi proinflamatuvar sitokinler başta olmak üzere, depresyon gelişiminde rolü olduğu bilinen çeşitli nörotoksik bileşikler, reaktif radikaller ve ayrıca glutamat salınımının eksitotoksik düzeylere artmasına yol açmaktadır. Diğer taraftan mikroglia aktivasyonu sonucu artan proinflamatuvar sitokinler;IDO enziminin aktivitesini artırarak triptofandan kinürenin ve nörotoksik etkili NMDA reseptör agonisti kuinolinik asit metabolitinin üretimine neden olmakta; bu yolla glutamaterjik transmisyon indirekt olarak daha da artmaktadır. Kuinolinik asit astrosit ve nöronlar arasındaki glutamat döngüsünü bozmaktadır. Bu durum; glutamat eksitotoksitesi, ilişkili reaktif oksijen ve nitrojen türevlerinin artması ve ayrıca astrositlerde proinflamatuvar sitokinlerin üretimine neden olmaktadır (Kaufmann ve ark., 2017; Sahin ve ark., 2016b).

4.3. Depresyon ve İnflamazom

Depresyon ve inflamasyon arasındaki ilişkiden hareketle özellikle son yıllarda yapılan çalışmalar dikkatleri sitokin yanıtlarını başlatan bazı özelleşmiş inflamatuvar sinyal yolları üzerinde toplamıştır. Bu kapsamda MSS’de özellikle mikroglia hücrelerinde bulunan ve doğal immün yanıtların başlatılmasında görevli, kalıp tanıma reseptör ailesinin bir üyesi olan NLRP3 inflamazomunun depresyon-sitokin hipotezine yeni bir ışık tutabileceği düşünülmektedir (Iwata ve ark., 2013; Miller ve Raison, 2016; Sahin ve Aricioglu, 2013).

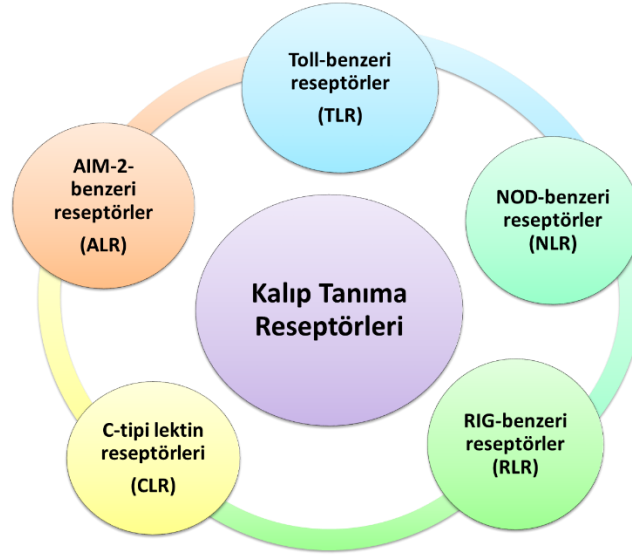
NLRP3; makrofaj, mikroglia gibi immün sistem hücrelerine ulaşan tehlike sinyallerini tanıyan bir sitozolik reseptör proteini olup; IL-1 β ile IL-18 proinflamatuvar sitokin yanıtlarının başlatılmasında görev almaktadır. Reseptör aktive olduğunda hücre içinde multiprotein kompleks bir yapıya dönüşerek ‘inflamazom’ adını alır. Bu kompleks yapı; kaspaz-1 aktivasyonuna yol açarak pro-IL-1 β ve pro-IL-18 öncü sitokinlerinden aktif IL-1 β ve IL-18 üretimi ve salınımına neden olmaktadır (Fleshner ve ark., 2017; Iwata ve ark., 2013; Kaufmann ve ark., 2017; Miller ve Raison, 2016). Günümüzde sınırlı sayıdaki çalışma ile NLRP3 inflamazom yolu depresyonla ilişkisi yönünden ele alınmaya başlanmış durumdadır (Fleshner ve ark., 2017; Kaufmann ve ark., 2017). Her ne kadar çalışmalarda depresyonla ilişkisi yönünden NLRP3 inflamazomu üzerinde duruluyor olsa da; MSS’de inflamazom yapısı oluşturduğu bilinen tek reseptör proteininin mikroglial NLRP3 olmadığı, nöronal veya astroglial yerleşimli farklı inflamazom tiplerinin de bulunduğu bilinmektedir (de Rivero Vaccari ve ark., 2014). Dolayısıyla bu inflamazomların yapısı, fonksiyonları ve nöroinflamasyon süreçlerindeki olası rollerinin irdelenebilmesi için doğal immün sistem kalıp tanıma reseptörlerinin ve bu reseptörlerin immün sistem içerisindeki rollerinin anlaşılması gerekmektedir.

4.3.1. Doğal immün sistem kalıp tanıma reseptörleri

Organizmaya ulaşan çeşitli tehlike sinyallerinin doğal immün sistem tarafından tanınması çeşitli reseptör aileleri aracılığıyla gerçekleşmektedir. Doğal immün

yanıtların başlatılmasında görev alan söz konusu reseptörler; kalıp tanıma reseptörleri ('pattern recognition receptors') olarak adlandırılmaktadır (Kigerl ve ark., 2014). Adaptif immün sistem yanıtlarının oluşmasında spesifik protein veya antijenleri tanımlayarak fonksiyon gösteren reseptörlerin aksine; doğal immün sistemde kalıp tanıma reseptörleri patojen veya hasarlanma ile ilişkili genel tehlike kalıplarını algılar (Kigerl ve ark., 2014). Kalıp tanıma reseptörleri; bakteriyel peptidoglikan, LPS, muramil dipeptid veya bakteriyel RNA gibi patojen kaynaklı veya doku hasarı, hücresel stres ve hastalık durumunda oluşan endojen kaynaklı genel moleküler kalıpları algılayabilmektedir (Haapakoski ve ark., 2016; Iwata ve ark., 2013; Kigerl ve ark., 2014). Kalıp tanıma reseptörleri; her biri farklı bir reseptör ailesini tanımlayan 5 alt gruba ayrılmaktadır: (i) Toll-benzeri reseptörler (Toll-like receptors; TLR), (ii) NOD-benzeri reseptörler (NOD-like receptors; NLR), (iii) C-tipi lektin reseptörleri (CLR), (iv) Retinoik asit-indüklenebilir gen (RIG)-benzeri reseptörler (RIG-like receptors; RLR), (v) Absent in melanoma-2 (AIM-2) benzeri reseptörler (AIM-2 like receptors; ALR) (Kaufmann ve ark., 2017; Kigerl ve ark., 2014) (Şekil 13).

Kalıp tanıma reseptörlerinin bazıları hücre membranında yerleşim göstererek ekstraselüler ortama ulaşan sinyallerin tanınmasında fonksiyon gösterirken (örn. TLR'ler); bazı üyeler ise intraselüler düzeyde yerleşim göstermekte ve hücre içine ulaşan tehlike uyaranları varlığında aktive olmaktadır (örn. NLR'ler). Kalıp tanıma reseptörlerinin aktivasyonu ile patojen/hasarlanma ile ilişkili tehlikenin ortadan kaldırılması veya doku bütünlüğünün yeniden sağlanması amacıyla proinflamatuvar medyatörlerin üretimi ve salınımları gerçekleşir. Kalıp tanıma reseptörlerinin aktivasyonu organizmayı tehlike uyaranına karşı ilk aşamada koruyan bir savunma mekanizması olmasına karşın bu reseptörlerin kronik aktivasyonu inflamatuvar hastalıklar ve ilişkili patofizyolojik süreçlerin başlatılmasıyla ilişkilidir (Kigerl ve ark., 2014).



Şekil 13. Doğal immün sistem kalıp tanıma reseptör aileleri.

TLR'ler ilk kez *Drosophila*'larda tanımlanan Toll reseptörünün insandaki homologudur. *Drosophila*'larda Toll reseptörünün gelişimsel süreçte ve antifungal immünitede rol oynadığı bilinmektedir (Lemaitre ve ark., 1996; Taguchi ve ark., 1996). İnsanda TLR'lerin keşfi ve doğal immün sistemdeki rolleri ilk kez 1990'lı yıllarda gösterilmiştir (Medzhitov ve ark., 1997). Bugüne kadar farelerde 13, insanda 10 farklı TLR tipi tanımlanmıştır (Kigerl ve ark., 2014). TLR'lerin hücrelerde intraselüler endozomal kompartmanlarda (TLR-3, TLR-7, TLR-8, TLR-9) veya transmembranal yerleşim gösterdiği bilinmektedir (TLR-4 ve diğer TLR üyeleri). Transmembranal yerleşim gösteren TLR'lerin tanımlanan ilk ligandı bakteri kaynaklı LPS olup; özellikle TLR-4 aktivasyonu ile ilişkilidir. TLR'lerin aktivasyonu ile NF- κ B'nin nükleer translokasyonu gerçekleşerek TNF- α , IL-6, pro-IL-1 β gibi inflamatuvar medyatörlerin üretimi gerçekleşir. TLR'ler hücre sitozolünde yerleşim gösteren bir diğer kalıp tanıma reseptör ailesi olan NLR'ler ile koordineli bir şekilde çalışarak aktif IL-1 β ve IL-18 üretiminde rol oynamaktadır (Kigerl ve ark., 2014).

CLR'ler genel olarak mikrobiyal karbonhidrat yapıları gibi patojen ile ilişkili moleküler yapıları algırlar. Ayrıca tümör hücrelerinde glikozillenmiş protein ürünlerini de tanıdıkları gösterilmiştir. Bunlara ek olarak CLR'ler ölen hücrelerin fagositoz ile ortadan kaldırılmasında da rol oynamaktadır (Kigerl ve ark., 2014).

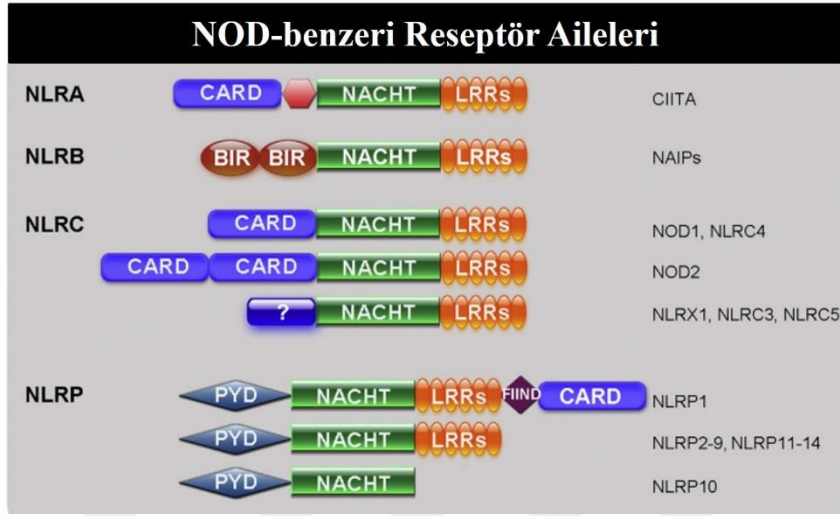
RLR'ler RNA virüslerini tanıyan sitozolik reseptörlerdir (Kato ve ark., 2011). Aktivasyonları sonucu tip 1 IFN'lerin (IFN- α ve IFN- β) üretimi gerçekleşmektedir (Szabo ve ark., 2012). RLR'ler viral RNA'ya bağlanan karboksi terminal, kaspaz toplanma yapısı (caspase recruitment domain; CARD) ve helikaz yapılarından meydana gelir (Kato ve ark., 2011). Viral enfeksiyonlar dışında endojen reaktif oksijen türevlerinin de RLR'ler tarafından algılandığı bilinmektedir (Kigerl ve ark., 2014). Yakın tarihte spinal hasar ile gelişen astrosit aktivasyonu ile ilişkili inflamatuvar yanıtlarda rol oynadığı da gösterilmiştir (de Rivero Vaccari ve ark., 2012b).

ALR'ler hücre sitoplazmasında yerleşim gösteren ve DNA virüslerini tanıyan kalıp tanıma reseptörlerindendir (Rathinam ve ark., 2010). DNA virüsleri dışında, MSS hasarı ile ilişkili hücre ölümü sonucu ortaya çıkan hücre DNA'yı da tanıdığı bilinmektedir. NLR'ler gibi pirin yapısı taşıyan ALR aktive olduğunda inflamazom formasyonu kazanmakta; bu yapıya AIM-2 inflamzomu adı verilmektedir. MSS nöronlarında yerleşim gösteren AIM-2 inflamazomunun piropitozisin tetiklenmesinde rol oynadığı gösterilmiştir (Kigerl ve ark., 2014).

4.3.2. NLR ailesi ve inflamazomlar

NLR ailesi; doğal immün sistemde çeşitli patojen ve tehlike uyaranları ile aktive olabilen; bu yönüyle gerek patojenle ilişkili gerekse steril inflamasyon yanıtlarının başlatılmasında görev alan önemli bir kalıp tanıma reseptör ailesidir (Di Virgilio, 2013). Hücre sitozolünde yerleşim gösteren NLR'ler 3 temel yapıdan meydana gelmektedir. Karboksi terminalinde lösinden zengin tekrar yapısı (LRR; leucin rich repeat domain), merkezde nükleotid bağlayan oligomerizasyon yapısı (NACHT; nucleotide-binding oligomerization domain) ve amino terminalinde NLR alt tipine göre değişkenlik gösterebilen protein-protein etkileşim kısmı taşırlar (Di Virgilio, 2013). Amino terminalindeki yapı; pirin yapısı, CARD veya *baculovirus* ile inhibe olan apoptozis protein tekrar kısmı (*baculovirus inhibition of apoptosis protein repeat*; BIR) olmak üzere NLR alt tipleri arasında farklılıklar gösterebilmektedir (Di Virgilio, 2013). Bu doğrultuda; NLR ailesinin; NLRA, NLRB, NLRC, NLRX ve NLRP olmak

üzere, her biri farklı 5 alt tipi tanımlanmıştır (Şekil 14). Günümüze kadar farelerde 34, insanda 22 NLR tipi gösterilmiştir (Lamkanfi ve Dixit, 2012; Ting ve ark., 2008).

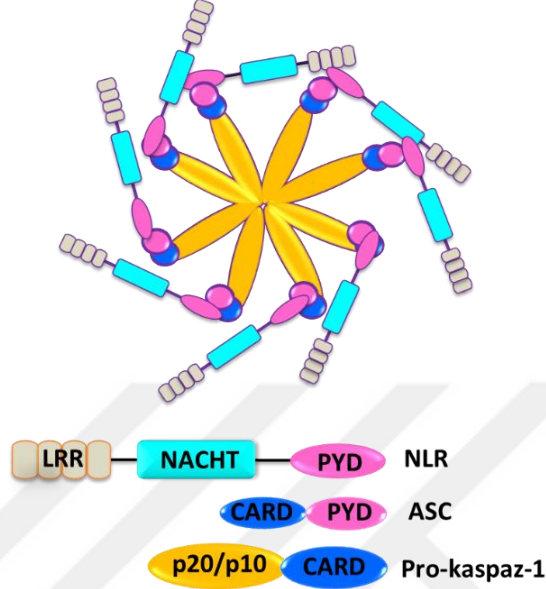


Şekil 14. NLR ailesi. Baculovirus ile inhibe olan apoptozis protein tekrar kısmı; BIR, kaspaz toplanma yapısı; CARD, ‘function to find’ domain; FIIND, lösinden zengin tekrar yapısı; LRR, nükleotid bağlayan oligomerizasyon yapısı; NACHT, NOD-benzeri reseptör; NLR, protein-protein etkileşim gösteren pirin yapısı; PYD (Kigerl ve ark., 2014).

Bahsi geçen 5 üye arasında NLRP’ler diğer adıyla pirin yapısı taşıyan NLR’ler, inflamazom yapısı oluşturabilen ve bu yönüyle fonksiyonları en iyi aydınlatılmış ve en geniş NLR ailesi olarak karşımıza çıkmaktadır. İnflamazom yapısı meydana getirdiği bilinen NLRP üyeleri; NLRP1, NLRP2, NLRP3, NLRP6 ve NLRP7’dir (Di Virgilio, 2013). Bunların yanında NLRC4’ün de inflamazom yapısı oluşturduğu bilinmektedir.

Normal koşullarda hücrede inaktif durumda bulunan NLRP’lerin moleküler yapısı; C terminalinde LRR, merkezde NACHT ve N terminalinde protein-protein etkileşimden sorumlu pirin yapısı olmak üzere 3 farklı kısımdan meydana gelmektedir (Di Virgilio, 2013). Bir tehlike uyararı varlığında NLRP’lerin aktive olması sonucu yapıya ASC ve pro-kaspaz-1’in bağlanmasıyla multiprotein kompleks bir yapı (~700 kDa) kazanırlar (Şekil 15) (Di Virgilio, 2013; Kigerl ve ark., 2014). İnflamazom olarak adlandırılan bu oligomerik yapıdaki multiprotein kompleks; kaspaz-1 aktivasyonuna yol açarak pro-inflamatuvar sitokinler olan IL-1 β ve IL-18 üretiminin ve salınımının

başlatılmasından sorumludur. İnflamazom aracılı kaspaz-1 aktivasyonu ile ayrıca piropitozis programlı hücre ölümünü aktive eden süreci başlatabilmektedir (Di Virgilio, 2013; Kigerl ve ark., 2014; Martinon ve ark., 2002).



Şekil 15. NLRP multiprotein kompleksi (NLRP inflamazomu). CARD yapısı taşıyan apoptozis speck-benzeri protein; ASC, kaspaz toplanma yapısı; CARD, lösinden zengin tekrar yapısı; LRR, nükleotid bağlayan oligomerizasyon yapısı; NACHT, NOD-benzeri reseptör; NLR, protein-protein etkileşim gösteren pirin yapısı; PYD.

4.3.3. MSS inflamazomları

İnflamazomların organizmada doğal immün sistem yanıtları üzerindeki rolleri kısmen aydınlatılmasına karşın; bunlardan ancak birkaçının MSS içerisinde varlığı tanımlanabilmiştir (Kaufmann ve ark., 2017). Günümüze kadar en iyi tanımlanmış MSS inflamazomları; NLRP1, NLRP2, NLRP3 ve AIM2 inflamazomlarıdır (Abulafia ve ark., 2009; Adamczak ve ark., 2014; de Rivero Vaccari ve ark., 2008; Halle ve ark., 2008; Minkiewicz ve ark., 2013).

4.3.3.1. NLRP1 inflamazomu

MSS içerisinde varlığı keşfedilen ilk inflamazom tipi NLRP1 inflamazomu olup; nöronlarda bulunduğu gösterilmiştir (Abulafia ve ark., 2009; de Rivero Vaccari ve ark., 2008). NLRP1'in yapısı LRR, NACHT ve pirin kısımlarına ek olarak CARD ve

FIIND taşımaktadır (Şekil 14) (Di Virgilio, 2013). NLRP1 inflamazomu; organizmada immün sistem hücresi olsun ya da olmasın çok sayıda hücrede eksprese olabilmekte ve bu hücrelerde kaspaz-1 ve kaspaz-5 aracılı IL-1 β ve IL-18 üretimi ve salınımında başlatıcı düzeyde rol almaktadır (Davis ve ark., 2011). NLRP1 inflamazomu yapısında CARD adaptörü taşıdığı için diğer NLRP üyelerinden farklı olarak ASC proteinine gerek olmaksızın pro-kaspaz-1/5'e direkt bağlanabilir (Ratsimandresy ve ark., 2013). Diğer NLRP türevlerinde olduğu gibi içerdiği LRR kısmı normal koşullarda yapıyı otoinhibisyon ile inaktif durumda tutarken, hasarlanma veya patojen ile ilişkili tehlike sinyalleri varlığında ise bu sinyallerin tanınmasında fonksiyon göstermektedir. Diğer taraftan NACHT yapıları ATP-bağımlı oligomerizasyona yani inflamazom formasyonuna imkan verir (Kigerl ve ark., 2014). Spinal hasar, travmatik beyin hasarı ve inme tablosunda NLRP1 aktivasyonu çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir (Freeman ve Ting, 2016).

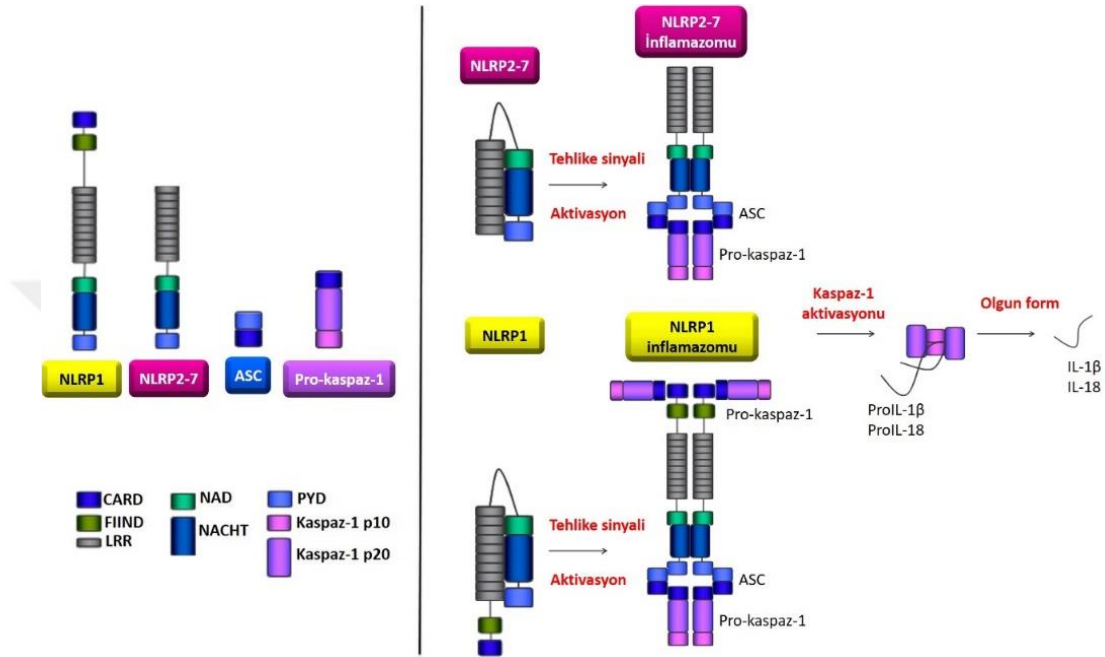
4.3.3.2. NLRP2 inflamazomu

Organizmada yaygın dağılım gösteren NLRP2 inflamazomunun; yakın tarihte MSS astrosit hücrelerinde de eksprese olduğunun gösterilmesi üzerine NLRP2 inflamazomunun astrositler aracılı gelişen nöroinflamasyon yanıtlarında rol oynayabileceği düşünülmüştür (Minkiewicz ve ark., 2013). ATP ile uyarılan astrosit hücrelerinde NLRP2 inflamazomunun aktive olduğu, buna kaspaz-1 ve IL-1 β üretimindeki artışın eşlik ettiği gösterilmiştir. NLRP2'nin moleküler organizasyonu NLRP3'e benzerlik göstermektedir. Yapıya ASC ve pro-kaspaz-1'in bağlanması sonucu inflamazom aktivasyonu meydana gelmektedir (Kersse ve ark., 2011; Kigerl ve ark., 2014) (Şekil 16).

4.3.3.3. NLRP3 inflamazomu

NLRP3 inflamazomu; neredeyse her tür tehlike sinyalini tanıma özelliğine sahip olmasıyla öne çıkan ve günümüze kadar en fazla araştırılan NLRP inflamazomudur (Schroder ve Tschopp, 2010). MSS'de en fazla mikroglia hücrelerinde eksprese olduğu bilinmektedir (Halle ve ark., 2008; Shi ve ark., 2013).

NLRP3'ün moleküler organizasyonu; LRR, NACHT ve pirin üçlü yapısından meydana gelmektedir (Şekil 16). Diğer NLRP türevlerinde olduğu gibi LRR yapısı normal koşullar altında NACHT yapısı üzerine katlanmış halde bulunarak otoinhibisyonundan sorumlu iken uyarının LRR'ye ulaşması ile NACHT yapısından ayrılarak reseptörün aktive olduğu düşünülmektedir (Davis ve ark., 2011).



Şekil 16. NLRP, ASC ve pro-kaspaz-1'in moleküler organizasyonları ve inflamazom formasyonu. CARD yapısı taşıyan apoptoz ile ilişkili speck benzeri protein; ASC, kaspaz toplanma yapısı; CARD, 'function to find' yapısı; FIIND, lösinden zengin tekrar yapısı; LRR, nükleotid bağlayan oligomerizasyon yapısı; NACHT, NOD-benzeri reseptör; NLR, protein-protein etkileşim gösteren pirin yapısı; PYD (Guarda ve So, 2010).

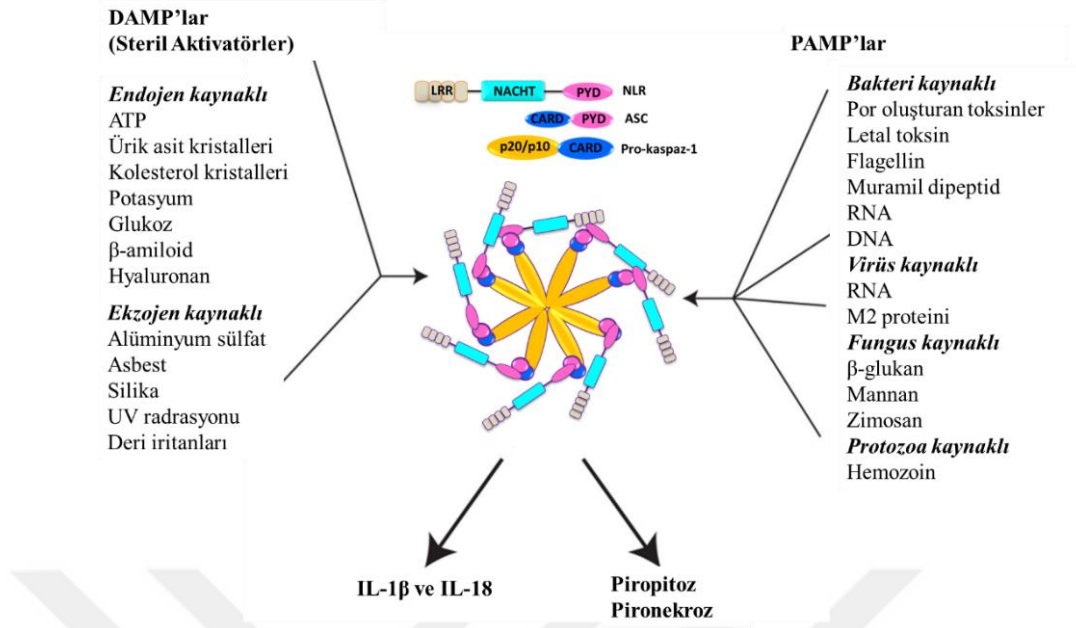
NLRP3; yapısında CARD taşımadığı için inflamazom formasyonu sırasında yapıya pro-kaspaz-1'in bağlanabilmesi ancak adaptör ASC proteini varlığında mümkündür. ASC içeriğindeki pirin yapısıyla NLRP3'ün pirin bölgesine ve CARD yapısıyla da pro-kaspaz-1'in CARD yapısına bağlanarak iki yapı arasında bir köprü oluşturmaktadır. NLRP3, ASC ve pro-kaspaz-1 bağlanmasından meydana gelen inflamazom aktivasyonu ile kaspaz-1'in oluşumu gerçekleşmektedir. Kaspaz-1 ise biyolojik olarak inert olan pro-IL-1β ve pro-IL-18'den aktif IL-1β ve IL-18'in dönüşümünü gerçekleştirir (Schroder ve Tschopp, 2010).

4.3.3.4. AIM2 inflamazomu

AIM2 inflamazomu; sitozolik AIM2 reseptörünün bakteriyel, viral ve çift-katmanlı DNA moleküllerini tanınması ile aktive olan NLRP inflamazomlarından farklı bir inflamazom tipidir (Freeman ve Ting, 2016; Kigerl ve ark., 2014). MSS'de nöronlarda eksprese olduğu bilinmektedir (Adamczak ve ark., 2014). Travmatik beyin hasarında ölmekte olan hücrelerden salınan DNA ile aktive olduğu ve bu aktivasyonu kaspaz-1 ve IL-1 β üretimindeki artışın izlediği gösterilmiştir. Kortikal nöronlarda oluşan AIM2 inflamazomu pro-kaspaz-1 ve ASC moleküllerinin yapıya katılmasıyla gerçekleşir. AIM2 inflamazomunun kortikal nöronlarda ayrıca programlı hücre ölümü piropitozisi başlattığı bilinmektedir (Freeman ve Ting, 2016; Kigerl ve ark., 2014).

4.3.4. İnflamazom aktivasyonu

İnflamazom aktivasyonu ile gelişen immün yanıtlar; yukarıda da değinildiği gibi kalıp tanıma reseptörlerinin organizmadaki tehlike uyarılarını algılaması ile başlamaktadır. İnflamazom aktivasyonuna yol açan tehlike uyarıları; patojenler ile ilişkili moleküler kalıplar (PAMP; pathogen-associated molecular pattern) ve tehlike/hasarlanma ile ilişkili moleküler kalıplar (DAMP; damage/danger-associated molecular pattern) olmak üzere ikiye ayrılmaktadır (Şekil 17) (Davis ve ark., 2011; de Rivero Vaccari ve ark., 2014; Fleshner ve ark., 2017). Bakteriyel, viral, fungal veya protozoal enfeksiyonlara bağlı olarak oluşan muramil dipeptid, bakteriyel flagellin, bakteriyel LPS, letal toksin, bakteriyel RNA, DNA, viral RNA, β -glukan, zimosan ve hemozoin inflamazom aktivasyonuna yol açtığı bilinen tipik PAMP'lar arasında sayılabilir (Şekil 17) (Davis ve ark., 2011). Steril inflamazom aktivatörleri olarak da bilinen DAMP'lar ise hücre hasarı, nekroz gibi durumlarda ölmekte olan veya hasara uğramış hücrelerden salınan endojen moleküller olabileceği gibi, dışarıdan organizmaya alınan ve steril inflamasyonu indükleyen ekzojen moleküller de olabilmektedir. Endojen DAMP'lar arasında; ATP, ürik asit kristalleri, kolesterol kristalleri, HMGB1, β -amiloid, hiyaluronan, ve glukoz sayılabilir. En iyi bilinen ekzojen DAMP'lar ise; UV radyasyonu, asbest, silika ve alüminyum sülfattır (Şekil 17) (Davis ve ark., 2011).



Şekil 17. İnflamazom aktivatörleri. Tehlike/hasarlanma ile ilişkili moleküler kalıplar; DAMP, patojen ile ilişkili moleküler kalıplar; PAMP, NOD-benzeri reseptör; NLR, apoptoz ile ilişkili speck-benzeri protein; ASC (Davis ve ark., 2011).

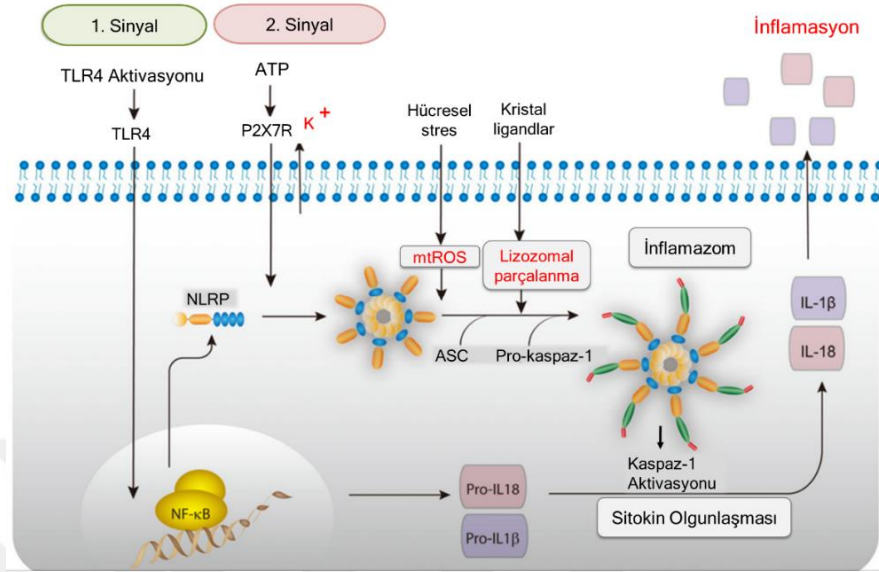
İnflamazomun MSS dışındaki yapılarda çeşitli DAMP ve PAMP'larla aktive olduğu bilinirken, bu aktivasyonun MSS içerisinde nasıl olduğuna ilişkin bilgilerimiz günümüzde halen oldukça sınırlıdır (de Rivero Vaccari ve ark., 2014). MSS'de en potent inflamazom aktivatörünün nöronal hasar ve strese bağlı olarak artan ekstraselüler ATP olduğu gösterilmiştir (Freeman ve Ting, 2016; Kaufmann ve ark., 2017). Örneğin; immobilizasyon stresine maruz bırakılan sıçanlarda hipokampal ATP düzeylerinde artış meydana gelmiş; bunu NLRP3 inflamazom aktivasyonu ve IL-1β üretimindeki artış izlemiştir (Iwata ve ark., 2016b). Yakın tarihli bir başka çalışmada insan astrosit hücrelerine ekzojen ATP uygulaması sonucu NLRP2 inflamazomunun aktive olduğu da gösterilmiştir (Minkiewicz ve ark., 2013). Yüksek ekstraselüler K⁺ iyonunun da panneksin-1 kanalının açılmasına bağlı olarak nöron ve astrositlerde inflamazom aktivasyonuna neden olduğu bilinmektedir. Beyinde biriken amiloid-β plaklarının mikrogial NLRP3 inflamazom aktivatörü olduğu farklı çalışmalarca raporlanmış ve bu bulgulardan yola çıkılarak NLRP3 inflamazomu Alzheimer hastalığı için olası bir terapötik hedef konumuna taşınmıştır (Halle ve ark., 2008; Heneka ve ark., 2013). MSS'deki bir diğer steril inflamazom aktivatörü ise doymuş

serbest yağ asiti palmitattır. Palmitatın astrositlerde eksprese olan NLRC4 inflamazomu aktivasyonuna yol açtığı bilinmektedir (Liu ve Chan, 2012). Bunların dışında reaktif oksijen radikalleri de MSS’de önemli inflamazom aktivatörleri arasında yer almaktadır (Lane ve ark., 2013). Nöronal AIM2 inflamazomunun ise ölen veya hasarlanmış hücrelerden salınan DNA ile aktive olduğu bilinmektedir (Adamczak ve ark., 2014).

Hücreye ulaşan tehlike sinyalleri varlığında NLRP inflamazomunun aktive edilebilmesi; iki aşamalı sinyal iletimi ile sağlanmaktadır. İlk olarak PAMP/DAMP ligandlarının (örn. LPS) hücre yüzeyinde bulunan TLR’ler (özellikle TLR-4) tarafından algılanması gerekmektedir (Iwata ve ark., 2013; Kaufmann ve ark., 2017). TLR-4 aktivasyonunun gerçekleştiği bu ilk aşama uyarılma/ateşlenme fazı olarak adlandırılmaktadır (Choi ve Ryter, 2014). Bunun sonucunda NF- κ B transkripsiyon faktörü aktive edilerek, NLRP, pro-IL-1 β ve pro-IL-18 öncül sitokinlerinin transkripsiyonları gerçekleşmektedir. İkinci aşamada; inaktif durumdaki NLRP aktive olarak oligomerize olur, ASC ve pro-kaspaz-1 ile bağlanarak inflamazom formasyonu meydana gelir. Bu süreç için hücre sitozolüne ikinci bir sinyalin ulaşması gerekmektedir. Bahsi geçen ikinci sinyal; ekstraselüler ATP’nin hücre membranında yerleşim gösteren pürinerjik 2X7 (P2X7) reseptörlerini aktive etmesi ile başlatılmaktadır. Bunun sonucunda hücreden K⁺ iyonu çıkışı meydana gelmekte ve düşük intraselüler K⁺ düzeyleri NLRP aktivasyonuna neden olmaktadır (Choi ve Ryter, 2014; Schroder ve Tschopp, 2010). İnflamazom aktivasyonunun gerçekleştiği bu ikinci aşamada proteolitik özellik gösteren kaspaz-1 aktive olur ve pro-IL-1 β ve pro-IL-18’den aktif ve olgun formları olan IL-1 β ve IL-18 meydana gelir (Şekil 18).

İnflamazom aktivasyonunun meydana gelmesinde P2X7 reseptörleri yanında P2X4 reseptörleri ve panneksin-1 kanal aktivasyonunun da kritik rol oynadığı düşünülmektedir (Şekil 19) (de Rivero Vaccari ve ark., 2012a; Silverman ve ark., 2009). MSS hasarı, stres ve travma durumlarında ölmekte olan hücrelerden ekstraselüler ortama salınan ATP; P2X7 reseptörlerinden önce ATP’ye duyarlılığı daha fazla olan P2X4 reseptörlerini uyarmaktadır (North ve Surprenant, 2000). P2X4 reseptörlerinin aktive olması sonucu hücreden K⁺ iyonu çıkışı gerçekleşmekte ve

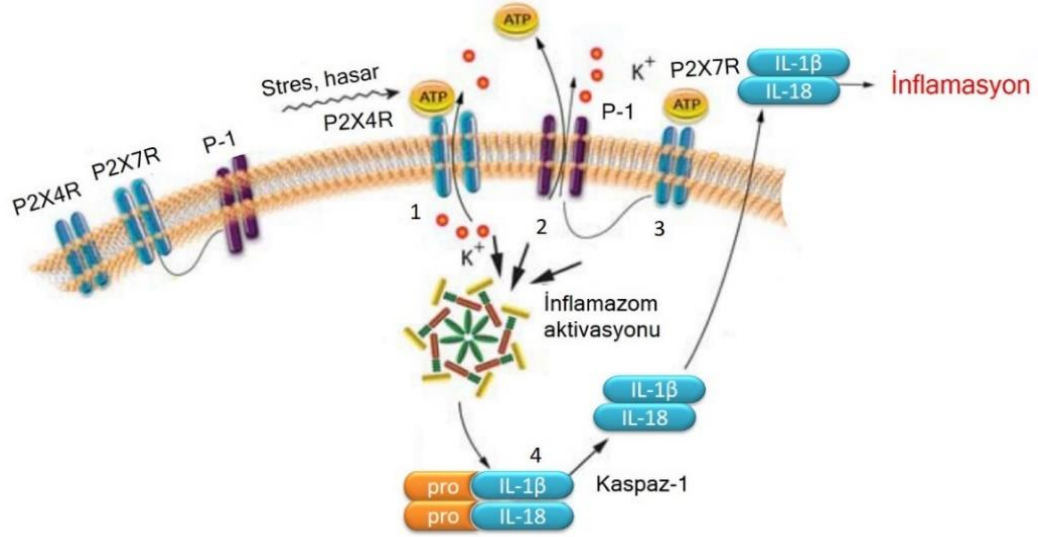
yüksek ekstraselüler K^+ düzeyleri ise panneksin-1 kanalının açılmasına yol açmaktadır.



Şekil 18. NLRP inflamazomunun iki aşamalı aktivasyon mekanizması. Apoptoz ilişkili speck-benzeri protein; ASC, interlökin; IL, mitokondriyel reaktif oksijen türevleri; mtROS, nükleer faktör kappa B; NF-κB, NOD-benzeri reseptör proteini; NLRP, purinerjik 2X7 reseptörü; P2X7R, toll-benzeri reseptör-4; TLR4 (Choi ve Ryter, 2014).

ATP salıveren kanal olarak işlev gören panneksin-1 kanalının aktivasyonu ekstraselüler ortamdaki ATP düzeylerinin daha da yükselmesine katkıda bulunmaktadır. P2X4 reseptörleri ve panneksin-1 kanal aktivasyonu aracılığıyla daha da artış gösteren ekstraselüler ATP düzeyleri ile P2X7 reseptörleri uyarılmakta ve bunun sonucunda hücreden K^+ çıkışı daha da artmaktadır. Bu şekilde devam eden panneksin-1 kanalı- P2X7 reseptör aktivasyonu döngüsü ile ‘ATP ile indüklenen ATP salınımı’ şeklinde bir pozitif geribildirim olduğu ve bu döngünün intraselüler K^+ düzeylerinin daha da düşmesine neden olduğu kabul edilmektedir (Bodin ve Burnstock, 1996; de Rivero Vaccari ve ark., 2014). Düşük intraselüler K^+ düzeylerinin inflamazom aktivasyonuna ne şekilde yol açtığı ise bilinmemektedir (Şekil 19) (Kigerl ve ark., 2014). Bahsi geçen mekanizmaların yanında hücresel stres durumlarında artan mitokondri kaynaklı reaktif oksijen türevlerinin ve ayrıca fagosite edilen kristal ya da partikül yapıda çeşitli DAMP’ların (silika ürik asit kristalleri gibi) lizozomal

yırtılmaya neden olarak inflamazom aktivasyonuna yol açtığı bilinmektedir (Şekil 18) (Kaufmann ve ark., 2017; Schroder ve Tschopp, 2010; Zhou ve ark., 2010).



Şekil 19. P2X4/7 reseptörleri ve panneksin-1 kanalının inflamazom aktivasyonundaki rolleri. Adenozin trifosfat; ATP, interlökin; IL, purinerjik 2X4/7 reseptörü; P2X4/7R, panneksin-1 kanalı; P-1 (de Rivero Vaccari ve ark., 2014).

4.3.5. İnflamazom patolojileri

NLRP inflamazomlarının ekzojen veya endojen, patojen olsun ya da olmasın çok çeşitli tehlike sinyalleri tarafından aktive edilebilmeleri; aktivasyonlarının rol oynadığı patolojilerdeki çeşitliliği de beraberinde getirmektedir. Bu kapsamda; başta otoimmün ve otoinflamatuar hastalıklar olmak üzere, obezite, tip 2 diyabet, ateroskleroz gibi metabolik ve kardiyovasküler hastalıklar, gut, artrit gibi kristal ile indüklenen hastalıklar, çevresel iritan maruziyeti ve çeşitli patojen enfeksiyonları inflamazom aktivasyonunun ilişkili olduğu temel patolojiler arasındadır (Kersse ve ark., 2011; Ratsimandresy ve ark., 2013).

İlk keşfedilen inflamazom aktivatörlerinin LPS, peptidoglikan, bakteriyel DNA, bakteriyel ve viral RNA gibi PAMP'lar olmasından hareketle organizmada patojenlere karşı geliştirilen konakçı savunmasında inflamazom aktivasyonunun önemi gündeme gelmiştir. NLRP3 geni silinen farelerde *Streptococcus pneumonia*, *Vibrio vulnificus*,

Candidia albicans, influenza A virüsü enfeksiyonlarına yatkınlığın arttığı gösterilmiştir (Kersse ve ark., 2011).

Kronik inflamasyonla seyreden, intestinal sistemde epitel bariyerin bozulması ve yararlı bakterilere karşı geliştirilen immün yanıtlar ile karakterize inflamatuvar bağırsak hastalığında, NLRP3 inflamazomu aktivasyonunun koruyucu rolleri bilinmektedir (Bauer ve ark., 2010; Kersse ve ark., 2011). Epitel bütünlüğünün deneysel olarak bozulduğu kolit modellerinde NLRP3, NLRP6, NLRC4, ASC ve pro-kaspaz-1'in koruyucu rolleri gösterilmiştir (Bauer ve ark., 2010). Bir başka çalışmada inflamatuvar bağırsak hastalıklarının gelişmesinde rol oynayan bağırsak mikrobiyota kompozisyonundaki değişimlerin NLRP6 inflamazomu aktivasyonunun kontrolü altında tutulduğu bildirilmiştir (Kersse ve ark., 2011).

Patojenler ile indüklenen inflamatuvar yanıtlardaki koruyucu rollerinin aksine, steril inflamasyonun eşlik ettiği otoimmün ve inflamatuvar komponentli çeşitli hastalıklarda inflamazom aktivasyonu patogenez süreçlerine katılan bir hastalık faktörü olarak karşımıza çıkmaktadır. NLRP3 geninde meydana gelen birtakım mutasyonlarla otoinflamatuvar hastalıkların ilişkilendirilmesi; bugün 'Kriyopin (NLRP3) İlişkili Periyodik Sendrom' olarak adlandırılan hereditör otoinflamatuvar hastalık grubunun tanımlanmasına sebebiyet vermiştir (Guarda ve So, 2010; Kubota ve Koike, 2010). Periyodik olarak tekrarlayan ateş, ürtiker, eklem ağrısı ve inflamasyon ile karakterize hastalık grubunun başta gelen örnekleri arasında ailesel soğuk otoinflamatuvar sendromu, Muckle–Wells sendromu ve kronik infantil nörolojik kütanöz artiküler sendromu bulunmaktadır (Yu ve Leslie, 2011). Bu hastalıkları taşıyan bireylerde IL-1 β düzeylerinin tipik olarak yüksek seyretmesi, otoinflamatuvar yanıtları domine eden bir patogenez faktörü olabileceğini düşündürmüştür. Nitekim günümüzde NLRP3 ilişkili periyodik sendromun tedavisinde IL-1 β antagonistleri ile önemli başarılar sağlanmaktadır (Kubota ve Koike, 2010; Yu ve Leslie, 2011).

NLRP3 inflamazomunun aktivasyonundan sorumlu DAMP ligandları göz önünde bulundurulduğunda ilişkili olduğu bazı temel patolojiler de öngörülebilir. Ürat kristalleri ile oluşan akut gut ve artrit, kolesterol kristalleri ile oluşan ateroskleroz, asbest ile oluşan asbestoz ve silikanın neden olduğu pulmoner fibrozis NLRP3

inflamazom aktivasyonunun rol oynadığı hastalıklara örnek olarak gösterilebilir (Cassel ve ark., 2008; Dostert ve ark., 2008; Duewell ve ark., 2010; Martinon ve ark., 2006; Yazdi ve ark., 2010). Diğer taraftan obezite, tip 2 diyabet gibi metabolik hastalıklara eşlik eden yüksek glukoz düzeyleri, yüksek yağlı diyetle bağlı artan palmitat gibi doymuş yağ asitlerinin ve adacık amiloid polipeptid depozitlerinin NLRP3 inflamazomunun potent aktivatörleri olduğunun gösterilmesi NLRP3 inflamazomunun rolüne dikkat çekmiştir (Choi ve Ryter, 2014; Masters ve ark., 2010; Wen ve ark., 2011). Bu bilgilerden hareketle NLRP3 inflamazom inhibisyonunun diyabet tedavisinde potansiyel bir hedef olabileceği düşünülmüştür. Destekleyen bir bulgu olarak diyabet tedavisinde kullanılan gliburid, glibenklamid gibi bazı antidiyabetik ilaçlarının NLRP3 inflamazomunu inhibe ettiğinin gösterilmesi de dikkat çekicidir (Choi ve Ryter, 2014; Iwata ve ark., 2013).

İnflamazomun MSS patolojilerindeki rolü ise yakın tarihte aydınlatılmaya başlamıştır. Günümüzde bu alanda elde edilen bulgular halen kısıtlılığını korumasına karşın, başta Alzheimer hastalığı olmak üzere, travmatik beyin hasarı, multipl skleroz gibi nörodejenerasyonun eşlik ettiği patolojilerde farklı inflamazom yapılarının rol oynadığı çeşitli çalışmalarca gösterilmiştir (Freeman ve Ting, 2016).

Alzheimer hastalığı beyinde amiloid- β plakları ve nörofibriler yumak birikimi ile karakterize progresif ve nörodejeneratif bir hastalıktır. Yapılan çalışmalar Alzheimer hastalığında mikrogliya aktivasyonunun arttığını ve IL-1 β aracılı nöroinflamasyon yanıtlarının tetiklendiğini ortaya koymuştur (Blum-Degen ve ark., 1995; Vehmas ve ark., 2003). İn vitro hücre kültürü çalışmalarında amiloid plakların mikrogliya hücrelerinde NLRP3 inflamazomunu aktive ederek IL-1 β salınımına yol açtığı, farelerde genetik Alzheimer modelinde NLRP3 gen delesyonunun amiloid plak oluşumunu azalttığı ve buna bağlı olarak hastalık semptomlarının düzelebildiğinin gösterilmesi, Alzheimer hastalığının patogenezinde NLRP3 inflamazomunun rolüne dikkat çekmiştir (Halle ve ark., 2008; Heneka ve ark., 2013). Ancak Alzheimer'da NLRP3'ün hastalıkla ilgili tek NLR tipi olmadığı düşünülmektedir (Freeman ve Ting, 2016). Örneğin, genetik Alzheimer modeli oluşturulan farelerde NLRP1 gen ekspresyonunun yüksek olduğu ve gende meydana gelen bazı mutasyonların hastalığın

etiyojisine katkıda bulunabileceği ileri sürülmüştür (Pontillo ve ark., 2012; Tan ve ark., 2014). Bir başka çalışmada sporadik Alzheimer hastalarının post-mortem beyin dokularında NLRC4 ve ASC ekspresyonlarının yüksek olduğu rapor edilmiştir. Aynı çalışmada izole edilen astrosit hücrelerinin doymuş yağ asidi palmitat ile uyarılması sonucu meydana gelen NLRC4 inflamazom aktivasyonunun IL-1 β salınımını ve primer nöronlarda amiloid üretimini artırdığı gösterilmiştir (Liu ve Chan, 2014). Bu bulgular ışığında astrosit NLRC4 inflamazom aktivasyonunun Alzheimer hastalığı patogenezinde rolü olabileceği öne sürülmüştür.

Travmatik beyin hasarında erken dönemde meydana gelen nöron kaybı ve nekrotik hücre ölümünü takip eden dönemde hasarlı bölgede mikroglia ve astrosit hücrelerin toplandığı; böylece oksidatif stres, mitokondriyel disfonksiyon ve artmış proinflamatuvar sitokinler gibi nöroinflamasyon süreçlerinin tetiklendiği bilinmektedir (Freeman ve Ting, 2016). Özellikle bu fazda ATP, DNA ve reaktif oksijen türevleri gibi inflamazom aktivasyonuna neden olan DAMP'lar ortama salıverilmektedir (Freeman ve Ting, 2016). Travmatik beyin hasarında nöronal NLRP1 ve AIM2 başta olmak üzere, mikroglial NLRP3 inflamazomlarının patolojik süreçlerde rol oynayabileceği rapor edilmiştir (Adamczak ve ark., 2012; Freeman ve Ting, 2016; Liu ve ark., 2013). Bunların dışında nörodejenerasyon ve nöroinflamasyon süreçlerinin eşlik ettiği multipl skleroz, serebral iskemide ve Parkinson gibi hastalıklar inflamazom aktivasyonu ile ilişkilendirilmiştir (Freeman ve Ting, 2016).

Son yıllarda strese maruziyet ve depresyon gelişmesinde MSS inflamazomlarının özellikle NLRP3'ün rolüne ilişkin çalışmalar yayımlanmaya başlamıştır (Kaufmann ve ark., 2017).

4.3.5.1. Stres ve depresyonda inflamazom aktivasyonu

Son dönemde az sayıdaki çalışma ile depresyonda NLRP3 inflamazom yolağı ele alınmaya başlanmış durumdadır. Stres ve depresyonun inflamazom aktivasyonu ile olan potansiyel ilişkisine ilk kez 2013 yılında Iwata ve arkadaşlarının gözden geçirme makalesinde dikkat çekilmiştir (Iwata ve ark., 2013). 2014 yılından itibaren ise konu ile ilgili deneysel çalışmalar rapor edilmeye başlamıştır (Alcocer-Gomez ve ark.,

2014; Alcocer-Gomez ve ark., 2016; Baune, 2015; Iwata ve ark., 2013; Li ve ark., 2016; Lu ve ark., 2014; Pan ve ark., 2014; Sahin ve ark., 2016a; Xue ve ark., 2015; Zhang ve ark., 2015; Zhang ve ark., 2014).

Fareler üzerinde yapılan bir çalışmada bakteriyel LPS ile oluşturulan akut inflamatuvar depresyon modelinde meydana gelen depresif-benzeri davranışlar ile NLRP3 inflamazomu aktivasyonu ilişkilendirilmiştir (Zhang ve ark., 2014). Akut LPS uygulaması sonrası depresyon geliştiği kabul edilen farelerin beyin NLRP3, ASC, kaspaz-1 ve IL-1 β gen ekspresyonlarının kontrol grubuna göre arttığı rapor edilmiştir (Zhang ve ark., 2014). Ayrıca LPS uygulamasının IL-1 β protein ekspresyonunu da artırdığı gösterilmiştir. Çalışmada önceden geri dönüşümsüz kaspaz-1 inhibitörü uygulamasının farelerde depresif-benzeri davranışları azalttığı gösterilmiştir (Zhang ve ark., 2014).

Aynı ekibin bir başka çalışmasında LPS ve yüzme stresinin birlikte uygulanarak oluşturulduğu kronik tükenmişlik sendromu modelinde diensefalonda NLRP3 inflamazomu aktivasyonu ile serum IL-1 β ve IL-6 seviyelerinin arttığı gösterilmiştir. NLRP3 geni silinmesi durumunda ise davranışsal düzeyde iyileşme ve diensefalonda kaspaz-1 ve IL-1 β düzeylerinin azaldığı saptanmıştır (Zhang ve ark., 2016). Destekler nitelikte; 30 gün kronik kısıtlama stresi uygulanan transgenik farelerde depresyon benzeri davranışın temel kriterleri kabul edilen zorunlu yüzme, sükröz tercih, sosyal etkileşim ve besin tüketimi değerlendirildiğinde depresyonun oluşmadığı gösterilmemiştir. Ayrıca normal farelerde hipokampus ve prefrontal kortekste arttığı gösterilen NLRP3 ve IL-1 β düzeyleri ile mikroglia aktivasyonunun transgenik farelerde değişmediği de gösterilmiştir (Alcocer-Gomez ve ark., 2016). Sonrasında yapılan bir başka çalışmada NLRP3 genin silinmesiyle depresyonun oluşmadığı ve spontan anksiyeteye ilgili davranışların azaldığı rapor edilerek Alcocer-Gomez ve arkadaşlarının bulguları desteklenmiştir (Alcocer-Gomez ve ark., 2016; Iwata ve ark., 2016a).

Iwata ve arkadaşlarının 2016 yılında sıçanlar üzerinde gerçekleştirdikleri çalışmalarında stresin beyinde ekstraselüler ATP salınımını artırarak P2X7 reseptör stimülasyonu aracılığıyla inflamazom aktivasyonuna yol açtığı gösterilmiştir (Iwata

ve ark., 2016b). Çalışmada sıçanlara 1 saat süreyle akut immobilizasyon stresi uygulanmış ve mikrodializ yöntemi ile izlenen hipokampal ATP, glutamat, IL-1 β ve TNF- α düzeylerinin strese bağlı olarak arttığı gösterilmiştir. Hipokampal NLRP3 düzeyleri de incelenmiş; stres uygulanan sıçanlarda total NLRP3 düzeylerinin değişmediği ancak anti-ASC antikoru ile işaretlenen NLRP3 düzeylerinin strese bağlı olarak arttığı rapor edilmiş ve ‘aktif NLRP3’ kavramını gündeme getirmiştir (Iwata ve ark., 2016). ATP’nin P2X7 reseptörlerinin endojen ligandı ve aktivatörü olduğu bilgisinden hareketle P2X7 reseptör antagonisti (A-804598) kullanılması durumunda; stres ile artan sitokin salınımının ve NLRP3 aktivitesinin baskılanabildiği ve buna bağlı olarak stres ile oluşan anhedoni ve anksiyete davranışlarını düzeltilebildiği gösterilmiştir. Yukarıda özetlenen bulgular stresin doğal immün sistem yanıtlarını büyük olasılıkla ATP/P2X7 reseptörü/NLRP3 inflamazom kaskadı aracılığıyla tetikleyebildiğini ve ilişkili patolojilerde terapötik önemine dikkat çekmişlerdir (Iwata ve ark., 2016b).

NLRP3 aktivasyonu; farelerde öğrenilmiş çaresizlik modeli kullanılarak da araştırılmış, hipokampal dokularda inflamazom aktivasyonu sürecine kemokinler, sitokinler gibi çeşitli inflamatuvar medyatörlerin ve glikojen sentaz kinaz (GSK)-3 β aktivitesinde artışın eşlik ettiği gösterilmiştir (Cheng ve ark., 2016). TLR4 geni silinmesi ve GSK-3 β inhibitörü kullanılması durumlarında ise stres ile oluşan NLRP3 inflamazomu aktivasyonunun ve sitokin artışının gerçekleşmediği gösterilmiştir. Dolayısıyla stresin neden olduğu nöroinflamasyon tablosunda GSK-3 β ve TLR4 sinyal yollarının rol oynayabileceği düşünülmüştür (Cheng ve ark., 2016).

Bir diğer çalışmada prenatal stres modeli kullanılmış; yetişkinlik döneminde depresif-benzeri davranışlar geliştiği ve buna prefrontal korteks NLRP3 inflamazom aktivasyonu ile inflamatuvar medyatör artışının eşlik ettiği gösterilmiştir (Slusarczyk ve ark., 2016). Aynı çalışmada endojen bir kemokin olan fraktalkin (CX3CL1) uygulanmasının prenatal strese maruz bırakılan yetişkin sıçanlarda NLRP3 inflamazom aktivasyonunu ve nöroinflamatuvar yanıtları azaltarak anti-inflamatuvar etki meydana getirdiği ve depresif davranışları düzelttiği gösterilmiştir (Slusarczyk ve ark., 2016).

NLRP3 inflamazom aktivasyonunun in vivo ve in vitro düzeyde incelendiği bir başka çalışmada günümüzde depresyon tedavisinde yaygın olarak kullanılan fluoksetinin etkileri incelenmiştir (Du ve ark., 2016). Bakteriyel LPS ve ATP ile yapılan in vitro çalışmalarda fluoksetinin etkileri makrofaj ve mikrogliya hücrelerinde araştırılmış NLRP3 inflamazom aktivasyonu, reaktif oksijen türevleri, protein kinaz yolağı ve IL-1 β salınımı azalttığı gösterilmiştir. Fluoksetinin etkilerinin in vivo olarak değerlendirildiği çalışmalarda 5 veya 6 hafta süreyle kronik hafif stres uygulanmış ve ortak sonuç olarak NLRP3 inflamazom aktivasyonunun ve inflamatuvar sitokin yanıtlarının fluoksetin tedavisi ile baskılandığı rapor edilmiştir (Deng ve ark., 2015a; 2015b; Du ve ark., 2016; Xue ve ark., 2015). Fluoksetinin gerek santral gerekse periferik NLRP3 inflamazom aktivasyonunu ve eşlik eden inflamatuvar yanıtları düzenleyebildiğinin gösterilmesi; fluoksetinin klinik önemine dikkat çekmiştir (Du ve ark., 2016).

2014 yılında Pan ve arkadaşları NLRP3 inflamazom aktivasyonunu KÖHS ile oluşturulan deneysel depresyon modelinde incelemiştir (Pan ve ark., 2014). Sıçanlar kronik stres prosedürüne 12 hafta süreyle maruz bırakılmış, bu sürenin sonunda inflamazom bileşenleri ve ilişkili bazı nöroinflamatuvar medyatörler prefrontal kortekste incelenmiştir. Elde edilen bulgular kronik strese maruz bırakılan ve depresyon gelişen sıçanların prefrontal kortekslerinde NLRP3 inflamazom aktivasyonu meydana geldiğini göstermiştir. İnflamazom aktivasyonu; NLRP3, ASC, kaspaz-1 inflamazom bileşenleri ve aktivasyona bağlı salınan IL-1 β ve NF- κ B düzeyleri ile değerlendirilmiştir. Stres uygulanan sıçanlarda NLRP3, kaspaz-1 ve NF- κ B protein ekspresyonlarının arttığı; ASC düzeylerinde ise anlamlı bir değişiklik meydana gelmediği gösterilmiştir. NLRP3 inflamazom aktivasyonu ile salınan IL-1 β 'nın prefrontal korteks protein düzeyleri de stres uygulanan sıçanlarda anlamlı ölçüde yükselmiş ancak BOS ve serum seviyelerinde anlamlı bir değişim görülmemiştir. İlgili çalışmada protein ekspresyonlarına ek olarak NLRP3 ve IL-1 β 'nın gen ekspresyon düzeyleri de incelenmiş ve stres grubunda anlamlı artış rapor edilmiştir. Ayrıca çalışmada stres ile oluşan NLRP3 inflamazomu aktivasyonuna mikrogliyal aktivasyonunun da eşlik ettiği gösterilmiştir. Sözü edilen çalışmada depresyon tedavisinde kullanılan antidepresan ilaçlardan SSRI fluoksetinin 6 haftalık

kronik uygulmasının prefrontal kortekste artmış NLRP3 aktivasyonunu ve IL-1 β seviyesini anlamlı ölçüde azalttığı, mikroglia aktivasyonunu engelleyebildiği gösterilmiştir (Pan ve ark., 2014).

Aynı model kullanılarak NLRP3 inflamazom aktivasyonunun farelerde de olduğu gösterilmiştir (Lu ve ark., 2014). 7 hafta süreyle kronik strese maruz bırakılan ve depresyon gelişen farelerin hipokampal NLRP3, kaspaz-1 ve IL-1 β protein düzeylerinin arttığı gösterilmiş ve bu tablo inflamazom aktivasyonu şeklinde değerlendirilmiştir (Lu ve ark., 2014). Ayrıca IL-1 β düzeyleri serumda da incelenmiş ve stresin IL-1 β düzeylerini arttığı gösterilmiştir. İlgili çalışmada IL-1 β dışında TNF- α , IL-6 pro-inflamatuvar sitokinleri ile anti-inflamatuvar sitokinlerden IL-10'un hipokampal gen ekspresyonlarındaki değişim de incelenmiştir. Stres ile IL-1 β , TNF- α ve IL-6'nın hipokampal gen seviyelerinin yükseldiği gösterilirken IL-10 düzeylerinin azaldığı rapor edilmiştir. Çalışmada ayrıca mikroglia aktivasyonunun göstergelerinden biri olan CD11b immünoaktivitesi incelenmiş ve stres gruplarında mikroglia aktivasyonuna işaret eden immünoaktivite bulgularına rastlanmıştır. Tedavi gruplarına uygulanan ve antidepresan etkileri gösterilen ATP'ye duyarlı potasyum kanal açıcı, iptakalim ve fluoksetin'in stres ile artan hipokampal NLRP3 inflamazom aktivasyonunu azalttıkları, sitokin yanıtlarını geri çevirdikleri ve mikroglia aracılı nöroinflamasyonu azaltarak hipokampal nöroenezise katkıda bulundukları gösterilmiştir (Lu ve ark., 2014). Bir başka çalışmada KÖHS modelinde hipokampal NLRP3, kaspaz-1, ASC ve IL-1 β proteini ile serum IL-1 β ve kortikosteron düzeylerinin KÖHS prosedürü ile arttığı, kronik kaspaz-1 inhibitörü kullanılması durumunda ise gerek davranış gerekse anılan moleküler değişikliklerin düzenlenebileceği rapor edilmiştir (Zhang ve ark., 2015).

KÖHS depresyon modelinde NLRP3 inflamazomunun ele alındığı çalışmaların önemli bir bölümünde tedavi hedefi olarak çeşitli bitkisel yaklaşımların etkilerinin incelendiği görülmektedir (Deng ve ark., 2015a; 2015b; Li ve ark., 2016; Liu ve ark., 2015; Xue ve ark., 2015). Sözü edilen çalışmalarda temel olarak antioksidan ve/veya antiinflamatuvar etkilerinden yola çıkılarak kullanılan çeşitli flavanoid, biflavanoid ve monoterpen bileşiklerinin NLRP3 inflamazomu aktivasyonunu baskıladığı rapor

edilmiştir (Deng ve ark., 2015a; 2015b; Li ve ark., 2016; Liu ve ark., 2015; Xue ve ark., 2015).

2016 yılında ekibimiz tarafından sıçanlar üzerinde gerçekleştirilen bir çalışmada 7 gün süreyle günde sub-kronik kısıtlama stresi oluşturulmuş ve bu modelde NLRP3 inflamazom aktivasyonu iki ayrı beyin bölgesinde, hipokampus ve prefrontal kortekste incelenmiştir (Sahin ve ark., 2016a). NLRP3 inflamazom aktivasyonunun değerlendirilmesinde NLRP3, ASC, kaspaz-1 ve NF-κB inflamazom bileşenleri kullanılmış ve buna ek olarak çeşitli pro-ve antiinflamatuvar sitokin düzeylerinin değişimleri incelenmiştir. Çalışmamızda strese maruz bırakılan sıçanların hipokampus ve prefrontal korteks beyin bölgelerinde NLRP3 inflamazom aktivasyonu meydana geldiği ve IL-1β, IL-18 başta olmak üzere araştırılan diğer pro-inflamatuvar sitokinlerin (TNF-α, IFN-γ, IL-6, IL-2, IL-17) düzeylerindeki artışın eşlik ettiği gösterilmiştir. Bunun yanında IL-4 ve IL-10 antiinflamatuvar sitokinlerin düzeyleri stres varlığında azalmıştır. Elde edilen bulgularla stresin gerek MSS gerekse periferik dolaşımda inflamatuvar yanıtları tetiklediği ve NLRP3 inflamazom aktivasyonuna yol açtığı gösterilmiştir (Sahin ve ark., 2016a).

Stres veya LPS uygulaması ile oluşturulan depresyon modellerinin yanı sıra özellikle son dönemde overektomiye bağlı östrojen eksikliği ile görülen depresyon-benzeri davranışlar ve kronik glukortikoid uygulaması gibi farklı deneysel modellerde de inflamazom aktivasyonunun ilişkilendirildiği görülmektedir (Hu ve ark., 2016; Wang ve ark., 2016; Xu ve ark., 2016).

Sözü edilen deneysel çalışmaların yanı sıra, 2014 yılında yayımlanan bir klinik çalışma ile NLRP3 inflamazom aktivasyonu major depresyon hastalarında da rapor edilmiştir (Alcocer-Gomez ve ark., 2014). Hastalardan izole edilen periferik kan mononükleer hücrelerinde NLRP3 ve kaspaz-1 ekspresyonlarının ve eşlik eden IL-1β ve IL-18 serum düzeylerinin sağlıklı bireylere göre yüksek olduğu bulunmuştur. Aynı çalışmada en az 10 ay boyunca amitriptilin tedavisi alan hastalarda NLRP3 aktivasyonunun ve ilişkili sitokin yanıtlarının azaldığı gösterilmiştir (Alcocer-Gomez ve ark., 2014). Depresyon hastalarında gerçekleştirilen bir başka klinik çalışmada NLRP ailesi gibi inflamazom formasyonu oluşturan AIM2 düzeyleri incelenmiş

depresif hastalarda AIM2 düzeyleri anlamlı değişim göstermezken; ASC düzeylerinin arttığı gösterilmiştir (Momeni ve ark., 2016). Anılan bulgularla depresyonda AIM2 inflamazom aktivasyonunun olası rolü dışlanmış olmasına karşın, ASC düzeylerindeki artışın inflamazom formasyonu oluşturan diğer NLR üyelerinin (NLRP1, NLRP3, NLRC4) önemine dikkat çekilmiştir (Momeni ve ark., 2016).

Yukarıda da sözü edilen stres, depresyon ve inflamazom aktivasyonunun ilişkilendirildiği literatür çalışmaları kronolojik sıralama ile Tablo 2’de özetlenmiştir.



Tablo 2. NLRP3 inflamazomu aktivasyonunun gösterildiği stres ve depresyon çalışmaları. Kronik öngörülemeyen hafif stres; KÖHS. (Kronolojik sıra ile yer verilmiştir.).

Model/Hastalık	Denek	Doku tipi	Araştırılan inflamazom bileşeni	Araştırılan sitokin	Etkili molekül	Yöntem			Kaynak
						PCR	Western blot	ELISA	
Bakteriyel LPS uygulaması (akut)	Fare	Total beyin	NLRP3 Kaspaz-1 ASC	IL-1 β	Kaspaz-1 inhibitörü (Ac-YVAD-CMK); yalnızca depresif davranışlar üzerindeki etkisi yönünden çalışılmıştır.	NLRP3 Kaspaz-1 ASC IL-1 β	-	-	(Zhang ve ark., 2014)
KÖHS (12 hafta)	Sıçan	PFC	NLRP3, Kaspaz-1, ASC NF- κ B	IL-1 β	Fluoksetin (6 hafta)	NLRP3 IL-1 β	NLRP3 Kaspaz-1 ASC NF- κ B IL-1 β	IL-1 β (serum, BOS)	(Pan ve ark., 2014)
KÖHS (7 hafta)	Fare	Hipokampus	NLRP3 Kaspaz-1	IL-1 β TNF- α IL-6 IL-10	Fluoksetin, Potasyum kanal açıcısı (iptakalim) (4 hafta)	IL-1 β TNF- α IL-6 IL-10	NLRP3 Kaspaz-1 IL-1 β	IL-1 β (serum)	(Lu ve ark., 2014)
Major depresyon hastaları	İnsan	Periferik kan mononükleer hücreleri	NLRP3 Kaspaz-1	IL-1 β IL-18	Amitriptilin (en az 10 ay)	NLRP3 Kaspaz-1 IL-1 β	NLRP3	IL-1 β IL-18 (serum)	(Alcocer-Gomez ve ark., 2014)

Tablo 2. NLRP3 inflamazomu aktivasyonunun gösterildiği stres ve depresyon çalışmaları (devam).

Model/Hastalık	Denek	Doku tipi	Araştırılan inflamazom bileşeni	Araştırılan sitokin	Etkili molekül	Yöntem			Kaynak
						PCR	Western blot	ELISA	
KÖHS (4 hafta)	Fare	Hipokampus	NLRP3, Kaspaz-1, ASC	IL-1 β	VX-765 (kaspaz-1 inhibitörü) (4 hafta)	-	NLRP3 IL-1 β , ASC	-	(Zhang ve ark., 2015) ¹
KÖHS (6 hafta)	Fare	Hipokampus	NLRP3 Kaspaz-1 ASC	IL-1 β IL-6 TNF- α	Thymol Fluoksetin (3 hafta)	IL-1 β IL-6 TNF- α	NLRP3 Kaspaz-1 ASC	-	(Deng ve ark., 2015a)
KÖHS (6 hafta)	Fare	Prefrontal korteks	NLRP3 Kaspaz-1 NF- κ B ASC	IL-1 β IL-6 TNF- α	Geraniol, Fluoksetin (3 hafta)	IL-1 β IL-6 TNF- α	NLRP3 Kaspaz-1 NF- κ B ASC	IL-1 β	(Deng ve ark., 2015b)
KÖHS (6 hafta)	Fare	Hipokampus	NLRP3 Kaspaz-1	IL-1 β IL-6 TNF- α	L-Menthone, Fluoksetin (3 hafta)	-	NLRP3 Kaspaz-1	IL-1 β IL-6 TNF- α	(Xue ve ark., 2015)
KÖHS (35 gün)	Sıçan	Hipokampus	NLRP3 Kaspaz-1 ASC NF- κ B	IL-1 β TNF- α	İcariin (flavonoid ekstratı), Fluoksetin (5 hafta)	IL-1 β TNF- α CD11b iNOS	NLRP3 Kaspaz-1 ASC NF- κ B iNOS	IL-1 β TNF- α	(Liu ve ark., 2015)
Kronik kısıtlama stresi (30 gün)	NLRP3 ^{-/-} NLRP3 ^{+/+} Fare	Prefrontal korteks ve hipokampus	NLRP3	IL-1 β	Minosiklin (30 gün)	NLRP3 IL-1 β	NLRP3 IL-1 β	-	(Alcocer-Gomez ve ark., 2016)

¹Kaspaz-1 protein düzeyleri; kolorimetrik kaspaz-1 aktivite assay kiti kullanılarak değerlendirilmiştir. IL-1 β serum düzeylerine florasan manyetik bead-based immunoassay ile bakılmıştır.

Tablo 2. NLRP3 inflamazomu aktivasyonunun gösterildiği stres ve depresyon çalışmaları (devam).

Model/Hastalık	Denek	Doku tipi	Araştırılan inflamazom bileşeni	Araştırılan sitokin	Etkili molekül	Yöntem			Kaynak
						PCR	Western blot	ELISA	
Akut Kısıtlama stresi (1 saat)	Sıçan	Hipokampus	NLRP3	IL-1 β TNF- α (mikrodiyaliz)	A-804598 (P2X7 reseptör antagonisti)	-	NLRP3	-	(Iwata ve ark., 2016b) ²
Sub-kronik kısıtlama stresi (7 gün)	Sıçan	Prefrontal korteks Hipokampus	NLRP3 ASC Kaspaz-1 NF- κ B	IL-1 β , IL-18, IL-6, TNF- α , IL-2, IL-17, IFN- γ (akış sitometrisi)	Agmatin (akut uyg.)	NLRP3, ASC Kaspaz-1, NF- κ B, IL-1 β , IL-18, IL-6, TNF- α	-	IL-18	(Sahin ve ark., 2016a)
KÖHS (8 hafta)	Fare	Hipokampus, makrofaj hücreleri	NLRP3 Kaspaz-1	IL-1 β	Fluoksetin (4 hafta)	-	NLRP3 Kaspaz-1 IL-1 β	IL-1 β (serum)	(Du ve ark., 2016)
KÖHS (6 hafta)	Sıçan	Prefrontal korteks	NLRP3 Kaspaz-1 ASC	IL-1 β IL-18	Apigenin (biflavanoid) (3 hafta)	-	NLRP3 Kaspaz-1 ASC	IL-1 β IL-18	(Li ve ark., 2016)
Depresyon hastaları	İnsan	Periferal kan mononükleer hücreleri	AIM2 ASC	-	-	AIM2 ASC	-	-	(Momeni ve ark., 2016) ³

²Çalışmada total NLRP3 protein düzeyinin stres grubunda kontrole göre anlamlı ölçüde değişmediği, ancak anti-ASC ile ko-immünpresipitasyon yapıldığında ‘aktif NLRP3’ olarak yorumlanan NLRP3 düzeylerinin stres ile arttığı gösterilmiştir.³Hastalarda AIM2 düzeyleri değişmemiştir.

Tablo 2. NLRP3 inflamazomu aktivasyonunun gösterildiği stres ve depresyon çalışmaları (devam).

Model/Hastalık	Denek	Doku tipi	Araştırılan inflamazom bileşeni	Araştırılan sitokin	Etkili molekül	Yöntem			Kaynak
						PCR	Western blot	ELISA	
Öğrenilmiş çaresizlik	Wild-type TLR4-/- fare	Hipokampus	NLRP3 Kaspaz-1 NF-κB	IL-1β ve sitokin paneli	-	TLR4	NLRP3 Kaspaz-1 NF-κB	IL-1β	(Cheng ve ark., 2016)
LPS ve yüzme stresi ile indüklenen tükenmişlik sendromu	Fare; Wild type NLRP3-/-	Diensefalon	NLRP3 Kaspaz-1 Prokaspaz-1	IL-1β ProIL-1β	-	NLRP3 ProIL-1β	NLRP3 Kaspaz-1 Prokaspaz-1 IL-1β ProIL-1β	-	(Zhang ve ark., 2016)
Prenatal stres	Sıçan	Prefrontal korteks Hipokampus	NLRP3 Kaspaz-1 ASC	IL-1β TNF-α IL-6 IL-18 CCL2	Fraktalkin (CX3CL1; kemokin) (tek doz)	IL-1β TNF-α IL-6 IL-18 CCL2	NLRP3 Kaspaz-1 ASC	IL-1β TNF-α IL-6 IL-18 CCL2	(Slusarczyk ve ark., 2016)
Overektomi ile indüklenen depresyon-benzeri davranışlar	Fare	Hipokampus	NLRP3 Kaspaz-1 ASC (P2X7 TLR-4)	IL-1β IL-18	-	NLRP3 IL-1β IL-18	NLRP3 Kaspaz-1 ASC (P2X7 TLR-4) proIL-1β proIL-18 IL-1β IL-18	IL-1β IL-18	(Xu ve ark., 2016)

Tablo 2. NLRP3 inflamazomu aktivasyonunun gösterildiği stres ve depresyon çalışmaları (devam).

Model/Hastalık	Denek	Doku tipi	Araştırılan inflamazom bileşeni	Araştırılan sitokin	Etkili molekül	Yöntem			Kaynak
						PCR	Western blot	ELISA	
Overektomi ile indüklenen depresyon-benzeri davranışlar	Fare	Hipokampus	NLRP3 Kaspaz-1 ASC	IL-1 β IL-18	Egzersiz	NLRP3	NLRP3 Kaspaz-1 ASC Pro/IL-1 β Pro/IL-18	IL-1 β IL-18	(Wang ve ark., 2016)
KÖHS (6 hafta)	Fare	Hipokampus	NLRP3 ASC Kaspaz-1	IL-1 β IL-18 TNF- α	Mangiferin (Mangifera indica) Fluoksetin (3 hafta)	IL-1 β IL-18 TNF- α	NLRP3 ASC Kaspaz-1	-	(Cao ve ark., 2017)
Bakteriyel LPS uygulaması (2 hafta)	Sıçan	Prefrontal korteks Hipokampus	NLRP3 P2X7R	IL-1 β IL-6 TNF- α	Balık yağı (3 hafta)	IL-1 β IL-6	NLRP3 P2X7R	-	(Dang ve ark., 2017)
KÖHS (12 hafta)	Sıçan	Hipokampus Hipotalamus Prefrontal korteks Karaciğer	NLRP3 Kaspaz-1 ASC	IL-1 β	Banxia-houpu (Geleneksel Çin tıbbi), Fluoksetin (6 hafta)	-	NLRP3 Kaspaz-1 ASC IL-1 β	IL-1 β (serum)	(Jia ve ark., 2017)
Erken dönem bakteriyel LPS uygulaması (Postnatal 2. hafta)	Sıçan	Prefrontal korteks Hipokampus	NLRP3 Kaspaz-1 ASC	-	-	-	NLRP3* Kaspaz-1 ASC	-	(Lei ve ark., 2017) ⁴

⁴ NLRP3 inflamazomu immünohistokimyasal yöntemle de incelenmiştir.

Tablo 2. NLRP3 inflamazomu aktivasyonunun gösterildiği stres ve depresyon çalışmaları (devam).

Model/Hastalık	Denek	Doku tipi	Araştırılan inflamazom bileşeni	Araştırılan sitokin	Etkili molekül	Yöntem			Kaynak
						PCR	Western blot	ELISA	
KÖHS (12 hafta)	Fare	Prefrontal korteks	NLRP3 Kaspaz-1 NF-κB	IL-1β IL-6 TNF-α	Ferrulik asit Fluoksetin (4 hafta)	IL-1β IL-6 TNF-α	NLRP3 Kaspaz-1 NF-κB	IL-1β (serum ve prefrontal korteks)	(Liu ve ark., 2017)
KÖHS (4 hafta)	NLRP3 ^{-/-} Fare NLRP3 ^{+/-} + Fare	Hipokampus	NLRP3 NF-κB	IL-1β	-	-	NLRP3 NF-κB	IL-1β (serum ve hipokampus)	(Su ve ark., 2017)
KÖHS (3 hafta)	Sıçan	Hipokampus	NLRP3 Kaspaz-1 ASC	IL-1β	P2X7 reseptör antagonistleri BBG ve A438079 (yalnızca depresif davranışlar üzerindeki etkisi yönünden çalışılmıştır.)	-	NLRP3 Kaspaz-1 ASC IL-1β	-	(Yue ve ark., 2017) ⁵

⁵Çalışmada NLRP3 protein düzeyinin stres grubunda kontrole göre anlamlı ölçüde değişmediği gösterilmiştir. Ancak anti-ASC ile ko-immünpresipitasyon yapıldığında ‘aktif NLRP3’ olarak yorumlanan NLRP3 düzeylerinin stres ile arttığı gösterilmiştir.

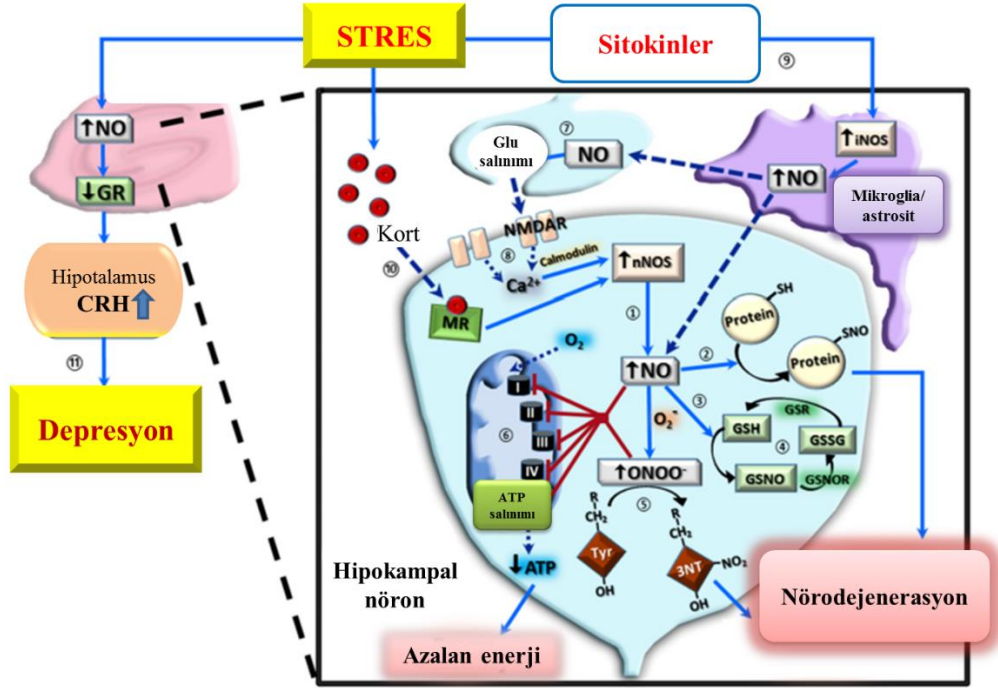
Tablo 2. NLRP3 inflamazomu aktivasyonunun gösterildiği stres ve depresyon çalışmaları (devam).

Model/Hastalık	Denek	Doku tipi	Araştırılan inflamazom bileşeni	Araştırılan sitokin	Etkili molekül	Yöntem			Kaynak
						PCR	Western blot	ELISA	
Bakteriyel LPS uygulaması	Fare	Hipokampus	NLRP3 Kaspaz-1 ASC	IL-1 β IL-18 TNF- α IL-10	Kaspaz-1 inhibitörü (Ac-YVAD-CMK);	-	NLRP3 Kaspaz-1 ASC	IL-1 β IL-18 TNF- α IL-10 (serum ve hipokampus)	(Zhu ve ark., 2017)
ATP uygulanan THP-1 hücre hattı	İn vitro	-	NLRP3	IL-1 β IL-18	Fluoksetin, paroksetin, mirtazapin, venlafaksin, desvenlafaksin, agomelatin, amitriptilin, imipramin	-	NLRP3 IL-1 β	IL-1 β IL-18	(Alcocer-Gomez ve ark., 2017)
Majör depresyon hastaları	İnsan	Periferal kan mononükleer hücreleri	NLRP3	IL-1 β IL-18	Fluoksetin, paroksetin, mirtazapin, venlafaksin, desvenlafaksin, agomelatin, amitriptilin, imipramin	NLRP3	-	IL-1 β IL-18	(Alcocer-Gomez ve ark., 2017)

4.4. Depresyon ve Nitriderjik Sistem

MSS’de yaygın fonksiyonlar üstlenen atipik yapıda nörotransmitter ve nöromodülatör olan NO; L-arjininden NOS enzimi aracılığıyla sentezlenmektedir. NOS enziminin doku veya hücre tipine göre ekspresyonları farklılık gösteren ve temel olarak buna göre sınıflandırılan üç izoformu bulunmaktadır (Montezuma ve ark., 2012). Bunlar; nNOS, iNOS ve eNOS izoenzimleri olup; üç izoenzimin de MSS’de eksprese olduğu bilinmektedir. nNOS ve eNOS izoenzimleri beyinde yapısal olarak bulunmakta ve aktiviteleri kalsiyum/kalmoduline bağımlı olarak düzenlenmektedir (Dhir ve Kulkarni, 2011). Beyinde en fazla ve yaygın eksprese olan nNOS izoenzimi glutamaterjik NMDA reseptör kanalının açılması ve kalsiyumun hücre içine girmesi ile aktive edilmektedir (Chen ve ark., 2015). Yapısal izoenzimlerden farklı olarak iNOS enziminin aktivasyonu kalsiyum/kalmodulin bağımsız olarak düzenlenmekte ve bazal fizyolojik koşullar altında az eksprese olduğu bilinmektedir. Temel olarak makrofaj ve glial hücrelerde bulunan iNOS enziminin ekspresyonu; immün sataşma veya inflamatuvar uyaranlar varlığında *de novo* sentez yoluyla düzenlenmektedir (Dhir ve Kulkarni, 2011).

Nitriderjik sistemin depresyon patofizyolojisinde rol oynayan önemli mekanizmalardan biri olduğu kabul edilmektedir (Kudlow ve ark., 2016) (Şekil 20). Bu sistemde L-arjinin/NOS/NO sinyal yolağında meydana gelen aşırı aktivasyonun; nitrozatif ve oksidatif stres yanıtlarını başlatarak, kronik stres ve depresyon tablosunda görülen nöronal hasar ve nöroinflamasyon süreçlerine katkıda bulunduğu düşünülmektedir (Chen ve ark., 2015; Dhir ve Kulkarni, 2011; Kudlow ve ark., 2016). Kronik stres maruziyetinin artmış reaktif oksijen ve NO radikalleri ile ilişkili bulunduğu, bunun antioksidan savunma sistemlerinin yetersiz kaldığı bir oksidatif ve nitrozatif stres tablosuna yol açtığı gösterilmiştir (Gawali ve ark., 2017). Bununla ilişkili olarak çeşitli stres modelleri ve depresyonda NOS ekspresyon değişimleri rapor edilmiştir (Madrigal ve ark., 2001; Peng ve ark., 2012; Zlatkovic ve Filipovic, 2013).



Şekil 20. Stres ve depresyonda nitriderjik sistemin rolü. MSS’de NO üretiminden temel sorumlu enzim nNOS izoenzimidir (1). NO düzeyi arttığında, çeşitli proteinlerin ve glutatyonun tiyol gruplarına (protein-SH) kovalent olarak bağlanır (2,3) ve bu bağlanma sonucu S-nitrozoproteinleri ve S-nitrozoglutatyon oluşumları meydana gelir (4). NO’nun diğer taraftan süperoksit radikali (O_2^-) ile hızlı reaksiyona girmesiyle nörotoksik özellikteki peroksinitrit ($ONOO^-$) radikali meydana gelir. Peroksinitrit ise proteinlerin tirozin rezidüleri (Tyr) ile etkileşerek 3-nitrotirozin türevlerinin oluşmasından sorumludur (5). Bu nitrozillenme ve nitrotirozinlenme reaksiyonları NO’nun nörotoksik ve beraberinde gelişen nörodegeneratif etkileri ile yakından ilişkilidir. NO ve peroksinitrit düzeylerinin artması; hücrenin elektron transport zincirinin ve enerji kullanımının bozulmasına yol açar (6). Gerek post-sinaptik nNOS gerekse glial hücrelerde iNOS aracılığıyla oluşan NO pre-sinaptik nörona difüze olarak bir nörotransmitter/nöromodülatör işlevi görür ve pre-sinaptik nörondan glutamat salınımını artırır (7). Glutamat düzeylerinin yükselmesi post-sinaptik NMDA reseptörlerinin aktivasyonuna ve hücre içi Ca^{+2} konsantrasyonunun artmasına neden olur. Bu da kalmodulin varlığında NO üretimini daha da artırır (8). Stresle artan inflamatuvar sitokinlerin ve HPA eksen hiperaktivitesinin NO düzeylerini artırdığı bilinmektedir (9,10). NO’nun artması ise hipokampal glukokortikoid reseptörlerinde downregülasyona neden olarak HPA eksen aktivitesi ve inflamasyon yanıtlarının daha da şiddetlenmesine yol açmaktadır. Bu ilişkinin depresyonun gelişmesinde önemli rol oynadığı düşünülmektedir (11). Nitrik oksit; NO, nitrik oksit sentetaz; NOS, nöronal NOS; nNOS, indüklenebilir NOS; iNOS, glukokortikoid reseptör; GR, kortikosteroid; Kort, mineralokortikoid reseptör; MR, kortikotropin salıverici hormon; CRH, glutamat; Glu, NMDA reseptörü; NMDAR (Chen ve ark., 2015).

Yapılan deneysel çalışmalarda seçici veya seçici olmayan çeşitli NOS enzimi inhibitörlerinin antidepresan-benzeri etkiler meydana getirdiği gösterilmiştir (Wegener ve Volke, 2010). Bu kapsamda seçici olmayan NOS inhibitörü N^G-nitro-L-arjinin metil esteri (L-NAME), seçici nNOS inhibitörlerinden 7-nitroindazol ve aminoguanidin başta olmak üzere çeşitli iNOS inhibitörlerinin akut veya kronik antidepresan etki potansiyellerine dikkat çekilmiştir (Chen ve ark., 2015; Dhir ve Kulkarni, 2011; Wegener ve Volke, 2010). Ayrıca günümüzde kullanılan mevcut antidepresan ilaçlardan SSRI grubundan paroksetin başta olmak üzere bazı üyelerin NOS inhibisyonu meydana getirdiği gösterilmiş ve buradan hareketle NO sinyal yolağı modülasyonunun antidepresan etki mekanizmasında rol oynayabileceği fikri güçlenmiştir (Chen ve ark., 2015; Finkel ve ark., 1996; Wegener ve Volke, 2010). NOS inhibitörlerinin klasik antidepresan ilaçlarla ortaya çıkan nörotransmitter ve reseptör düzeyindeki etkilere benzer nörobiyolojik değişimler meydana getirdiği de farklı çalışmalarca ifade edilmektedir. Örneğin hipokampus bölgesinde sinaptik aralıktaki serotonin ve dopamin düzeylerinin NOS inhibitörleri ile yükseldiği, diğer taraftan L-arjinin uygulaması ile ilgili nörotransmitter seviyelerinin azaldığı gösterilmiştir. Bunların yanında NOS inhibitörlerinin serotonerjik antidepresan ilaçlar ile elde edilen farmakolojik yanıtı güçlendirebileceğine ilişkin çalışmalar söz konusudur (Dhir ve Kulkarni, 2011).

Depresyonda glutamat ve nörotoksik bileşikler aracılı artmış NMDA reseptör trafiği göz önünde bulundurulduğunda, nitriderjik sistemin depresyon patogenezindeki önemine dikkat çeken bir diğer yaklaşım da başta NMDA reseptör antagonisti ketamin ile elde edilen antidepresan etkilerdir. Yakın tarihte gerçekleştirilen bir çalışmada ketaminin antidepresan etkilerinde NO sinyal yolağı modülasyonunun kısmen rol oynadığı gösterilmiş ve bu kapsamda nitriderjik sistemin depresyon patogenezindeki önemine bir kez daha dikkat çekilmiştir (Liebenberg ve ark., 2015).

Nitriderjik sistem ve depresyon arasındaki söz konusu ilişkiden yola çıkılarak; özellikle son dönemde depresyonda inflamasyon yanıtlarının düzenlenmesinde NO sinyal yolağı modülasyonunun potansiyel değeri gündeme gelmiştir (Kudlow ve ark., 2016; Tomaz ve ark., 2014).

4.5. Agmatin

Agmatin (4-aminobütilguanidin), L-arjinin aminoasidinin arjinin dekarboksilaz (ADK) enzimi aracılığıyla dekarboksillenmesi ile oluşan poliamin yapıda bir maddedir (Ramani ve ark., 2014). İlk kez 1910 yılında Alman araştırmacı Albrecht Kossel tarafından ringa balığı spermindeki keşfinden sonra izleyen yıllarda agmatinin bakteri, bitki ve omurgasızlar olmak üzere doğada yaygın bulunan bir biyolojik amin olduğu gösterilmiştir (Tabor ve Tabor, 1984). Keşfinden yarım asrı aşkın bir süre sonrasına kadar agmatin ve sentezinden sorumlu ADK enziminin memelilerde de eksprese edildiği bilinmemektedir. 1994 yılında Li ve arkadaşlarının imidazolin reseptörlerine endojen ligand arayışları çerçevesinde gerçekleştirdikleri çalışmaları; memelilerde endojen agmatinin keşfine sebebiyet vermiştir (Li ve ark., 1994). İlgili çalışmada sığır beyninden izole edilen bir molekülün imidazolin ve α -2 adrenerjik reseptörlerine bağlandığı gösterilmiş; 'klonidinin yerini alan madde (clonidine-displacing substance)' olarak adlandırılan bu molekülün kütle spektroskopisi ile dekarboksile arjinin; agmatin olduğu ilk kez gösterilmiştir (Li ve ark., 1994). Aynı çalışmada agmatin yanında sentezinden sorumlu ADK enziminin de memeli beyinde eksprese edildiği ilk kez gösterilmiştir. 90'lı yılların başındaki bu keşiften sonra agmatinin gerek reseptör gerekse enzim düzeyinde çeşitli fizyolojik etkileri aydınlatılmış ve beyinde nörotransmitter/nöromodülatör olabileceği fikri ortaya atılmıştır (Reis ve Regunathan, 1999; Reis ve Regunathan, 2000). Günümüze kadar olan 20 yılı aşkın süreçte agmatinin aralarında depresyon gibi duygudurum bozuklarının da bulunduğu çeşitli psikiyatrik hastalıklarda ve MSS ile ilişkili çeşitli patolojilerde potansiyel terapötik değeri olabileceğine yönelik çalışmalar giderek hız kazanmıştır (Piletz ve ark., 2013).

4.5.1. Ekzojen kaynakları

Memelilerde endojen agmatinin ancak bir kısmının enzimatik yolla *de novo* sentezi ile elde edildiğinden bahsedilebilir (Molderings ve ark., 2003b; Raasch ve ark., 2001). Nitekim, fizyolojik agmatin düzeyleri büyük oranda bağırsak mikrobiyotası ve agmatin içeren besinlerin diyet yoluyla vücuda alınmasıyla gastrointestinal yolla

bağırsaklardan absorpsiyon sonucu sağlanmaktadır (Galgano ve ark., 2012; Haenisch ve ark., 2008; Molderings ve ark., 2003b).

Gastrointestinal lümendeki yüksek agmatin içeriğinin üç temel kaynağı olduğu bilinmektedir. Bunlardan birincisi; fizyolojik bağırsak mikroflorasıdır. Fizyolojik bağırsak mikroflorasında bulunan *Bacteroides vulgatus*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus acidophilus*, *Veillonella dispar* ve *E. coli Nissle* gibi yararlı bakterilerin yapılarında yüksek oranda agmatin bulundurdıkları ve ortama agmatin salgıladıkları gösterilmiştir (Haenisch ve ark., 2008). *Bacteroides* ailesinin diğer bazı üyelerinin (*Bacteroides fragilis*, *Bacteroides thetaiotaomicron*) ve bağırsakta yerleşim gösteren bir diğer yararlı bakteri türü olan *Bifidobacterium bifidum*'un da bahsi geçen ilk bakteri ailelerine kıyasla daha az düzeyde ancak yine de önemli miktarlarda agmatin içerdiği rapor edilmiştir (Haenisch ve ark., 2008). Yararlı bakterilerin dışında yüksek oranda agmatin içeren ve salgılayan patojen bakterilerden biri de *Helicobacter pylori*'dir (Molderings ve ark., 2003b). Gastrointestinal lümendeki agmatin içeriği ikinci olarak; agmatin içeren besinlerin diyet yoluyla vücuda alınması ve sindirim kanalına ulaşmaları sonucu sağlanmaktadır. Bazı besinlerin agmatin içerikleri Tablo 3'te gösterilmiştir (Galgano ve ark., 2012; Molderings ve ark., 2003b) (Tablo 3).

Agmatin balık ve deniz ürünleri başta olmak üzere, en fazla et ürünleri ile mayalı gıda ve içeceklerde bulunmaktadır. Agmatinin özellikle mikrobiyal aktivite ile ilişkili fermentasyon süreçlerinin eşlik ettiği işlenmiş et ürünlerinde ve fermente besinlerde (bira, şarap, sake gibi) yüksek oranda bulunduğu bilinmektedir (Galgano ve ark., 2012). Besin ve bağırsak mikrobiyotası dışında gastrointestinal lümendeki bir diğer agmatin kaynağı ise deskuamöz gastrointestinal epitel hücreleri olup; luminal agmatin düzeyi üzerindeki etkisinin görece az olduğu düşünülmektedir (Benamouzig ve ark., 1997).

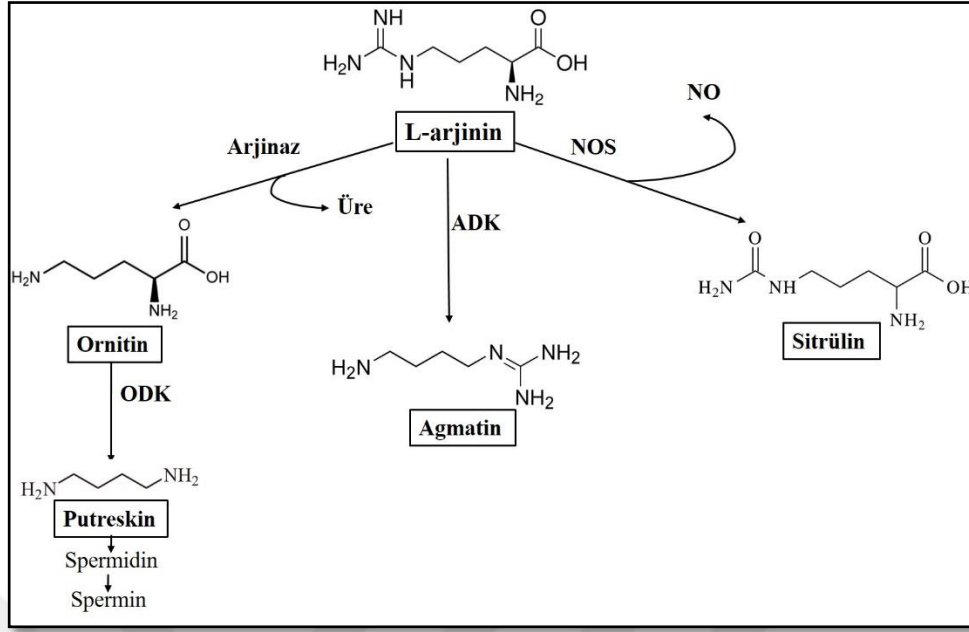
Tablo 3. Agmatin içeren bazı besin kaynakları (Molderings ve ark., 2003b).

Besin	Agmatin içeriği	Besin	Agmatin içeriği
Balık		Et	
Taze balık	≤20 mg/kg	Domuz eti	≤1,5 mg/kg
Tuzlanmış ringa balığı	217 mg/kg	Sığır eti	≤2,5 mg/kg
Dikenli çütre balığı	112 mg/kg	Tavuk eti	≤7 mg/kg
		İşlenmiş et ürünleri	
Konserve ançuez	62 mg/kg	(sosis, jambon)	≤10 mg/kg
Konserve sardunya	80 mg/kg	Alkollü içecekler	
Kabuklu deniz ve balık ürünleri		Bira	≤15 mg/l
Tuzlanmış kalamar	650 mg/kg	Sake	114 mg/l
Deniz kabuğu	2-224 mg/kg	Kırmızı şarap ⁺	*-22 mg/l
Alaska kömür balığı		Beyaz şarap ⁺	*-6,5 mg/l
havyarı	73 mg/kg	Likör	*
Niştastalı Besinler		Alkolsüz içecekler	
Pirinç	*	Çay	*
Mısır	*	Kavrulmuş kahve	*-1,2 mg/kg
Buğday unu	0,5-82 mg/kg	Hazır kahve	0,4-5,3 mg/kg
Patates	*	Sebzeler	
Süt ve yumurta ürünleri		Ispanak	≤1 mg/kg
Tavuk yumurtası	*	Soya fasülyesi	*
İnek sütü	≤0,2 mg/kg	Havuç	*
Yoğurt	≤0,4 mg/kg	Mantar	*
Peynir	*	Patlıcan	*
Eski peynir	≤30 mg/kg		

* Miktarı tayin edilemeyen düzeyleri ifade etmektedir. ⁺ Galgano ve ark. (2012)'den alınmıştır (Galgano ve ark., 2012).

4.5.2. Biyosentezi ve metabolizması

Organizmada endojen agmatin sentezi esansiyel bir aminoasit olan L-arjinin'den ADK enzimi aracılığıyla gerçekleşmektedir. Arjinin ayrıca NOS enzimi ile NO ve sitrülün; arjinaz enzimi ile ornitin ve poliaminlerin sentezlerinde de öncü madde olarak fonksiyon göstererek, bahsi geçen 3 özgül metabolik yolakta ilgili maddelerin sentezlerinde temel basamakta yer almaktadır (Satriano, 2003; Satriano, 2004) (Şekil 21).



Şekil 21. L-arjinin metabolizması. L-arjininden köken alan 3 farklı metabolik yola ile agmatin, NO ve poliamin sentezleri gerçekleşmektedir. Arjinin dekarboksilaz; ADK, nitrik oksit; NO, nitrik oksit sentetaz; NOS, ornitin dekarboksilaz; ODK.

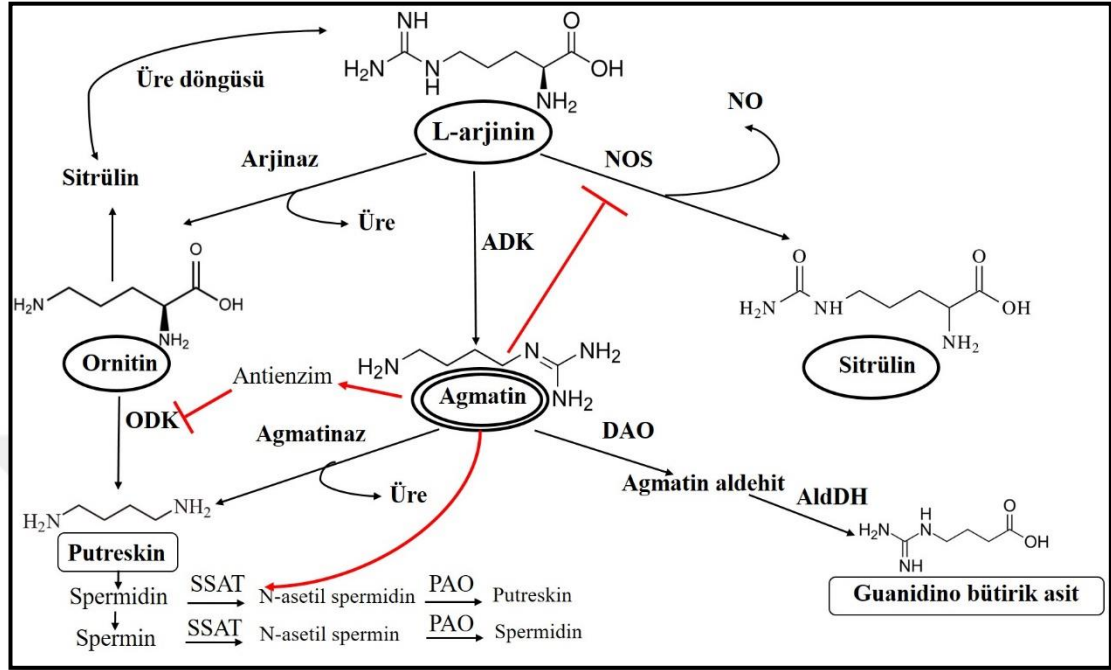
Arjininden köken alan ve poliamin sentez yolağını katalize eden enzim arjinaz enzimidir. Bu yolağın ilk basamağında arjinin arjinaz enzimi ile ornitine; oluşan ornitin de ornitin dekarboksilaz (ODK) enzimi ile alifatik poliaminlerin öncülü putreskine dönüşmektedir. Bu dönüşüm poliamin sentezinde birinci basamak reaksiyonudur. Putreskin oluşumunu spermidin ve spermin olmak üzere diğer iki poliamin sentezi izler. Böylelikle putreskinden spermidin sentaz ile spermidin; spermidinden de spermin sentaz ile spermin poliaminleri meydana gelir. Poliamin sentezinin bahsi geçen her iki basamağı da S-adenozil-S-metil-homosisteamin'in aminopropil donörü olarak reaksiyona katılmasıyla gerçekleşir. Poliaminler fizyolojik pH'da hidrofilik özellik gösteren polikasyonik moleküller olup vücutta yaygın olarak bulunurlar. Polikasyonik yapıları gereği hücrede DNA, RNA ve fosfolipitler gibi polianyonik moleküllerle etkileşerek organizmada yaygın biyolojik fonksiyonlar gösterirler (Ramani ve ark., 2014). Poliaminler DNA stabilizasyonu ve konformasyonu, hücre içi sinyal iletimi, gen transkripsiyonu, çeşitli iyon kanallarının fonksiyonlarının düzenlenmesi, sindirim sistemi fonksiyonları, bağışıklık, yara iyileşmesi, hücre proliferasyonu gibi çok geniş yelpazede fizyolojik fonksiyonlara

sahiptir (Ramani ve ark., 2014). Poliaminler oksidasyon ve/veya asetilasyon reaksiyonlarına uğrayarak katabolize edilirler. Putreskin diamin oksidaz (DAO) enzimi aracılığıyla oksidasyona uğrayarak gama-amino-bütirik asit (GABA)'e dönüşür. Spermidin ve spermin; spermidin/spermin asetil transferaz (SSAT) enzimi ile N-asetilasyona uğrayarak sırasıyla N-asetilspermidin ve N-asetilspermin'e; N-asetil formları da poliamin oksidaz enzimi ile oksidasyona uğrayarak yeniden putreskine çevrilir. Spermidinden farklı olarak spermin asetilasyon reaksiyonuna maruz kalmaksızın direkt oksidasyona da uğrayabilmektedir. SSAT enzimi poliamin katabolizmasında ve dolayısıyla hücre poliamin homeostazının sağlanmasında kritik öneme sahiptir (Ramani ve ark., 2014).

Arjininden sentezlenen bir diğer poliamin yapıdaki madde olan agmatin diğer poliaminlerden farklı bir sentez yolağı üzerinden; ADK enzimi aracılığıyla sentezlenir (Grillo ve Colombatto, 2004). Agmatin; diğer poliaminlerin sentez ve metabolizmasını kontrol etmesi açısından poliamin homeostazının düzenlenmesinde fonksiyonel bir öneme sahiptir (Şekil 22) (Piletz ve ark., 2013). Poliaminler üzerinde agmatin aracılı gerçekleşen söz konusu düzenleme kısmen agmatinin metabolizması ile ilişkilidir. Agmatin metabolizmasında agmatinaz ve DAO olmak üzere 2 farklı enzim rol oynamaktadır. Agmatinaz enzimi temel olarak beyinde; DAO enzimi ise periferik yapılarda agmatinin yıkılmasından sorumludur (Gilad ve ark., 1996; Lortie ve ark., 1996). Agmatin beyinde agmatinaz enzimi ile poliaminlerin ve ayrıca nörotransmitter GABA'nın öncü maddesi olan putreskine dönüşür (Gilad ve ark., 1996; Molderings ve Haenisch, 2012). Dolayısıyla beyinde agmatin metabolizması kısmen poliamin sentezine aracılık etmektedir. Diğer taraftan karaciğer, böbrek gibi periferik yapılarda agmatin DAO enzimi ile oksidasyona uğrayarak guanidinobütiralaldehit'e dönüşür. Aldehit dehidrojenaz enzimi aracılığıyla guanidinobütiralaldehit'ten son ürün olan guanidinobütirik asit şeklinde böbreklerden itrah edilir (Şekil 22) (Lortie ve ark., 1996).

Agmatinin poliamin sistemi üzerindeki düzenleyici rolü yalnızca agmatinaz üzerinden putreskine dönüşümü; dolayısıyla poliamin sentezine katkıda bulunması ile

sınırlı değildir. Aksine agmatin büyük oranda poliamin yanıtlarının azaltılması ve kontrol edilmesi ile ilişkili rol üstlenmektedir.



Şekil 22. Agmatin metabolizması, poliaminler ve NO. Arjinin dekarboksilaz; ADK, aldehit dehidrojenaz; AldDH, diamin oksidaz; DAO, nitrik oksit; NO, nitrik oksit sentetaz; NOS, ornitin dekarboksilaz; ODK, spermidin/spermin asetil transferaz; SSAT, poliamin oksidaz; PAO.

Agmatin; poliamin sentezinin ilk basamağında görev alan ODK enzimine bağlanan ve enzimi inaktive eden özel bir protein olan antienzimi aktive ederek poliamin sentezini ilk basamakta, enzim aktivitesi üzerinden azaltır (Şekil 22) (Satriano, 2004). İkinci olarak agmatin poliaminlerin N-asetilasyona maruz kalarak yıkımından sorumlu olan SSAT enzimini indükleyerek poliamin metabolizmasını hızlandırır (Şekil 22) (Ramani ve ark., 2014). Diğer taraftan kendisi de bir poliamin olan agmatin diğer poliaminler ile poliamin transport sistemleri için yarışarak hücre içi poliamin düzeyinin, dolayısıyla poliamin yanıtlarının azaltılmasında rol oynamaktadır (Satriano, 2004).

Arjininden köken alan diğer sentez yolağı olan NOS aracılı NO ve sitrülin oluşumu da agmatinin kontrolü altındadır (Şekil 22). Agmatin NO oluşumunu 2 temel mekanizma ile azaltmaktadır: i) nNOS ve iNOS enziminin agmatin tarafından direkt

inhibisyonu (Demady ve ark., 2001; Regunathan ve Piletz, 2003). ii) agmatinden DAO enzimi ile oluşan metaboliti agmatin aldehit'in NOS aktivitesini agmatinden daha potent bir biçimde inhibe etmesi (Satriano ve ark., 2001). DAO aracılı gerçekleşen NOS inhibisyonu periferik yapılarda gözlenen bir mekanizma olup beyinde NO sentezinin agmatin aracılı azaltılmasına eşlik ettiği düşünülmemektedir (beyinde agmatin metabolizması temel olarak agmatinaz enzimi aracılığı ile gerçekleşmektedir.). nNOS ve iNOS üzerindeki inhibitör etkisinin aksine; agmatinin eNOS aktivitesini indüklediği bilinmektedir (Mun ve ark., 2010).

Agmatinin arjininden köken alan diğer iki metabolizma yolağı olan NO ve poliamin sentezini yukarıda açıklanan mekanizmalar aracılığıyla kontrol etmesi; organizmada poliamin stres yanıtının düzenlenmesindeki kritik rolünü gündeme getirmiştir (Gilad ve ark., 2001; Satriano, 2004). Poliamin stres yanıtı; organizmada inflamasyon, travmatik stres ya da hasar gibi herhangi bir stres uyarana karşı hücresel düzeyde geliştirilen adaptif ve koruyucu bir yanıt olup; erken evrede, saniye veya dakikalar içinde meydana gelen NO sentezinin artması ve bunu izleyen dakika veya saatler içerisinde geçici poliamin sentezinin artması ile karakterizedir (Gilad ve ark., 2001; Piletz ve ark., 2013; Satriano, 2004). Ancak aşırı NO/poliamin oluşumu organizmada uygun olmayan arjinin kullanımı, nitrözatif stres ve hücre ölümüne yol açarak maladaptif bir yanıtla dönüşebilmektedir. Bu yönüyle organizmada poliamin stres yanıtının sıkı bir biçimde kontrol edilmesi ve düzenlenmesi büyük önem taşımaktadır. Bu da temel olarak agmatin ile sağlanmaktadır (Satriano, 2004).

4.5.3. Kinetik profili

Özellikle 2000'li yılların başlarında yapılan in vitro ve in vivo radyoaktif işaretleme çalışmaları; agmatinin biyolojik membranlardan geçiş, absorpsiyon ve dağılım gibi kinetik profiline büyük ölçüde ışık tutmuştur (Molderings ve ark., 2001; Molderings ve ark., 2003b; Molderings ve ark., 2002).

Fizyolojik pH'da katyon yüklü bir molekül olan agmatinin biyolojik membranlardan geçişi agmatine özgü taşıyıcı sistemler aracılığıyla sağlanabilmektedir (Molderings ve ark., 2001; Molderings ve ark., 2003a; 2003b). Agmatin oral yoldan

alındığında gastrointestinal sistemde mide ve bağırsaklardan taşıyıcı aracılı absorbe edilerek vücuda yaygın olarak dağılmaktadır (Molderings ve ark., 2003b). Agmatinin KBB'yi geçebildiği ve enterohepatik siklusa girdiği gösterilmiştir (Molderings ve ark., 2003; Piletz ve ark., 2003). Oral yoldan radyokarbon (^{14}C) ile işaretlenmiş agmatin verilen sıçanlarda organ ve dokulardaki radyoaktivite düzeyleri incelenmiş; agmatinin en yüksek oranda (67 ± 7) karaciğerde toplandığı, idrarda yoğun ve kanda ise düşük radyoaktiviteye rastlandığı gösterilmiştir (Molderings ve ark., 2002). Kandaki düşük agmatin radyoaktivitesinin dokularda yerleşim gösteren agmatin transport sistemleri ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. Plazma agmatin konsantrasyonunun görece düşük ve tespit edilebilen değerin altı ($<0,1$ ng/ml) ile 5,8 ng/ml arasında değişkenlik gösterdiği rapor edilmiştir (medyan değer: 0,33ng/ml). Agmatin büyük oranda glomerüler filtrasyon yoluyla kan dolaşımından arındırılarak böbrekler yoluyla itrah edilmektedir (Molderings ve ark., 2002).

Agmatinin vücuttaki yazgısı büyük oranda bulunduğu doku veya organa bağlıdır. Böbrek ve karaciğerde agmatin metabolizması temel olarak DAO enzimi ile guanidinobütiraldehit'e dönüşümü şeklinde gerçekleşmektedir. Hepatosit hücrelerinde agmatinin metabolizmasının incelendiği bir çalışmada %50'sinin DAO enzimi aracılı guanidinobütiraldehit'e dönüştürüldüğü; %30'unun değişmeden kaldığı; %10'unun putreskin, spermidin poliaminlerine çevrildiği; %1'inin GABA'ya dönüştürüldüğü gösterilmiştir (Cabella ve ark., 2001). DAO enzim inhibisyonunun plazma agmatin düzeyini iki kata kadar artırdığı bilinmektedir. Dolayısıyla periferik yapılarda agmatinin metabolizmasından genel olarak DAO enzimi sorumludur. Diğer taraftan beyinde agmatin agmatinaz enzimi ile metabolize edilmektedir (Haenisch ve ark., 2008; Molderings ve ark., 2003).

4.5.4. Vücuttaki dağılımı

Agmatin organizmada beyin, periferik organlar ve plazmada yaygın dağılım göstermektedir. Yetişkin erkek Sprague Dawley sıçanlarda agmatinin vücuttaki dağılımı incelenmiş; en yüksek konsantrasyonda midede olmak üzere sırasıyla aort,

ince ve kalın barsak, dalak, akciğer, adrenal bez, böbrek, kalp, karaciğer, iskelet kası, beyin, testis ve plazmadaki varlığı gösterilmiştir (Tablo 4) (Raasch ve ark., 1995).

Tablo 4. Agmatinin doku dağılımı. Doku konsantrasyonları ng/g ıslak doku üzerinden ortalamanın $\pm$ standart hatası şeklinde gösterilmiştir (Raasch ve ark., 1995).

Doku	Agmatin (ng/g doku)
Mide	71,00 $\pm$ 10,33
Aorta	57,41 $\pm$ 12,74
İnce barsak	55,35 $\pm$ 9,39
Kalın barsak	27,86 $\pm$ 6,73
Dalak	17,38 $\pm$ 3,17
Akciğer	10,23 $\pm$ 2,82
Vas deferens	9,45 $\pm$ 2,08
Adrenal bez	6,97 $\pm$ 3,29
Böbrek	6,45 $\pm$ 1,40
Kalp	6,03 $\pm$ 0,79
Karaciğer	5,63 $\pm$ 0,87
İskelet kası	5,30 $\pm$ 0,72
Beyin	2,40 $\pm$ 0,60
Testis	2,04 $\pm$ 0,22
Plazma	0,45 $\pm$ 0,05

Raasch ve arkadaşlarının yaptıkları aynı çalışmada agmatinin doku dağılımı ayrıca erkek Long Evans sıçanlarında da incelenmiştir. Her iki suşta da agmatin yaygın doku dağılımı göstermesine karşın dağılım oranları bazı farklılıklar göstermiştir. Sprague Dawley sıçanlarda agmatin en fazla midede bulunurken Long Evans sıçanlarda en yüksek konsantrasyon adrenal bezde gözlenmiş ve bunu mide izlemiştir (Raasch ve ark., 1995).

2003 yılında Piletz ve arkadaşları tarafından fare ve primatlar üzerinde yapılan çalışmada periferik yoldan uygulanan agmatinin KBB'yi geçtiği ilk kez gösterilmiştir (Piletz ve ark., 2003). İlgili çalışmada agmatin farelere 10, 50 ve 300 mg/kg dozlarında intraperitoneal (i.p.) yolla uygulanmış; beyin dokusunda agmatin düzeyleri

enjeksiyondan 1 ve 3 saat sonra ölçülmüştür. Agmatin uygulamasından 3 saat sonra farelerin beyin agmatin seviyeleri konsantrasyona bağlı bir biçimde yükselmiştir. Primatlarda ise agmatin 30 mg/kg dozunda i.v. olarak uygulanmış; plazma ve BOS içeriğinde agmatin konsantrasyonları zamana bağlı olarak ölçülmüştür. Enjeksiyondan 15 dakika sonra hem plazma hem de BOS agmatin konsantrasyonlarının maksimum düzeye ulaştığı gösterilmiştir. 43 ve 70. dakikalarda plazma ve BOS agmatin konsantrasyonu azalmaya başlamış; 196. dakikada ise bazal düzeyine geri dönmüştür. 15. dakikada maksimuma ulaşan agmatin konsantrasyonu plazmada 70,2 µM; BOS’da ise 11,3 µM olarak hesaplanmıştır (Piletz ve ark., 2003).

Aynı çalışmada i.v. arjinin (150 mg/kg) uygulamasından 43 dakika sonra BOS’taki agmatin düzeylerini kanda dolaşan agmatine kıyasla 22 kat fazla yükseltmesi; arjininin BOS’taki agmatin prekürsörü olarak işlev görebileceği şeklinde yorumlanmıştır. Arjinin uygulamasının 70. ve 196. dakikalarında sırasıyla BOS ve plazma agmatin konsantrasyonu bazal düzeylerine geri dönmüştür. Maksimum plazma agmatin konsantrasyonuna 70. dakikada erişilmiş ve 18,2 ng/ml (0,14 µM) olarak rapor edilmiştir. Diğer taraftan maksimum BOS agmatin konsantrasyonu 43. dakikada 286 ng/ml (2,2 µM) olarak hesaplanmıştır. Araştırmacılar ayrıca maymunlarda intraserebroventriküler (i.c.v.) agmatin uygulamasının (300 µg/kg) plazma ve intrasisternal agmatin düzeyleri üzerine etkilerini de incelemişlerdir. Uygulama sonrası 196. dakikada intrasisternal BOS’taki agmatin konsantrasyonu maksimum düzeyine ulaşmış (48,230 ng/ml; 371 µM) ve 24 saat boyunca yüksek seyretmiştir. Plazma agmatin konsantrasyonu ise uygulamanın 60. dakikası bazal değerlerin 3 katı kadar yükselerek maksimum düzeye erişmiş (65 ng/mL; 0,5 µM) ve 24 saat boyunca aynı düzeyde kalmıştır. Böylece dolaşımdaki agmatinin MSS’ye geçmesinin yanında MSS’de bulunan agmatinin de periferik dolaşıma transfer olabildiği gösterilmiştir (Piletz ve ark., 2003).

Piletz ve arkadaşlarının bahsi geçen çalışmaları ekzojen agmatinin çeşitli çalışmalarca önerilen MSS etkilerine temel dayanak teşkil etmesi açısından önem taşımaktadır. Söz konusu çalışma ile periferik yoldan uygulanan agmatinin MSS’ye geçtiği ve dolayısıyla MSS’de direkt etkiler oluşturabileceği hipotezi doğrulanmıştır.

Yapılan in vitro çalışmalarda agmatinin biyolojik etki oluşturan konsantrasyonlarının μM aralıkta olduğu gösterilmiştir. Örneğin agmatin μM konsantrasyonlarda nNOS'u inhibe edebilmektedir (Demady ve ark., 2001). Piletz ve arkadaşları da yaptıkları çalışmalarda periferik yoldan agmatin uygulanması ile beyin ve BOS'da agmatinin μM düzeylere erişildiğini ortaya koymuşlardır. İlgili çalışmada ayrıca agmatinin MSS'den periferik kan dolaşımına geçtiğinin de gösterilmesi dikkat çekicidir. Nitekim depresyon hastalarında beyindeki agmatin düzeylerinin plazma düzeylerine yansıdığı, tedavi öncesi ve sonrası değerlendirmelerle gösterilmiştir. Buna göre plazma agmatin düzeylerinin depresyonla yükseldiğı ve tedaviye yanıt alındıktan sonra normal düzeylerine döndüğü raporlanmıştır (Halaris ve ark., 1999).

Agmatinin MSS içerisindeki dağılımı bundan yaklaşık 20 yıl kadar önce yapılan immünohistokimyasal analizler ile ortaya konmuştur (Otake ve ark., 1998; Regunathan ve ark., 1995; Reis ve ark., 1998). Selüler ve subselüler düzeyde incelendiğine agmatinin beyinde genel olarak yaygın biçimde nöronal sitoplazma içerisinde bulunduğu gösterilmiştir (Reis et al., 1998; Otake et al., 1998). Nöronlar gibi astrositlerde de ADK enziminin eksprese edilmesine karşın astrositlerde daha düşük agmatin immünoaktivitesine rastlanmıştır; bunun da agmatinin astrosit hücresinde depolanmamasıyla ilişkili olabileceğı düşünülmüştür (Reis ve Regunathan, 2000).

Agmatinin beyinde selüler ve subselüler lokalizasyonu elektron mikroskopisi ile incelenmiş ve temel olarak hipokampal piramidal hücrelerde bulunduğu gösterilmiştir (Reis ve ark., 1998). Piramidal hücrelerde agmatin-benzeri immünoaktivite hücre sitoplazmasında perikarya, dendritler, akson ve akson terminallerinde gözlenmiştir. Perikaryada agmatin immünoaktivitesi mitokondri ve tübüler vezikülleri andıran yoğun kümeler halinde gözlenirken; akson ve akson terminallerinde küçük sinaptik veziküller şeklinde görülmüştür. Agmatinin küçük aksonal veziküller içerisinde bulunduğunun gösterilmesi ile agmatinin nörondan salıverilen bir madde olabileceğı düşünülmüştür (Reis ve ark., 1998).

Beyinde agmatinerjik nöronların yaygın olarak bulunduğu ve bölgesel dağılım gösterdikleri rapor edilmiştir (Li ve ark., 1994) (Tablo 5). Beyinde agmatinin en fazla *serebral korteks*, *hipotalamus* 'un spesifik bölgeleri, *talamus* orta hattı, *amigdala* ve alt

beyin sapı bölgelerinden *viseral nukleus*'da lokalize olduğunu ortaya koymuşlardır (Otake et al., 1998). *Serebral korteks*'de agmatin en yoğun olarak *V* ve *VI. laminalar*'da ve daha az oranda *III. lamina*, *retrosplenial*, *singulat*, birincil somatosensör ve işitme kortekslerinde lokalize olmaktadır. Alt beyin sapında agmatin ekspresyonuna özellikle *viseral nukleus*, *nukleus traktus solitarus*, *laterodorsal nukleus*, *locus coeruleus* ve *nukleus raphe dorsalis* bölgelerinde rastlanmaktadır. Ortabeyinde *ventral tegmental* alanlar ve *periakvaduktal gri maddede* yoğun agmatin immünoreaktivitesi gözlenmiştir. Önbeyinde preoptik bölge, *amigdala*, *septum*, *stria terminalis*, *talamus* 'un orta hattı ve *hipotalamus sub-kortikal* nöronlarda agmatinin yoğun olarak bulunduğu gösterilmiştir (Otake et al., 1998).

Tablo 5. Agmatinin beyin bölgelerindeki dağılımı. Doku konsantrasyonları ng/g doku üzerinden ortalamanın $\pm$ standart hatası şeklinde gösterilmiştir (Li ve ark., 1994).

Beyin Bölgeleri	Agmatin (ng/g doku)
Pons/Medulla	627 $\pm$ 84
Frontal korteks	433 $\pm$ 110
Midbrain	497 $\pm$ 90
Hipotalamus	481 $\pm$ 107
Hipokampus	348 $\pm$ 15
Serebellum	188 $\pm$ 45

Agmatinin beyin bölgelerindeki dağılımı göz önünde bulundurulduğunda agmatin aracılı gerçekleşen transmisyonun gerek santral gerekse sistemik bazı fizyolojik yanıtların oluşmasında rolü olabileceği düşünülmüştür. Örneğin *nukleus traktus solitarus* gibi alt beyin sapı bölgelerinde yoğun olarak bulunan agmatinerjik nöronlar ve bu nöronların yapmış oldukları projeksiyonlar agmatinin viseral sistemdeki olası nörotransmitter fonksiyonları şeklinde yorumlanırken; *serebral korteks*'den *rafe nukleus*, *locus coeruleus*, *subtalamik* ve *limbik* bölgelere projeksiyon yapan agmatinerjik nöronların davranış nörobiyolojisinde rol oynayabileceği düşünülmektedir. Nitekim agmatin strese karşı geliştirilen adaptif yanıtlar, duyugudurumun düzenlenmesi, ağrı, otonom ve nöroendokrin yanıtlarla ilişkili

subkortikal beyin bölgelerinde de yaygın lokalizasyon göstermektedir (Otake et al., 1998).

4.5.5. Temel etki mekanizması

4.5.5.1. Reseptör etkileşimleri

Agmatinin imidazolin reseptörlerinin endojen bir ligandı olarak reseptörlerin tüm alt tiplerine (I₁, I₂ ve I₃) ve α_2 -adrenerjik reseptörlere bağlandığı bilinmektedir (Piletz ve ark., 1995; Pinthong ve ark., 1995; Regunathan ve Reis, 1996). Agmatinin ayrıca glutamaterjik NMDA reseptörleri, nikotinik asetilkolin reseptörleri ve 5-HT₃ reseptörleri gibi katyon kanalı reseptörlerini bloke ettiği gösterilmiştir (Loring, 1990; Molderings ve ark., 1996; Reis ve ark., 1998).

İmidazolin reseptörlerinin keşfi 1980'li yılların sonlarına dayanmaktadır. Santral etkili antihipertansif bir ilaç olan klonidinin α_2 -adrenerjik reseptörler dışında bu reseptörlere de bağlandığının gösterilmesi ve klonidinin imidazolin yapısı taşımasından hareketle bu reseptörlere imidazolin reseptörleri adı verilmiştir (Ernsberger ve ark., 1987). Klonidinden sonra başka imidazolin türevlerinin (moksosidin vb.) ve imidazolin yapısı taşımayan diğer bazı moleküllerin de (guanabenz, rilmenidin vb.) reseptöre farklı afinitelerle bağlandığı gösterilmiştir (Farsang ve Kapocsi, 1999). İmidazolin yapısı taşımayan moleküllerin imidazolin reseptörlerine bağlanabilmesi, imidazolin reseptörlerine bağlanan hemen hemen tüm ilaçların aynı zamanda α_2 -adrenerjik reseptörlere de bağlanması ve imidazolin reseptörlerine özgü endojen bir ligand varlığının bilinmemesi; o dönemlerde imidazolin reseptörlerine ilişkin açıklanamayan hususlar olarak gösterilmiştir (Regunathan ve ark., 1996). 1994 yılında Li ve arkadaşlarının imidazolin reseptörlerine endojen ligand arayışları doğrultusunda agmatinin imidazolin ve α_2 -adrenerjik reseptörlerine bağlandığı ilk kez gösterilmiş ve bu yönüyle agmatinin; klonidinin yerini alan endojen bir molekül olabileceği öne sürülmüştür (Li ve ark., 1994). Ancak izleyen yıllarda yapılan çalışmalar agmatinin klonidinle oluşan santral ve periferik etkileri taklit etmediği gösterilmiştir (Sun ve ark., 1995). Agmatin α_2 -adrenerjik reseptörlere bağlanmasına karşın; söz konusu bağlanmanın pre- veya post-

sinaptik düzeyde herhangi bir agonist veya antagonistik etki meydana getirmediği gösterilmiştir (Pinthong ve ark., 1995).

Agmatinin sıçan hipokampal piramidal hücre kültüründe glutamaterjik NMDA reseptörlerini voltaj ve konsantrasyona bağlı olarak bloke ettiği gösterilmiştir (Yang ve Reis, 1999). İlgili çalışmada agmatinin NMDA reseptörlerini glutamaterjik AMPA (alfa-amino-3-hidroksi-5-metil-4-izoksazolpropiyonik asit) ve kainat reseptörlerini etkilemeksizin seçici olarak non-kompetitif bir şekilde bloke ettiği rapor edilmiştir. Hipokampal glutamaterjik piramidal nöronların yapılarında agmatini de içerdiklerinin gösterilmesi; agmatinin pre-sinaptik nöronda glutamat ile birlikte depolanıp salıverilen ve NMDA reseptörler üzerinden glutamatın etkisini frenleyen bir ko-transmitter molekül olabileceğini gündeme getirmiştir (Reis ve Regunathan, 2000; Reis ve ark., 1998). Agmatin ayrıca ligand kapılı katyon kanallarından nikotinik reseptörleri ve 5-HT₃ reseptörlerini bloke ettiği bilinmektedir (Loring, 1990; Molderings ve ark., 1996; Yang ve Reis, 1999). Agmatinin bağlandığı çeşitli reseptörler ve ilgili reseptörlere ait afinite bilgileri Tablo 6'da gösterilmiştir (Molderings ve Haenisch, 2012) (Tablo 6).

4.5.5.2. NOS inhibisyonu

Agmatinin nNOS ve iNOS'u L-arjinin substratı ile enzim üzerinden yarışarak inhibe ettiği gösterilmiştir (Abe ve ark., 2000; Auguet ve ark., 1995; Demady ve ark., 2001; Feng ve ark., 2002; Galea ve ark., 1996; Li ve ark., 1999; Regunathan ve Piletz, 2003; Satriano ve ark., 2001). Agmatin aracılı NOS inhibisyonu ilk kez 1995 yılında Auguet ve arkadaşları tarafından raporlanmıştır (Auguet ve ark., 1995). Bu çalışmada agmatinin izole sıçan aortu ve makrofaj hücrelerinde iNOS ve eNOS enzim aktivitesi üzerindeki etkileri incelenmiştir. Agmatinin eNOS aktivitesini değiştirmedeği ancak iNOS aktivitesini konsantrasyona bağımlı bir şekilde azalttığı gösterilmiştir (Auguet ve ark., 1995). Auguet ve arkadaşlarının çalışmasından 1 yıl sonra Galea ve arkadaşları beyin, endotel ve makrofaj hücrelerinde agmatinin üç farklı NOS izoformu (nNOS, eNOS ve iNOS) üzerine etkisini incelemişlerdir (Galea ve ark., 1996).

Tablo 6. Agmatinin çeşitli reseptör ve bağlanma bölgelerindeki K_i/IC_{50} değerleri . (K_i : inhibisyon sabiti IC_{50} : inhibitör konsantrasyon %50) (Molderings ve Haenisch, 2012).

Reseptör	Araştırılan doku/hücre tipi	K_i/IC_{50} değeri
α_2 -adrenerjik reseptör	Sıçan serebral korteksi	K_i 4 μ M
α_2 -adrenerjik reseptör	Sıçan serebral korteksi	K_i 7,9 $\pm$ 0,09 μ M
α_2 -adrenerjik reseptör	Sıçan serebral korteksi	K_i 12,1 $\pm$ 2,5 μ M
α_2 -adrenerjik reseptör	Sığır adrenal korteksi	K_i 11–20 μ M
α_2 -adrenerjik reseptör	Sığır adrenal korteksi	K_i 17,0 $\pm$ 7,5 μ M
α_{2A} -adrenerjik reseptör	İnsan rekombinant reseptörü	K_i 47 $\pm$ 2,6 μ M
α_{2B} -adrenerjik reseptör	İnsan rekombinant reseptörü	K_i 164.4 $\pm$ 21,4 μ M
α_{2C} -adrenerjik reseptör	İnsan rekombinant reseptörü	K_i 26,3 $\pm$ 4,0 μ M
I ₁ -imidazolin bağlanma bölgesi	Sığır ventrolateral medullası	K_i 0,7 μ M
I ₁ -imidazolin bağlanma bölgesi	Sığır adrenal medulla hücreleri	K_i 0,127 $\pm$ 0,033 μ M
I ₁ -imidazolin bağlanma bölgesi	İnsan platelet plazma membranı	K_i 0,033 $\pm$ 0,019 μ M
I ₁ -imidazolin bağlanma bölgesi	Sıçan mide membranları	K_i 0,098 μ M
I ₂ -imidazolin bağlanma bölgesi	Sıçan aorta düz kas hücreleri	K_i 0,24 $\pm$ 0,025 μ M
I ₂ -imidazolin bağlanma bölgesi	Sıçan total beyin membranları	K_i 417 $\pm$ 119 μ M
I ₂ -imidazolin bağlanma bölgesi	Sıçan mide membranları	K_i 266 μ M
I ₂ -imidazolin bağlanma bölgesi	Sığır adrenal kromaffin hücreleri	K_i 6,00 μ M
I ₂ -imidazolin bağlanma bölgesi	Sığır endotelial hücreleri	K_i 0,24 $\pm$ 0,025 μ M
I ₂ -imidazolin bağlanma bölgesi	İnsan platelet iç membranları	K_i 74,40 $\pm$ 14,2 μ M
I ₂ -imidazolin bağlanma bölgesi	İnsan atriyal uzantıları	K_i >100 μ M
I ₂ -imidazolin bağlanma bölgesi	Tavuk beyin membranları	K_i 0,63 μ M
I ₂ -imidazolin bağlanma bölgesi	Kurbağa beyin membranları	K_i 7,5 $\pm$ 2,6 μ M
I ₂ -imidazolin bağlanma bölgesi	Tavşan beyin membranları	K_i 856 $\pm$ 4 μ M
NMDA reseptörü, poliamin bağlanma bölgesi	Sıçan serebral korteksi	K_i 14,8 μ M
NMDA reseptörü, MK-801 bağlanma bölgesi	Sıçan serebral korteksi	K_i 219 μ M
NMDA reseptörü	Sıçan serebral membranları	K_i 50 μ M
NMDA reseptörü	Sıçan hipokampal nöronları	K_i ~200 μ M
5-HT ₃ reseptörü	Fare N1E-115 hücreleri	IC_{50} 708 μ M
5-HT ₃ reseptörü	Fare N1E-115 hücreleri	K_i >1000 μ M
Nikotinik reseptör	Tavuk retinası	IC_{50} >1000 μ M
σ_2 -bağlanma bölgesi	Sıçan mide membranları	K_i 668 μ M
σ_2 -bağlanma bölgesi	Fare N1E-115 hücreleri	IC_{50} >1000 μ M

Hücrel NOS aktivitesinin L-sitruilin ve nitrit oluşumu üzerinden değerlendirildiği çalışmada agmatinin konsantrasyon bağımlı olarak 3 NOS izoformunu da inhibe ettiği rapor edilmiştir. Agmatin uygulanan en yüksek konsantrasyonda iNOS ve nNOS enzim aktivitesinin tamamını inhibe ederken; eNOS enzim aktivitesini ancak %60 oranında inhibe edebildiği gösterilmiştir. K_i değerleri; iNOS için 218 $\pm$ 23 μ M; nNOS için 664 $\pm$ 107 μ M iken; eNOS için 7,5 $\pm$ 0,4 mM olarak bulunmuştur. Aynı çalışmada ornitin, putreskin, spermidin ve spermin poliaminlerinin de NOS aktivitesi üzerine etkileri incelenmiş; ancak agmatin dışında diğer poliaminlerin NOS aktivitesi üzerine etkili olmadığı rapor edilmiştir. Söz konusu

bulgularla agmatinin memelilerde endojen bir NOS inhibitörü olarak NO düzeylerini modüle edebileceği fikri ortaya atılmıştır (Galea ve ark., 1996).

İzleyen yıllarda yapılan çalışmaların sonuçları Galea ve arkadaşlarının eNOS aktivitesi bulgularını desteklememiştir (Morrissey ve Klahr, 1997; Mun ve ark., 2010). 1997 yılında Morrissey ve Klahr sığırdan izole edilen pulmoner arter endotel hücrelerinde agmatinin nitrit oluşumunu bazal düzeylere göre yaklaşık 3 kat artırdığını ve bu etkinin büyük olasılıkla eNOS aktivasyonu aracılığıyla ortaya çıktığını rapor etmişlerdir (Morrissey ve Klahr, 1997). Benzer şekilde insan umbilikal veninden izole edilmiş endotel hücrelerinde agmatinin NO sentezini artırdığı gösterilmiştir (Joshi ve ark., 2007). Daha yakın tarihte yapılan in vitro ve in vivo iskemik beyin hasarı modellerinde agmatinin eNOS aktivitesini arttırdığı gösterilmiş ve söz konusu etkinin agmatinin nöroprotektif etkilerinde rol oynayabileceği ileri sürülmüştür (Feng ve ark., 2002; Mun ve ark., 2010; Yang ve ark., 2007). Agmatinin mikrogial NO üretimini azalttığı; astroglia ve makrofaj hücrelerinde iNOS enzimini inhibe ettiği gösterilmiş ve bunun agmatinin antiinflamatuvar ve nöroprotektif etkilerine dayanak teşkil edebileceği düşünülmüştür (Abe ve ark., 2000; Regunathan ve Piletz, 2003). Dolayısıyla edinilen bulgularla agmatinin endojen iNOS ve nNOS inhibitörü olduğu; eNOS aktivitesini ise indükleyebildiği üzerinde yoğunlaşmıştır. Agmatinin NOS inhibitörü etkileri ile nöronal hasar, nöropatik ağrı, konvülsiyon, morfin yoksunluğu ve toleransı gibi bazı MSS patolojileri ilişkilendirilmiştir (Demehri ve ark., 2003; Feng ve ark., 2002; Li ve ark., 1999; Onal ve ark., 2003).

4.5.6. Biyolojik etkileri

Agmatinin vücutta çoğu MSS'de olmak üzere, periferde kardiovasküler, gastrointestinal ve endokrin sistemleri de kapsayan birçok etkisi aydınlatılmıştır. Santral etkili antihipertansif bir ilaç olan klonidinin etkilerinde α_2 -adrenerjik reseptörler yanında imidazolin reseptörlerinin de rol oynayabileceğinin gösterilmesiyle; imidazolin reseptör ligandı olan agmatinin kardiyovasküler sistemde çeşitli etkiler meydana getirebileceği düşüncesi gündeme gelmiştir (Molderings ve Haenisch, 2012). Sıçanlara i.v. yoldan verildiğinde agmatinin kan basıncını refleks

taşikardiye yol açmaksızın düşürdüğü ve kalp atım hızını yavaşlattığı çeşitli çalışmalarca gösterilmiştir (Gao ve ark., 1995; Raasch ve ark., 2002; Sun ve ark., 1995). Ancak söz konusu hipotansif etkinin görece hafif olduğu ve ancak yüksek agmatin dozlarında ortaya çıktığı bilinmektedir (Raasch ve ark., 2002). İn vitro çalışmalarda agmatinin endotel intakt veya hasarlanmış izole sıçan damar dokularında vasküler tonus üzerinde herhangi bir etki oluşturmadığı gösterilmiştir (Gonzalez ve ark., 1996; Pinthong ve ark., 1995; Raasch ve ark., 2002). Ancak ön kasılma uygulanmış izole damarlarda agmatinin damar kontraksiyonunu geçici olarak inhibe ettiği gösterilmiştir (Gonzalez ve ark., 1996; Haulica ve ark., 1999).

Agmatinin vücutta en yüksek konsantrasyonlarda midede bulunması; gastrik fonksiyonlar üzerindeki olası etkisini gündeme getirmiştir (Molderings ve Haenisch, 2012; Piletz ve ark., 2013). Daha erken dönemde yapılan çalışmalarda sistemik agmatin uygulamasının, diğer bazı imidazolin ve guainidin türevlerinde görüldüğü gibi gastrik asit sekresyonunu arttırdığı ve gastrik ülser veya hasar gibi süreçlerde rolü olabileceği ileri sürülmüştür (Glavin ve ark., 1995; Molderings ve ark., 1999a; 1999b; Utkan ve ark., 2000). Agmatin ve imidazolin türevlerinin enterokromaffin hücrelerden histamin salıverilmesini uyarak gastrik asit sekresyonunu arttırdıkları gösterilmiştir (Molderings ve ark., 1999b). Bir başka çalışmada agmatinin sıçanlarda etanol uygulaması ile oluşan gastrik mukoza hasarını arttırdığı rapor edilmiştir (Utkan ve ark., 2000). İlgili çalışmada agmatinin etkisinin imidazolin ve α_2 -adrenerjik reseptör antagonisti olan idazoksan varlığında tamamen; α_2 -adrenerjik reseptör antagonisti yohimbin varlığında ise kısmen önlendiği gösterilmiştir. Gastrik patojen *Helicobacter pylori*'nin yüksek miktarlarda agmatin ürettiği ve bulunduğu ortama salgıladığı gösterilmiş ve *Helicobacter pylori* (+) ülser hastalarının gastrik sıvılarında agmatin seviyesinin; *Helicobacter pylori* (-) hastalarına kıyasla daha yüksek miktarda bulunduğu tespit edilmiştir (Molderings ve ark., 1999a). Sözü edilen bulguların aksine yakın tarihte yapılan bir çalışmada agmatinin gastrik iskemi modelinde vasküler permeabiliteyi ve inflamatuvar yanıtları azaltarak gastroprotektif etki meydana getirdiği rapor edilmiştir (Al Masri ve El Eter, 2012). Söz konusu karışık bulguların literatürde kullanılan model ve agmatin dozları arasındaki farklılıklardan kaynaklanabileceği tartışılmış; agmatinin gastrik ülserasyon ya da hasar durumlarında

bir patojenik etken olmasından ziyade koruyucu bir rol üstlenebileceği öne sürülmüştür (Al Masri ve El Eter, 2012). Agmatinin böbreklerde glomerüler filtrasyon hızını artırdığı ve renal vazodilatasyon yaptığı gösterilmiştir (Schwartz ve ark., 1997). Agmatinin renal protektif etkilerinin büyük oranda eNOS aktivitesini artırması ile ilişkili olduğu düşünülmektedir (Molderings ve Haenisch, 2012; Piletz ve ark., 2013; Schwartz ve ark., 1997).

Agmatin hücre proliferasyonunu hücre tipi ve proliferasyon aşamasına bağlı olarak farklı şekillerde etkileyebildiği gösterilmiştir (Piletz ve ark., 2013). İntraselüler agmatin homeostazında meydana gelen bozulmalar ile lösemi ve solid tümörlerde görülen malignan hücre proliferasyonu arasında yakın bir ilişki olduğu gösterilmiştir (Haenisch ve ark., 2008; Molderings ve Haenisch, 2012; Molderings ve ark., 2004; Wolf ve ark., 2007). İnsan kolon kanser dokularında agmatin ve ADK ekspresyonunun normal dokulara kıyasla az olduğunun gösterilmesi (Molderings ve ark., 2004); insan lösemi hücrelerinde düşük agmatinaz ve DAO aktivitelerine rastlanması (Haenisch ve ark., 2011); insan ve sıçandan izole edilmiş çeşitli hücre tümör hatlarında ekzojen agmatin uygulamasının hücre proliferasyonunu inhibe etmesi gibi elde edilen bulgular; agmatinin antiproliferatif potansiyeline işaret etmektedir (Haenisch ve ark., 2011; Molderings ve ark., 2004; Wang ve ark., 2005). Her ne kadar agmatinin antiproliferatif etki mekanizması tam olarak aydınlatılamamış da olsa; poliamin metabolizması üzerindeki modülatör fonksiyonlarının söz konusu etkilerde önemli rol oynadığı düşünülmektedir (Piletz ve ark., 2013).

Agmatin sekretagog özellikleri ile endokrin sistemde çeşitli düzenleyici fonksiyonlara sahiptir. Agmatinin pankreas adacık hücrelerinden insülin salgılanmasını stimüle ettiği ve izole adiposit hücrelerde insülin-benzeri etkiler meydana getirdiği bilinmektedir (Sener ve ark., 1989; Weitzel ve ark., 1980). Agmatin aracılı gerçekleşen hafif hipoglisemik etkilerin yalnızca diyabet değil; aynı zamanda nöropatiler, Alzheimer hastalığı ve depresyon gibi glikoz disregülasyonunun eşlik ettiği patolojik tablolarda dikkate değer düzeyde bir fayda sağlayabileceği ifade edilmektedir (Piletz ve ark., 2013). Agmatinin ayrıca ileri glikasyon son ürünlerinin oluşumunu azaltması, diyabetik nöropatilerde nöropatik ağrıyı azaltması ve sinir

rejenerasyonunu artırması, böbreklerde glomerüler filtrasyon hızını artırması gibi etkileriyle diyabetik komplikasyonlarda da faydalı olabileceği öne sürülmektedir (Courteix ve ark., 2007; Lortie ve ark., 1996; Piletz ve ark., 2013). Bu kapsamda agmatinin diyabette veya glikoz disregülasyonunun eşlik ettiği kompleks tablolarda potansiyel bir adjuvan tedavi seçeneği olabileceği gündeme gelmiştir (Piletz ve ark., 2013).

4.5.6.1. Sinir sistemindeki etkileri

20. yüzyılın başları; Dale, Loewi, Eccles gibi önemli araştırmacıların yapmış oldukları çığır açıcı nitelikteki çalışmalar ile nöronal iletimde rol oynayan kimyasal mekanizmalarının aydınlatılmasına tanıklık etmiştir (Burnstock, 2009). Söz konusu çalışmalar nörotransmitterlerin keşfine aracılık ederek bugünkü nörotransmitter tanımının temel kriterlerini doğurmuştur. Bu kriterlere göre bir maddenin nörotransmitter olarak tanımlanabilmesi için: (a) presinaptik nöronda sentezlenip, depolanması; (b) Ca^{+2} bağımlı depolarizasyon sonucu presinaptik uçtan sinaptik aralığa salıverilmesi; (c) aktivitesinin enzimatik degradasyon ve/veya seçici geri alım sistemleri ile presinaptik uca geri alınım yoluyla sonlanması; (d) sinaptik aralığa salıverildikten sonra post-sinaptik membranda kendine özgü reseptörlere bağlanarak biyolojik etki oluşturmaları; (e) maddenin salıverildikten sonra oluşturduğu etkilerin, ekzojen olarak lokal yoldan uygulanması ile de elde edilmesi; (f) endojen aktiviteyi potansiyalize veya bloke eden ajanların ekzojen uygulama ile oluşan aktivite üzerinde de aynı etkiyi göstermesi gerekmektedir (Burnstock, 2009).

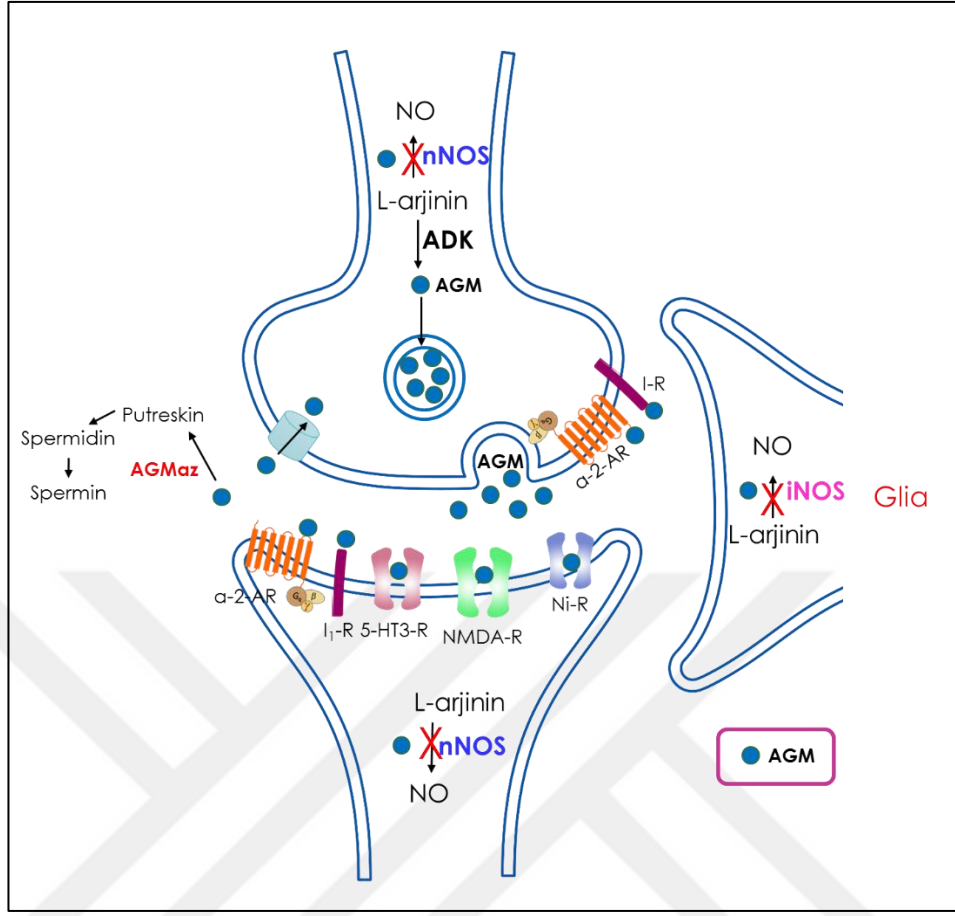
Agmatinin bahsi geçen kriterlerin hemen hemen tamamını sağlaması bakımından günümüzde yeni bir nörotransmitter/nöromodülatör molekül olabileceği öne sürülmektedir (Reis ve Regunathan, 2000). Agmatinin beyindeki konsantrasyonu bilinen klasik nörotransmitterler ile karşılaştırılabilir ölçüde benzerlik göstermektedir (Reis ve Regunathan, 2000; Uzbay, 2012). Agmatin MSS sinir sisteminde ADK enzimi ile sentezlenir ve presinaptik uçta sinaptik veziküller içerisinde depolanır. Ca^{+2} bağımlı depolarizasyon sonucu presinaptik uçtan parsiyel ekzositoz ile sinaptik aralığa salıverilir (Reis ve Regunathan, 1998). Kendine özgü agmatinaz enzimi ile yıkıma

uğrayarak ve presinaptik uca geri alınarak sinaptik aralıktan uzaklaştırılır (Sastre ve ark., 1996; Sastre ve ark., 1997). Bahsi geçen özellikleri ile agmatinin; nörotransmitter/nöromodülatör kriterlerinin çoğunu karşılayan aday bir nörotransmitter madde olabileceği önerilmektedir. Ancak; agmatinin nörotransmitter kriterlerinin tamamını karşılayabilmesi için kendine özgü (agmatinerjik) post-sinaptik reseptörlerinin tanımlanması ve beyinde olası agmatinerjik nöronal yolların fonksiyonel varlığının aydınlatılması gerekmektedir (Piletz ve ark., 2013).

Agmatinin gerek biyosentezinden sorumlu ADK gerekse inaktivasyonundan sorumlu agmatinaz enziminin beyinde nöronlarda varlığı gösterilmiştir (Iyo ve ark., 2006; Otake ve ark., 1998) (Bernstein ve ark., 2011; Piletz ve ark., 2013). Ayrıca agmatin ve ADK enziminin astrositlerde de bulunduğu gösterilmiştir (Li ve ark., 1995; Regunathan ve ark., 1995; Reis ve Regunathan, 2000; Sastre ve ark., 1997).

Agmatinin beyinde bazı nörotransmitter ve/veya nörohormonlar ile kolokelize olduğu gösterilmiştir (Gorbatyuk ve ark., 2001; Reis ve ark., 1998; Seo ve ark., 2011). Bu sebeple agmatin günümüzde ko-transmitter olarak da tanımlanabilmektedir (Piletz ve ark., 2013). Özellikle hipokampus beyin bölgesinde agmatinin glutamaterjik piramidal nöronlarda glutamat ile kolokelize olduğu gösterilmiş; bundan hareketle glutamatın ko-transmitteri olarak fonksiyon gösterebileceği ileri sürülmüştür (Piletz ve ark., 2013; Reis ve ark., 1998; Seo ve ark., 2011). Diğer taraftan hipotalamusta vazopresin ve oksitosin salıveren nöronlarda agmatin kolokalizasyonu tespit edilmiş ve agmatinin söz konusu nörohormonlar üzerinde modülatör etki gösterebileceği bildirilmiştir (Gorbatyuk ve ark., 2001).

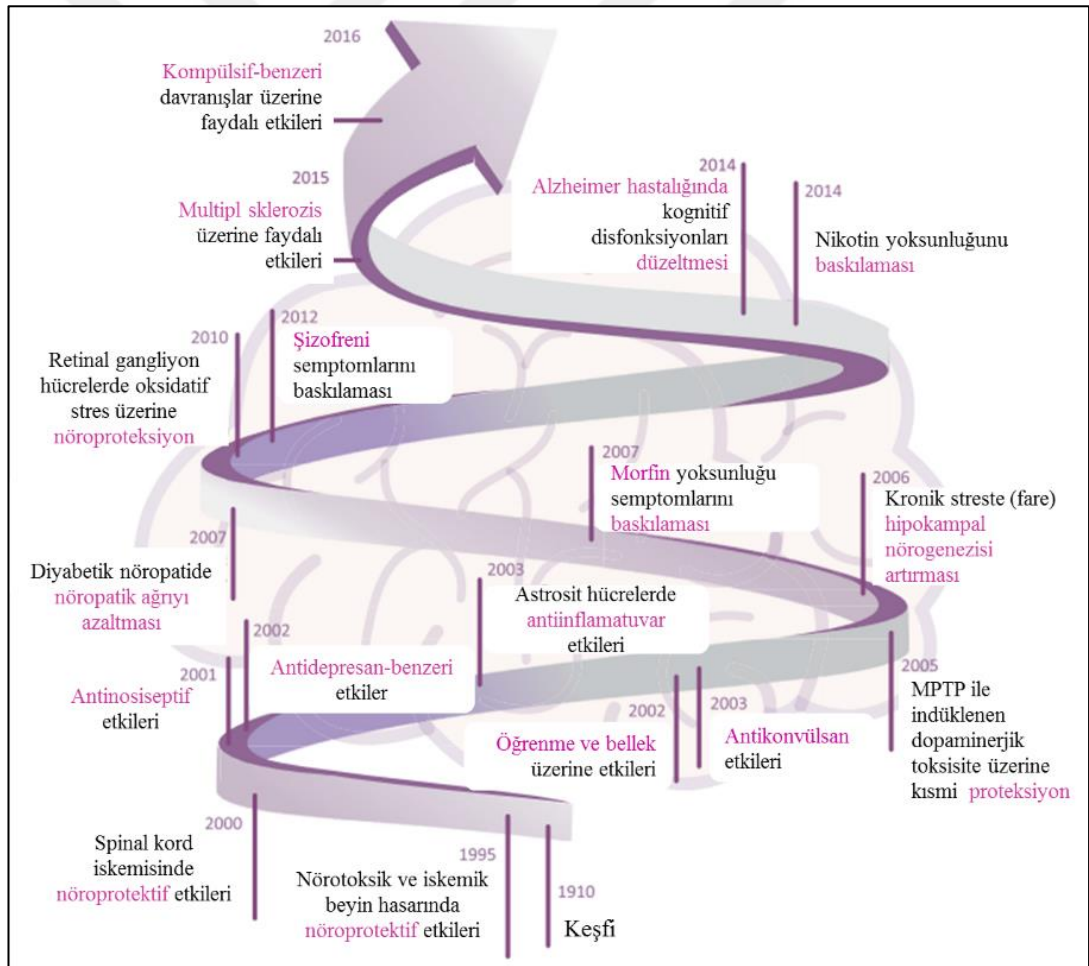
Sinaptik aralığa salıverilen agmatin; pre-/post-sinaptik membranda yerleşim gösteren bazı reseptörler ile etkileşerek MSS'de çeşitli biyolojik etkiler meydana getirmektedir. Agmatinin; pre/post-sinaptik membranda yerleşim gösteren imidazolin reseptörlerine ve α_2 -adrenerjik reseptörlerin tüm alt tipleri ve yüksek afinite ile bağlandığı (Regunathan ve Reis, 1996); başta NMDA reseptörleri olmak üzere nikotinik reseptörler, 5-HT₃ reseptörleri gibi ligand kapılı katyon kanallarını bloke ettiği (Loring, 1990; Molderings ve ark., 1996; Yang ve Reis, 1999) ; nNOS ve iNOS'u inhibe ettiği bilinmektedir (Auguet ve ark., 1995; Galea ve ark., 1996) (Şekil 23).



Şekil 23. Agmatinerjik sinaps. Agmatin presinaptik uçta ADK enzimi ile sentezlenir ve sinaptik veziküller içerisinde depolanır. Ca^{+2} bağımlı depolarizasyon sonucu presinaptik uçtan parsiyel ekzositoz ile sinaptik aralığa salıverilir Pre-/postsinaptik membranda yerleşim gösteren imidazolin ve α_2 -adrenerjik reseptörlere yüksek afinite ile bağlanır. NMDA reseptörleri, nikotinik reseptörler, 5-HT₃ reseptörleri gibi ligand kapılı katyon kanallarını bloke eder. nNOS ve iNOS'u inhibe eder. Kendine özgü agmatinaz enzimi ile yıkıma uğrayarak ve presinaptik uca geri alınarak sinaptik aralıktan uzaklaştırılır. Agmatin; AGM, arjinin dekarboksilaz; ADK, agmatinaz; AGMaz, α_2 -adrenerjik reseptör; α_2 -AR, imidazolin reseptörü; I₁-R, 5-HT₃ reseptörü; 5-HT₃-R, NMDA reseptörü; NMDA-R, nikotinik reseptör; Ni-R, nitrik oksit; NO, nitrik oksit sentetaz; NOS; nöronal NOS; nNOS, indüklenebilir NOS; iNOS.

Günümüze kadar olan dönemde agmatinin MSS etkileri; nöronal hasar, epilepsi, akut ve nöropatik ağrı, bağımlılık, nörodejenerasyon, bilişsel işlev bozuklukları, şizofreni anksiyete, stres ve depresyon gibi psikiyatrik bozukluklarda araştırılmış ve söz konusu patolojilerde potansiyel terapötik değeri gündemi gelmiştir (Piletz ve ark., 2013; Uzbay, 2012). Agmatinin nöronal hasarın eşlik ettiği travmatik beyin hasarı, iskemi, inme ve nörotoksisite tablolarında nöroprotektif etkiler meydana getirdiği;

nöropatik ağrıyı da içeren çeşitli ağrı modellerinde kayda değer antinosiseptif etki oluşturduğu, morfin yoksunluk sendromunun tüm belirtilerini baskıladığı ve morfine tolerans gelişimini önlediği, morfinin analjezik etkisini güçlendirdiği, şizofrenin semptomlarını baskılayabileceği, öğrenme-bellek fonksiyon bozukluklarını düzeltebileceği, antikonvülsan, antistres, anksiyolitik ve antidepresan etki potansiyeline sahip olduğu gösterilmiştir (Arıcıoğlu-Kartal ve Uzbay, 1997; Arıcıoğlu ve Altunbas, 2003; Arıcıoğlu ve ark., 2003a; 2003b; 2003c; Arıcıoğlu ve ark., 2004a; 2004b; Demehri ve ark., 2003; Fairbanks ve ark., 2000; Feng ve ark., 2005; Feng ve ark., 2002; Gilad ve Gilad, 2000; Kolesnikov ve ark., 1996; Neis ve ark., 2017; Palsson ve ark., 2008; Rushaidhi ve ark., 2012; Santos ve ark., 2005; Su ve ark., 2004; Utkan ve ark., 2012; Wang ve ark., 2006) (Şekil 24).



Şekil 24. Agmatin ve sinir sistemi etkileri (Neis ve ark., 2017).

4.6. Agmatin ve Depresyon

Yapılan alışmalar endojen agmatin düzeylerindeki değişimler ile stres ve depresyon tablosu arasında bir ilişki olabileceğine işaret etmektedir. Halaris ve Piletz'in depresyon hastaları üzerinde gerçekleştirdikleri çalışmalarında trombosit I₁-imidazolin reseptör bağlanma bölgesinin ve imidazolin reseptör ligandı olan agmatinin plazma düzeylerinin arttığı gösterilmiştir (Halaris ve Piletz, 2001; Halaris ve ark., 1999). Hastalarda yüksek bulunan endojen agmatin düzeylerinin ve trombosit I₁ ekspresyonunun antidepresan bupropiyon tedavisi sonrası normalize olduğu rapor edilmiştir (Halaris ve Piletz, 2001; Halaris ve ark., 1999). Söz konusu bulgularla agmatin ve imidazolin reseptörlerinin duygudurum modülasyonunda fizyolojik rolleri olabileceği öne sürülmüştür (Halaris ve Piletz, 2001; Halaris ve ark., 1999). Depresyon tanılı hastaların post-mortem hipokampal beyin bölgelerinde agmatinin yıkılmasından sorumlu agmatinaz enzimi düzeylerinin sağlıklı bireylere kıyasla anlamlı derecede yüksek eksprese olduğu gösterilmiştir (Bernstein ve ark., 2012).

Arıcıoğlu ve arkadaşlarının çalışmalarında strese maruz bırakılan sıçanlarda endojen agmatin düzeylerinin arttığı gösterilmiştir (Arıcıoglu ve ark., 2003c). 4 saat boyunca soğukta (4°C) kısıtlama stresi uygulanan sıçanların, plazma ve beyin kortekslerinde endojen agmatin düzeyi stres uygulanmayan kontrol grubuna göre anlamlı ölçüde yüksek bulunmuştur. Stres varlığındaki yüksek agmatin düzeylerinin strese karşı geliştirilen ve olasılıkla nöroprotektif etkilerle ilişkili adaptif bir mekanizma olabileceği öne sürülmüştür (Arıcıoglu ve ark., 2003c). Bir başka çalışmada ise 21 gün boyunca günde 6 saat süreyle kronik kısıtlama stresine maruz bırakılan sıçanların 3. hafta sonunda beyin agmatin düzeyleri kontrol grubuna göre anlamlı ölçüde düşük bulunmuştur (Zhu ve ark., 2008). Arıcıoğlu ve arkadaşlarının çalışmasında kısıtlama stresi tek seansta akut olarak uygulanmışken Zhu ve arkadaşlarının çalışmasında kısıtlama stresi kronik olarak 3 hafta süreyle uygulanmıştır. Bu bağlamda; akut stres varlığında artan agmatin düzeylerinin olasılıkla nöroprotektif özellikli fizyolojik bir antistres yanıtı olarak adaptif fonksiyonlarda rol oynayabileceği ne sürülmüştür. Diğer taraftan stresin kronikleşmesi durumunda ise söz konusu yanıtın yetersiz kalarak agmatin

düzeylerinde düşüşe yol açabileceği ve dolayısıyla düşük agmatin düzeylerinin strese bağlı bir patolojik sonuç olabileceği değerlendirmeleri gündeme gelmiştir (Aricioglu ve ark., 2003c; Zhu ve ark., 2008). Nitekim Zhu ve arkadaşlarının çalışmasında kronik strese azalan beyin agmatin düzeylerine prefrontal korteks ve hipokampüste dendritik dejenerasyonların eşlik ettiği ve ayrıca kronik agmatin uygulamasının (50 mg/kg; i.p.) kronik strese maruz bırakılan sıçanlarda söz konusu morfolojik patolojileri düzelterek nöroprotektif etki meydana getirdiği gösterilmiştir (Zhu ve ark., 2008).

İlk kez 2002 yılında Zomkowski ve arkadaşlarının fareler üzerinde yaptıkları çalışmalarında ekzojen agmatinin hem santral hem de sistemik uygulamasının antidepresan-benzeri etkiler meydana getirdiği gösterilmiştir (Zomkowski ve ark., 2002). Antidepresan-benzeri etkiler; zorunlu yüzme ve kuyruktan asma testleri olmak üzere iki farklı akut depresyon tarama testi ile değerlendirilmiştir. Agmatin farelere i.p. (0,01, 0,1, 1, 10 ve 50 mg/kg) ve i.c.v. yoldan (1, 10, 100 nmol) akut uygulanmış ve her iki testte de doza bağımlı olarak immobilité sürelerini azalttığı gösterilmiştir (Zomkowski ve ark., 2002). İlgili çalışmada agmatinin zorunlu yüzme testinde oluşturduğu antidepresan-benzeri etkilerinde kısmen NOS inhibisyonu, NMDA reseptör blokajı ve α_2 -adrenerjik reseptör aktivasyon mekanizmalarının rol oynayabileceği öne sürülmüştür. Bu kapsamda farklı gruplara her biri tek başına ve agmatin ile kombine edilmek üzere L-arjinin (NO donörü), yohimbin (α_2 -adrenerjik reseptör antagonisti), prazosin (α_1 -adrenerjik reseptör antagonisti) ve MK-801 (NMDA reseptör blokörü) uygulanmış ve zorunlu yüzme testinde immobilité süreleri üzerine etkileri incelenmiştir. L-arjinin, yohimbin ve prazosin tek başlarına immobilité süresini etkilemezken; agmatin ile kombine edildiklerinde L-arjinin ve yohimbinin agmatinin etkisini geri çevirdiği; prazosinin ise agmatinin etkisini değiştirmedeği gözlenmiştir. Buna göre agmatinin antidepresan etkilerinde kısmen NOS inhibisyonu kısmen de α_2 -adrenerjik reseptör aktivasyonunun rol oynayabileceği öne sürülmüş; α_1 -adrenerjik reseptörlerin ise agmatinin terapötik potansiyelinde rolü olmadığı gösterilmiştir. Diğer taraftan NMDA reseptör blokajı yapan MK-801 ve agmatinin tek başlarına uygulamaları antidepresan benzeri etki ile sonuçlanırken; kombinasyonlarının etkide bir sinerjizma yaratmadığı gösterilmiştir. Buna karşın her iki madde de imipramin ile ayrı ayrı kombine edildiğinde etkide anlamlı bir artış

meydana gelmiştir. Söz konusu bulgular; NMDA reseptör kanalına bağlanma için agmatin ve MK-801'in birbirleriyle yarışabileceği ve dolayısıyla MK-801 gibi agmatinin de antidepresan etkilerinin kısmen de olsa NMDA blokajından ileri gelebileceği şeklinde yorumlanmıştır (Zomkowski ve ark., 2002).

Zomkowski ve arkadaşlarının çalışmalarından yaklaşık bir yıl sonra Arıcıoğlu ve Altunbaş; agmatinin antidepresan-benzeri etkisini sıçanlar üzerinde de göstermişlerdir (Aricioglu ve Altunbas, 2003). Araştırmacılar agmatinin antidepresan-benzeri etkilerini zorunlu yüzme testinde doza bağımlı bir şekilde incelemişlerdir. Agmatin sıçanlara i.p. yoldan 10, 20, 40, 80 ve 100 mg/kg dozlarında testten 30 dk önce bir kez uygulanmış; ve uygulanan tüm dozlarda immobilité süresini azalttığı ancak etkinin doza bağımlı olmadığı gösterilmiştir. Diğer taraftan agmatinin immobilité süresi üzerine etkisi uygulandığı tüm dozlarda imipramin (30 mg/kg) ile kıyaslanabilir düzeyde bulunmuştur (Aricioglu ve Altunbas, 2003). İlgili çalışmada ayrıca akut agmatin uygulamasının anksiyete-benzeri davranışlar üzerine etkisi yükseltilmiş artı labirenti testi ile değerlendirilmiştir. Anksiyete-benzeri davranışın temel göstergesi olan açık kolda geçirilen sürenin yalnızca 40 mg/kg agmatin grubunda arttığı ve dolayısıyla agmatinin 40 mg/kg dozunda anksiyolitik etkisi olabileceği rapor edilmiştir (Aricioglu ve Altunbas, 2003).

Li ve arkadaşlarının sıçan ve fareler üzerinde gerçekleştirdikleri çalışmalarında per oral (p.o.) ve subkütan (s.c) yoldan farklı dozlarda uygulanan agmatinin kuyruktan asma ve zorunlu yüzme testlerinde U şeklinde antidepresan-benzeri etki meydana getirdiği gösterilmiştir (Li ve ark., 2003). Farelerde agmatin p.o. yoldan 10, 20, 40, 80 ve 160 mg/kg dozlarında 3 gün boyunca uygulanmış ve 3. gün son uygulamadan 1 saat sonra fareler kuyruktan asma testine alınmıştır. Agmatin 40 ve 80 mg/kg dozunda uygulandığında immobilité süresini azaltırken 10, 20 ve 160 mg/kg dozlarında etkisiz bulunmuştur. Zorunlu yüzme testinde de benzer şekilde 10 ve 20 mg/kg dozlarda etki oluşmazken 40 ve 80 mg/kg dozlarında immobilité sürelerinin azaldığı gösterilmiştir. Agmatin farelere s.c. yoldan 5, 10, 20, 40 mg/kg dozlarında uygulandığında yalnızca 20 mg/kg dozunda etkili bulunmuştur. Sıçanlarda ise agmatin p.o. yoldan 2,5, 5, 10 ve 20 mg/kg dozlarında testten 1 saat önce 1 kez uygulanmış ve yalnızca 10 mg/kg

dozunda etkili bulunmuştur. Agmatin sıçanlara s.c. yoldan 1,25; 2,5; 5 ve 10 mg/kg dozlarında uygulandığında 1,25; 2,5 ve 5 mg/kg dozlarında doza bağlı bir etki meydana getirmiştir (Li ve ark., 2003).

Agmatinin antidepresan benzeri etkilerinde serotonerjik sistemin kısmen rolü olabileceği ilk kez 2004 yılında Zomkowski ve arkadaşlarının fareler üzerinde yaptıkları çalışmalarında önerilmiştir (Dias Elpo Zomkowski ve ark., 2004). Antidepresan etkili çeşitli NMDA reseptör antagonistleri ve NOS inhibitörlerinin serotonerjik nörotransmisyonu arttırmalarına ilişkin literatür bilgisi doğrultusunda araştırmacılar agmatinin; bir NOS inhibitörü ve NMDA reseptör antagonisti olarak, antidepresan etkilerinde serotonerjik aşırımın olası rolünü araştırmayı hedeflemişlerdir. İlgili çalışmada agmatinin (10 mg/kg; i.p.) zorunlu yüzme testinde immobilityyi azaltıcı etkisi serotonin sentez inhibitörü paraklorofenilalanin ve seçici olmayan serotonin reseptör antagonisti metizerjid varlığında geri çevrilmiştir. Çeşitli 5-HT_{1A/1B} ve 5-HT₂ reseptör antagonistleri ile kombine edilmesi durumunda agmatinin antidepresan etkisi ortadan kalkmıştır. Diğer taraftan agmatin subefektif dozda 5-HT_{1A/1B} ve 5-HT_{1A} reseptör antagonistleri veya 5-HT_{1A} ve 5-HT_{2A} reseptör agonistleri ile beraber uygulandığında antidepresan etkide sinerjizma meydana geldiği gösterilmiştir. Agmatin ayrıca subefektif dozda fluoksetinin antidepresan etkisini potansiyalize etmiştir. Söz konusu bulgular ile agmatinin zorunlu yüzme testinde oluşturduğu antidepresan-benzeri etkilerinin kısmen 5-HT_{1A/1B} ve 5-HT₂ reseptör etkileşimleri ile ilişkili olabileceği öne sürülmüştür (Dias Elpo Zomkowski ve ark., 2004).

Diğer taraftan bir başka çalışmada Zomkowski ve arkadaşlarının aksine agmatinin farelerde zorunlu yüzme testindeki antidepresan-benzeri etkilerinin serotonin aracılı olmadığı öne sürülmüştür (Krass ve ark., 2008). Agmatin uygulamasından önce farelere 3 gün boyunca paraklorofenilalanin uygulanmış frontal kortekste serotonin ve metaboliti 5-hidroksiindol asetik asit konsantrasyonlarının azaldığı gösterilmiştir. Agmatinin zorunlu yüzme testinde 10 ve 30 mg/kg dozlarında immobility üzerine etkisinin olmadığı etkili bulunan 50 mg/kg dozunda ise paraklorofenilalanin ön uygulaması ile etkinin değişmediği gösterilmiştir (Krass ve ark., 2008). Aynı

çalışmasında agmatinin (10, 30 ve 50 mg/kg) aydınlık-karanlık kompartman testinde aydınlık bölümde geçirilen süreyi değiştirmedeği; dolayısıyla anksiyolitik etki potansiyeli olmadığı gösterilmiştir (Krass ve ark., 2008).

Bir başka çalışmada ise agmatinin antidepresan etkileri ile opioiderjik sistem ve özellikle μ ve σ opioid reseptör aktivasyonu arasındaki olası ilişkiye dikkat çekilmiştir. Agmatinin zorunlu yüzme testindeki antidepresan-benzeri etkilerinin μ ve σ opioid reseptör antagonistleri varlığında geri çevrildiği ancak κ reseptör antagonisti varlığında etkinin değişmediği rapor edilmiştir (Zomkowski ve ark., 2005).

Fareler üzerinde yapılan bir başka çalışmada ise agmatinin antidepresan etkisinin K^+ kanal aktivasyonu ile ilişkisi araştırılmıştır (Budni ve ark., 2007). Çeşitli K^+ kanal blokörlerinin antidepresan benzeri etkiler meydana getirdiği; NO donörlerinin K^+ kanal aktivasyonuna yol açarak kanal blokörlerinin oluşturduğu antidepresan etkiyi geri çevirdiği bilgilerinden hareketle farklı tipteki K^+ kanal blokörleri ile agmatin subefektif dozlarda (0,001 mg/kg; i.p.) kombine edilerek kullanılmıştır. Zorunlu yüzme testinde immobilité süresi üzerine sinerjistik etki oluşturduğu ve K^+ kanal açıcıları varlığında agmatinin (10 mg/kg) antidepresan etkisini geri çevirdiği gösterilmiştir. Söz konusu bulgular ile agmatinin antidepresan etkilerinin kısmen nöronal eksitabilitenin azaltılması ile ilişkili olarak K^+ kanal inhibisyonu aracılığıyla oluşabileceği öne sürülmüştür (Budni ve ark., 2007).

Bir başka çalışmada ise agmatinin antidepresan etkisi imidazolin reseptör aktivasyonu ile ilişkilendirilmiştir (Zeidan ve ark., 2007). Fareler üzerinde gerçekleştirilen çalışmada agmatinin 10 mg/kg (i.p.) dozunda immobilitéyi azaltıcı etkisi, efaroksan (imidazolin I_1/α_2 adrenerjik reseptör antagonisti), idazoksan (imidazolin I_2/α_2 adrenerjik reseptör antagonisti) ve antazolin (imidazolin I_2 reseptör ligandı) ile birlikte uygulandığında tamamen engellenmiştir. Diğer taraftan agmatin subefektif dozlarda klonidin (imidazolin I_1/α_2 adrenerjik reseptör agonisti), moksonidin (imidazolin I_1/α_2 adrenerjik reseptör agonisti), antazolin ve MK-801 (NMDA reseptör blokörü) ile beraber uygulandığında antidepresan etkide sinerjizma meydana gelmiştir. Agmatin ve klonidin kombinasyonu ile meydana gelen sinerjistik etki yohimbin (α_2 adrenerjik reseptör antagonisti) uygulaması ile ortadan kalkmıştır.

Söz konusu bulgularla agmatinin antidepresan-benzeri etkisinde imidazolin reseptörleri (I_1 ve I_2) ve ayrıca α_2 -adrenerjik reseptörlerin aktivasyonunun kısmen rol oynayabileceği gösterilmiştir (Zeidan ve ark., 2007).

Agmatinin antidepresan etkilerinde imidazolin reseptörlerinin rolü olabileceği fikri başka çalışmalarla da desteklenmiştir. Agmatin ve çeşitli imidazolin reseptör agonistlerinin fluoksetin, paroksetin ve bupropiyon ile subefektif dozlarda kombinasyonlarının farelerde zorunlu yüzme testinde sinerjistik etki oluşturduğu gösterilmiştir (Kotagale ve ark., 2013b; Taksande ve ark., 2009). Diğer taraftan SSRI'ler ve bupropiyon imidazolin I_1 ve I_2 reseptör antagonistleri (efaroksan ve idazoksan) ile kombine edildiğinde antidepresan etkilerin kaybolduğu görülmüştür (Kotagale ve ark., 2013b; Taksande ve ark., 2009). Bunlara ek olarak beyindeki agmatin düzeylerinin SSRI uygulanan farelerde tedavi almayan gruba kıyasla arttığının gösterilmesiyle; SSRI ilaçların antidepresan etkilerinde kısmen de olsa endojen imidazolin reseptör ligandı olan agmatinin modülatör rolü olabileceği önerilmiştir (Taksande ve ark., 2009).

Agmatinin ayrıca in vitro ve in vivo düzeyde hipokampal nörojenezi desteklediği gösterilmiştir (Li ve ark., 2006). Depresyonda önemli patofizyolojik mekanizmalardan biri olan nöroenezisin bozulmasından hareketle agmatinin söz konusu etkilerinin antidepresan etki mekanizmasında rol oynayabileceği düşünülmüştür (Bernstein ve ark., 2012). Agmatinin antidepresan etkisi ile ilişkilendirilen bir diğer mekanizma ise nöropeptid Y (NPY) üzerinedir (Kotagale ve ark., 2013a). Agmatinin hipotalamus NPY immünoreaktivitesini artırdığı; subefektif dozlarda NPY ve NPY Y1 reseptör agonisti ile kombinasyonlarının sıçanlarda zorunlu yüzme testinde antidepresan-benzeri etkiyi güçlendirdiği; NPY Y1 reseptör antagonisti varlığında ise agmatinin antidepresan etkisinin ortadan kalktığı gösterilmiştir (Kotagale ve ark., 2013a).

Birkaç yıl öncesine kadar agmatinin antidepresan-benzeri etkileri zorunlu yüzme, kuyruktan asma gibi deneysel akut tarama testleri ile kısıtlı kalmıştır. 2013 yılında Taksande ve arkadaşlarının fareler üzerinde yaptıkları çalışmada agmatinin antidepresan-benzeri etkileri ilk kez iyi valide edilmiş bir depresyon modeli olan KÖHS modelinde ele alınmıştır (Taksande ve ark., 2013). KÖHS modeli farelere 28

gün boyunca; agmatin (2,5, 5 ve 10 mg/kg) tedavisi ise stres prosedürünün son 2 haftası boyunca uygulanmıştır. Depresyon-benzeri davranışların temel göstergelerinden biri olan anhedoni-benzeri davranışlar sükröz tercih testi; çaresizlik-benzeri davranışlar ise zorunlu yüzme testi ile değerlendirilmiştir. Kronik strese maruz bırakılan farelerde gelişen depresyon-benzeri davranışların kronik agmatin (5 ve 10 mg/kg) tedavisi ile düzeldiği rapor edilmiştir (Taksande ve ark., 2013). Bir başka çalışmada agmatinin (10 mg/kg; p.o.) farelerde akut kısıtlama stresi ile indüklenen depresyon-benzeri davranışları zorunlu yüzme testinde geri çevirdiği gösterilmiştir (Freitas ve ark., 2014). İlgili çalışmada akut agmatin uygulamasının stresin hipokampüste oluşturduğu oksidatif hasar yanıtlarını geri çevirebildiği gösterilmiştir. Buradan hareketle agmatinin depresyon sırasında gelişen reaktif oksijen radikallerine bağlı mekanizmalar üzerinde de modülatör etkisi olabileceği düşünülmüştür (Freitas ve ark., 2014).

Son yıllarda agmatinin antidepresan etkisinin mekanizmasını aydınlatılmaya yönelik yapılan çalışmaların sayısı giderek artmaktadır. Bu kapsamda agmatinin bir NMDA reseptör blokörü olmasından hareketle, ketaminin hızlı antidepresan etkisi ile ilişkilendirilen mTOR (mammalian target of rapamycin) aracılı hücre içi sinyal yolları, sinaptogenez ve nörotrofik faktörler üzerindeki etkisi ele alınmaya başlanmıştır (Meylan ve ark., 2016; Neis ve ark., 2016a; 2016b). Neis ve arkadaşları farelerde akut agmatin uygulaması ile elde edilen antidepresan-benzeri etkilerin kısmen AMPA reseptör aktivasyonu ve mTOR sinyal yolağı ile ilişkili olabileceğini öne sürmüşlerdir (Neis ve ark., 2016b). Yapılan çalışmada agmatin uygulaması ile farelerin prefrontal korteksinde BDNF ve sinaptik protein düzeylerinin yükseldiği gösterilmiştir. Kuyruktan asma testinde agmatinin immobilité süresini kısalttığı; mTOR inhibitörü rapamisin, BDNF antikoru, tirozin kinaz B ve AMPA reseptör antagonistleri ve fosfoinozitid 3-kinaz (PI3K) inhibitörü varlığında bu etkinin geri çevrildiği gösterilmiştir. Dolayısıyla agmatinin antidepresan etkilerinde mTOR sinyal yolağı, AMPA reseptör aktivasyonu, BDNF ve sinaptik protein düzeylerindeki artışın rol oynayabileceği öne sürülmüştür (Neis ve ark., 2016b). Söz konusu bulgulardan hareketle araştırmacıların bir başka çalışmalarında agmatin bu kez KÖHS modelinde akut olarak uygulanmış ve olası hızlı antidepresan etki potansiyeli ketamin ve

fluoksetin ile karşılaştırılarak incelenmiştir (Neis ve ark., 2016a). Elde edilen bulgulara göre akut fluoksetin uygulaması ile kuyruktan asma testinde immobilité süreleri kısalmazken; agmatinin tek doz uygulaması farelerde ketamin ile karşılaştırılabilir ölçüde antidepresan-benzeri etki meydana getirmiştir (Neis ve ark., 2016a). Günümüze kadar olan dönemde agmatinin antidepresan-benzeri etkisinin incelendiği çalışmalar Tablo 7’de özetlenmiştir (Tablo 7).

Deneysel çalışmaların yanı sıra yakın tarihte major depresyon tanılı 3 hasta üzerinde gerçekleştirilen pilot bir klinik çalışmada 4 hafta süresince uygulanan agmatin (2-3 mg/gün) tedavisinin hastalarda antidepresan etki meydana getirdiği ve uygulanan dozda fiziksel veya davranış düzeyinde herhangi bir istenmeyen etki oluşturmadığı gösterilmiştir (Shopsin, 2013). İlgili çalışmada agmatin ayrıca artan dozlarda paraklorofenilalanin ile kombine edilmiş ancak agmatinin antidepresan etkisi paraklorofenilalanin uygulamasından etkilenmemiştir. Bu kapsamda agmatinin antidepresan etkilerinin serotonerjik mekanizmalardan bağımsız bir şekilde meydana geldiğine ilişkin görüşler klinik veriler ile de desteklenmiştir (Shopsin, 2013).

4.6.1. Agmatin, depresyon ve inflamasyon ilişkisi

Agmatinin antiinflamatuvar etkilerine çeşitli çalışmalarda dikkat çekilmiştir. Agmatinin astroglia ve makrofaj hücrelerinde LPS inkübasyonu ile indüklenen iNOS ekspresyonunu doza bağımlı bir şekilde azalttığı bilinmektedir (Regunathan ve Piletz, 2003). Akut akciğer hasarı, pulmoner fibrozis, karaciğer yetmezliği gibi inflamasyonun eşlik ettiği çeşitli modellerde agmatinin TNF- α , IL-1 β gibi pro-inflamatuvar sitokin yanıtlarını, NF- κ B aktivasyonunu ve NO düzeylerini azaltarak inflamasyonu baskıladığı gösterilmiştir (El-Agamy ve ark., 2014a; 2014b; Li ve ark., 2014).

Bunun yanında travmatik beyin hasarı, inme, nörodejeneratif hastalıklar, nöropatik ağrı gibi nöroinflamasyon bileşenli çeşitli MSS patolojilerinde nöroprotektif etkilerinin olduğu bilinmektedir (Piletz ve ark., 2013; Uzbay, 2012).

Tablo 7. Agmatinin antidepresan-benzeri etkilerinin gösterildiği çalışmalar. (Kronolojik sıra ile yer verilmiştir.)

Depresyon Modeli	Depresif davranışların değerlendirilmesi	Kullanılan Denek	Agmatinin Uygulama Yolu	Agmatin Dozu	Kaynak
-	Zorunlu yüzme	Fare	i.p.	0,01-50 mg/kg	(Zomkowski ve ark., 2002)
-	Kuyruktan asma	Fare	i.p.	0,01-50 mg/kg	(Zomkowski ve ark., 2002)
-	Zorunlu yüzme	Fare	i.c.v	1, 10, 100 nmol	(Zomkowski ve ark., 2002)
-	Zorunlu yüzme	Sıçan	i.p.	10, 20, 40, 80, 100 mg/kg	(Aricioglu ve Altunbas, 2003)
-	Zorunlu yüzme	Sıçan	p.o.	10 mg/kg	(Li ve ark., 2003)
-	Zorunlu yüzme	Sıçan	s.c.	1,25, 2,5 ve 5 mg/kg	(Li ve ark., 2003)
-	Zorunlu yüzme	Fare	p.o.	40 ve 80 mg/kg	(Li ve ark., 2003)
-	Zorunlu yüzme	Fare	s.c.	20 mg/kg	(Li ve ark., 2003)
-	Kuyruktan asma	Fare	p.o.	40 ve 80 mg/kg	(Li ve ark., 2003)
-	Zorunlu yüzme	Fare	i.p.	10 mg/kg	(Dias Elpo Zomkowski ve ark., 2004)
-	Zorunlu yüzme	Fare	i.p.	10 mg/kg	(Budni ve ark., 2007)
-	Zorunlu yüzme	Fare	i.p.	10 mg/kg	(Zeidan ve ark., 2007)
-	Zorunlu yüzme	Fare	i.p.	50 mg/kg	(Krass ve ark., 2008)
-	Zorunlu yüzme	Fare	i.p.	20 mg/kg	(Taksande ve ark., 2009)
-	Zorunlu yüzme	Sıçan	i.c.v.	20, 40 µg/sıçan	(Kotagale ve ark., 2013a)
KÖHS (28 gün)	Zorunlu yüzme, sükröz tercih, splash testi	Fare	i.p.	5, 10 mg/kg (14 gün boyunca)	(Taksande ve ark., 2013)
TNF-α (i.c.v.) uygulaması	Kuyruktan asma	Fare	p.o.	0,001, 0,01, 0,1, 1 mg/kg	(Neis ve ark., 2014)
Akut kısıtlama stresi	Zorunlu yüzme	Fare	p.o.	10 mg/kg	(Freitas ve ark., 2014)
Bakteriyel LPS uygulaması	Zorunlu yüzme	Sıçan	i.c.v.	10, 20 µg/sıçan	(Taksande ve ark., 2015)
Bakteriyel LPS uygulaması	Zorunlu yüzme, kuyruktan asma	Fare	i.p.	20, 40 mg/kg (7 gün boyunca)	(Gawali ve ark., 2016)
Sistemik kortikosteron uygulaması (21 gün)	Kuyruktan asma, splash testi	Fare	p.o.	0,1 mg/kg (21 gün)	(Freitas ve ark., 2016a)
KÖHS (14 gün)	Kuyruktan asma, splash testi	Fare	i.p.	0,1 mg/kg (tek doz)	(Neis ve ark., 2016a)
KÖHS (28 gün)	Sükröz tercih, zorunlu yüzme,	Fare	i.p.	20, 40 mg/kg (28 gün boyunca)	(Gawali ve ark., 2017)
Kortikosteron uygulaması (21 gün)	Kuyruktan asma testi, splash testi	Fare	p.o.	0,1 mg/kg (21 gün boyunca)	(Olescowicz ve ark., 2017)

Anılan çalışmaladaki bulgulardan hareketle agmatinin antidepresan etkisinin inflamasyon hipotezi kapsamında araştırılması ve terapötik potansiyeline katkıları ele alınmaya başlamıştır (Freitas ve ark., 2016a; Gawali ve ark., 2016; Neis ve ark., 2014; Sahin ve ark., 2016a; Taksande ve ark., 2015). Eldeki kısıtlı bulgular ile agmatinin antiinflamatuvar etki potansiyeli taşıyan bir antidepresan molekül olabileceği ve bu yönüyle inflamatuvar depresyon tablosunda yeni bir tedavi yaklaşımı olabileceği fikri giderek güçlenmektedir.

Taksande ve arkadaşlarının fareler üzerinde yaptıkları çalışmalarında KÖHS ile oluşturulan plazma kortikosteron düzeylerindeki artışın kronik agmatin uygulaması ile azaldığı ve depresyon-benzeri davranışların düzeldiği gösterilmiştir (Taksande ve ark., 2013). Nitekim depresyon ile HPA eksenini hiperaktivitesi ve yüksek plazma glukokortikoid düzeyleri arasında bir ilişki olduğu bilinmektedir. Depresyonda artan HPA aktivitesi; inflamatuvar yanıtların tetiklenmesi, değişen nörotransmitter metabolizması, azalan nörotrofik faktörler ve nörotoksisite gibi depresyonda birbirleriyle etkileşerek tetiklenebilen patofizyolojik mekanizmaların önemli bir parçası olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu kapsamda agmatin ile elde edilen söz konusu bulgular; agmatinin depresyonda olasılıkla HPA eksenini baskılayarak başta inflamatuvar yanıtlar olmak üzere bahsi geçen çeşitli patolojik süreçler üzerindeki olası terapötik potansiyelini gündeme getirmiştir (Taksande ve ark., 2013). Taksande ve arkadaşları 2015 yılında yaptıkları bir başka çalışmalarında bu kez agmatinin sıçanlarda bakteriyel LPS ile oluşturulan depresyon ve anksiyete davranışlarına eşlik eden anoreksiya, hipertermi tablosunu düzelttiğini ve LPS ile indüklenen serum IL-6 ve TNF- α düzeylerini de normalize ettiğini rapor etmişlerdir (Taksande ve ark., 2015). Söz konusu bulgulardan hareketle araştırmacılar agmatinin beyinde pro-inflamatuvar yanıtları azaltmak ve/veya antiinflamatuvar yolları aktive ederek inflamasyonun eşlik ettiği çeşitli patolojilerde etkili olabileceğini öne sürmüşlerdir (Taksande ve ark., 2015).

Taksande ve arkadaşlarının bulguları 2016 yılında bu kez fareler üzerinde yapılan bir başka çalışma ile desteklenmiştir (Gawali ve ark., 2016). İlgili çalışmada 7 gün süreyle uygulanan agmatinin farelerde LPS ile oluşturulan depresyon-benzeri

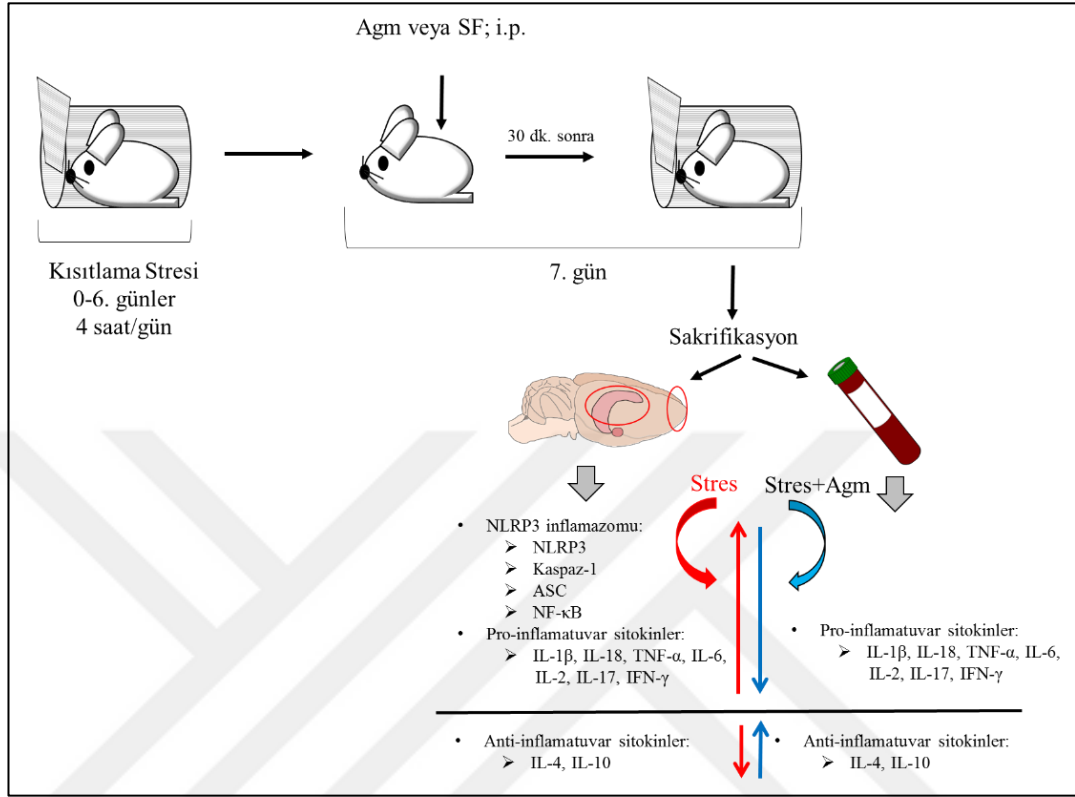
davranışları önlediği, beyinde artmış IL-1 β ve TNF- α düzeylerini düşürerek nöroinflamasyonu azalttığı, BDNF seviyesini yükselttiği ve oksidatif/nitrözatif stres yanıtını düzelttiği gösterilmiştir (Gawali ve ark., 2016).

Bu hipotezi destekleyen bir başka çalışma farelerde TNF- α uygulamasıyla yapılmış ve akut agmatin uygulamasının kuyruktan asma testinde immobilité süresini kısaltarak depresyon-benzeri tabloyu geri çevirdiği gösterilmiştir (Neis ve ark., 2014). Aynı çalışmada agmatin fluoksetin, imipramin, bupropiyon, NMDA reseptör blokörü MK-801 ve nNOS inhibitörü 7-nitroindazol ile sub-efektif dozlarda kombine edildiğinde sinerjistik etki olduğu rapor edilmiştir. Bu kapsamda; agmatinin olasılıkla antiinflamatuvar potansiyeli ve ilişkili antidepresan etkilerinin; NMDA reseptör blokajı, NOS inhibisyonu ve monoaminerjik nörotransmisyonun modülasyonu ile bağlantılı olabileceği öne sürülmüştür (Neis ve ark., 2014).

Bakteriyel LPS ve TNF- α uygulaması ile oluşturulan depresyon modellerinin dışında agmatinin kortikosteron uygulamasına bağlı oluşan modelde etkili olduğu yakın tarihte gösterilmiştir (Freitas ve ark., 2016a). Bu çalışmada agmatin farelere kortikosteron ile birlikte 21 gün boyunca uygulandığında; antidepresan etki ve beraberinde nöroplastisiteyi desteklediği, mikrogliya ve astrosit morfolojisini de düzenleyebildiği gösterilmiştir. Aynı çalışmada agmatinin etkileri hücresele antioksidan koruma sisteminde rol oynayan önemli bir transkripsiyon faktörü olan eritroid kaynaklı nükleer faktör 2 (Nrf2) ile ilişkilendirilmiştir. Nrf2 geni silinmiş farelerde agmatinin etkilerinin söz konusu oluşmadığı ve dolayısıyla agmatinin antidepresan etkilerinde Nrf2 aktivasyonunun rol oynayabileceği de ileri sürülmüştür (Freitas ve ark., 2016a).

Bahsi geçen çalışmalar ışığında ekibimiz tarafından gerçekleştirilen yakın tarihteki bir çalışma ile strese maruz bırakılan sıçanlarda akut agmatin uygulamasının NLRP3 inflamazom aktivasyonu ve sitokin yanıtları üzerine etkisi incelenmiştir (Şekil 25) (Sahin ve ark., 2016a). Çalışmada sıçanlara 7 gün süreyle günde 4 saat olmak üzere sub-kronik kısıtlama stresi uygulanmış ve agmatin son gün, tek doz (40 mg/kg; i.p.) olarak verilmiştir. Elde ettiğimiz verilere göre akut agmatin uygulaması sıçanlarda

stres ile indüklenen NLRP3 inflamazom aktivasyonunu ve ayrıca proinflamatuvar sitokinler aracılı gelişen inflamatuvar yanıtları baskılamıştır (Sahin ve ark., 2016a).



Şekil 25. Stres modelinde NLRP3 aktivasyonu ve agmatinin etkisi. Yukarıda Şahin ve arkadaşlarının çalışmaları şematize edilmiştir. İmmobilizasyon kafesleri kullanılarak 7 gün süreyle günde 4 saat uygulanan kısıtlama stresi şekilde gösterilmiştir. Agmatin (40 mg/kg) veya SF (0,1 ml/100g) son stres seansından 30 dk önce tek doz şeklinde uygulanmıştır. Son gün kısıtlama stresinin bitiminden hemen sonra sıçanlar sakrifiye edilmiş; hipokampus ve prefrontal korteks beyin dokuları ve taze kandan serum örnekleri alınmıştır. Stres uygulanmayan kontrol grubu ile karşılaştırıldığında; sub-kronik kısıtlama stresi uygulanan sıçanlarda prefrontal korteks ve hipokampal NLRP3 inflamazomu aktivasyonu meydana gelirken; serum ve beyinde pro-inflamatuvar sitokin seviyeleri yükselmiş; anti-inflamatuvar sitokinlerin seviyesi ise azalmıştır. Tek doz agmatin uygulaması; stres ile indüklenen NLRP3 inflamazom aktivasyonunu azaltmış ve sitokin yanıtlarını normalize etmiştir. Agmatin; agmatin, serum fizyolojik; SF. (Sahin ve ark., 2016a).

4.7. Deneysel Depresyon Modelleri

4.7.1. Deneysel depresyon modellerinde geçerlilik kavramı

Depresyon; klinik semptomları hastadan hastaya büyük değişkenlik gösterebilen kompleks patofizyolojiye sahip heterojen bir hastalıktır. Birçok psikiyatrik hastalıkta olduğu gibi depresyonun patofizyolojisi günümüzde hala net olarak aydınlatılabilmiş değildir. Toplumda yaygın olarak görülen ve çoğu olguda yeterli düzeyde tedavi başarısının sağlanamadığı depresyonun daha iyi anlaşılması ve yeni tedavi stratejilerinin geliştirilebilmesi için hayvan modelleri ile yapılan deneysel çalışmalar gerek hastalık nörobiyolojisi gerekse davranış düzeyinde incelemelere olanak tanınması bakımından kritik bir öneme sahiptir. Ancak depresyon gibi duygudurum ve entelektüel fonksiyonları da içeren, türümüze özgü davranış ve düşünce sisteminin etkilendiği psikiyatrik hastalıkların hayvanlarda tam anlamıyla oluşturulması şüphesiz ki mümkün değildir. Buna karşın klinikte görülen hastalığa özgü bazı semptomlar (endofenotipler) veya patofizyolojik değişimlerin deney hayvanlarında da oluşturulması mümkündür. Nitekim deneysel hayvan modelleri ile depresyon gibi çeşitli psikiyatrik hastalıkların belli yönleri, belli seviyelerde ve belli kısıtlılıklarda hayvanlarda taklit edilebilmektedir (Abelaira ve ark., 2013; Czeh ve ark., 2016; Deussing, 2006; Duman, 2010).

Deneysel depresyon modellerinin geçerliliklerinin belirlenmesi ve kliniğe uyarlanabilirliklerinin anlaşılması; yapılan çalışmaların kalitesi ve öne sürülen bulguların literatürdeki yeri bakımından büyük önem taşımaktadır. Deney hayvanlarında oluşturulan depresyon modellerinde geçerlilik kavramı ilk kez 1969 yılında McKinney and Bunney tarafından ortaya atılmıştır (McKinney ve Bunney, 1969). 1984 yılında Paul Willner deneysel depresyon modellerinin geçerliliği ile ilişkili olarak en az 3 kriterin önemine dikkat çekmiştir (Willner, 1984). Bunlar: (1) Görünüş geçerliliği (face validity), (2) Yapısal geçerlilik (construct validity) ve (3) Öngörüşel geçerlilik (predictive validity) kriterleridir. Yıllar içinde bahsi geçen kriterlere yenilerinin eklenmesiyle birlikte Willner'in kriterleri depresyon modellerinin geçerliliği ve kliniğe uyarlanabilirliğinin belirlenmesinde halen temel kılavuz niteliğini korumaktadır (Czeh ve ark., 2016). Bu kriterler; (1) hayvandaki

davranış fenotipi ile klinik semptomların benzer olması (görünüş geçerliliği), (2) hastalığın gelişiminde rol oynadığı bilinen etiyolojik faktörlerin hayvanlarda tetiklenmesi ve ilişkili hastalık nörobiyolojisine benzer süreçlerin hayvanda da gelişmesi (yapısal geçerlilik), (3) klinikte kullanılan tedavide etkili ilaçların model oluşturulan hayvanda da etkili olması, diğer taraftan o hastalığa etkisiz olduğu bilinen moleküllerin modelde de etkisiz olması (öngörüs el geçerlilik) gerekliliğini öne sürmektedir (Czeh ve ark., 2016; Willner, 1984).

Her ne kadar deneysel depresyon modelleri ile bahsi geçen 3 kriterin tam anlamıyla karşılanması mümkün değilse de; günümüzde hastalığı belli yönleriyle taklit edebilen, antidepresan yanıtın öngörülebildiği ve uygun bir biçimde test edilebildiği çeşitli depresyon modelleri ve akut tarama testleri mevcuttur (Abelaira ve ark., 2013; Czeh ve ark., 2016; Deussing, 2006; Duman, 2010; Willner, 1984). Bu kapsamda irdelendiğinde özellikle çevresel stres etkeni ile deney hayvanlarında oluşturulan kronik stres modellerinin; görünüş, yapısal ve öngörüs el geçerlilik kriterlerini büyük oranda sağlayan iyi valide edilmiş depresyon modelleri olduğu kabul edilmektedir (Czeh ve ark., 2016).

4.7.2. Antidepresan aktivite tarama testleri

Akut (antidepresan aktivite) tarama testleri yeni geliştirilen antidepresan ilaçların etkinliklerinin değerlendirilmesinde uzun yıllardır kullanılan testlerdir. Akut tarama testlerinin iyi valide edilmiş depresyon modellerinden ayrı tutulmaları gerekmektedir (Czeh ve ark., 2016). Nitekim deneysel depresyon çalışmalarında model ve test kavramları arasında belirgin bir ayrım olduğu unutulmamalıdır (Abelaira ve ark., 2013; Czeh ve ark., 2016; Deussing, 2006). Model; genel ifade ile insanda görülen bir patolojinin deney hayvanlarında geçerli bir şekilde taklit edilebilmesi iken, test ise belli bir zaman noktasındaki fizyolojik veya davranışsal ölçümleri kapsamaktadır (Abelaira ve ark., 2013). Günümüzde depresyon-benzeri davranışlar ve antidepresan-benzeri etkinin değerlendirilmesinde zorunlu yüzme ve kuyruktan asma testleri olmak üzere iki temel akut tarama testi kullanılmaktadır (Deussing, 2006). Söz konusu testlerin öngörüs el geçerlilik kriterlerini bir ölçüde sağlamalarına karşın, yapısal ve görünüş geçerliliklerinin bulunmadığı söylenebilir (Abelaira ve ark., 2013).

4.7.2.1. Zorunlu yüzme testi

Zorunlu yüzme testi en yaygın kullanılan akut tarama testlerinin başında gelmektedir. Porsolt testi olarak da anılan zorunlu yüzme testi ilk kez 1977 yılında Porsolt tarafından geliştirilmiş ve bazı modifikasyonlarla günümüzde antidepresan aktivitenin değerlendirilmesinde hala sıklıkla tercih edilmektedir (Porsolt ve ark., 1977). Zorunlu yüzme testi ilk geliştirildiği dönemde antidepresan etkili moleküllerin farelerde test edilmesine olanak tanıyan bir depresyon modeli olarak sunulmuştur. Günümüzde ise fare ve sıçanlarda yaygın olarak kullanılmaktadır. Test, fare veya sıçanın belirli yükseklikte su ile doldurulmuş bir silindir fanus içinde yüzdürülmesi esasına dayanır. Silindir yapıdaki düzenek ve uygun su yüksekliği sağlanarak hayvanın kaçma veya tutunmasına imkan verilmemekte; böylece kaçınılmaz bir stres ortamı yaratılmaktadır. Tipik olarak; sıçan veya fare yüzme seansının başlarında aktif yüzme hareketleri ile karakterize kaçma davranışı sergilemekte, bunu kaçma davranışının sergilenmediği, hareketsiz kalma (immobilite) periyotları izlemektedir. İmmobilite davranışı; deney hayvanının başını suyun üstünde tutmaya yetecek kadar küçük hareketler yapmak dışında hareketsiz kalma durumu; diğer bir ifade ile sıçanın aktif yüzme davranışını sergilemediği anlar şeklinde tanımlanmaktadır. Zorunlu yüzme testinde klinikte kullanılan çeşitli antidepresan ilaçların (MAO inhibitörleri, TSA'lar, SSRI'ler vb.) akut uygulama sonrası hareketsiz kalma sürelerini kısalttığı gösterilmiş ve immobilite süreleri çaresizlik-benzeri davranış ile ilişkilendirilerek antidepresan etkinin göstergesi olarak kabul edilmiştir (Abelaira ve ark., 2013; Czeh ve ark., 2016; Deussing, 2006; Duman, 2010).

Zorunlu yüzme testinin protokolü sıçan ve fareler arasında farklılık göstermektedir (Abelaira ve ark., 2013). Sıçanlar testten 24 saat önce alıştırma seansına alınmaktadır. Alıştırma kapsamında sıçanların 15 dakika boyunca yüzdürülmeleri sağlanır. Alıştırma periyodunun immobilite davranışının test seansında daha iyi gözlenmesine olanak tanıdığı rapor edilmiştir. 24 saat sonra sıçanlar aynı koşullarda teste alınarak 5 dakika boyunca yüzmeleri sağlanarak immobil kalma süreleri kaydedilir. Farelerde gerçekleştirilen zorunlu yüzme testinde alıştırma periyodu yoktur ve test süresi 6 dakika olarak belirlenmiştir. Bu 6 dakikalık test süresinin ilk 2 dakikası alıştırma

periyodu olarak işlev görmekte, immobilité süreleri seansın son 4 dakikasında kaydedilmektedir (Abelaira ve ark., 2013).

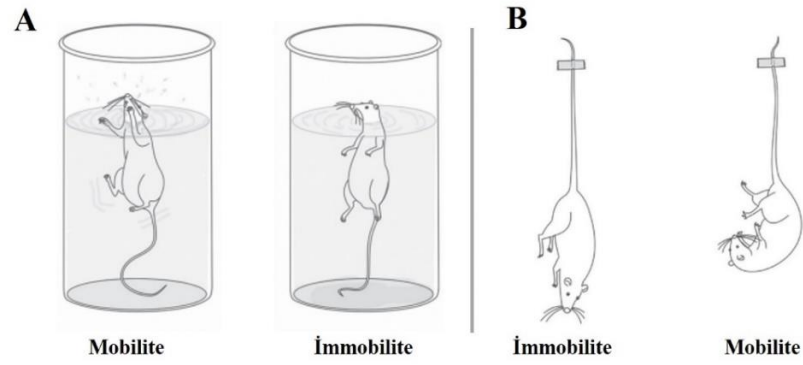
Zorunlu yüzme testi tekrarlanabilirliği yüksek, hızlı ve görece kolay bir test oluşu nedeniyle tercih görmektedir (Abelaira ve ark., 2013; Deussing, 2006).

4.7.2.2. Kuyruktan asma testi

Kuyruktan asma testi; içerik ve değerlendirilen parametre yönünden zorunlu yüzme testine benzeyen ancak yalnızca fareler üzerinde uygulanabilen bir akut tarama testidir (Yan ve ark., 2010). Zorunlu yüzme testi gibi kuyruktan asma testi de farelerde akut antidepresan aktivitenin incelenmesinde yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Kuyruktan asma testinde farelerin kaçmaları mümkün olmayan bir düzenekte kuyruklarından asılmaları sağlanarak, hareketleri kaydedilir. Zorunlu yüzme testinde olduğu gibi değerlendirilen davranış parametresi immobilité süresi olup depresyon-benzeri davranış olarak değerlendirilmektedir (Şekil 26). Çeşitli antidepresan ilaçların kuyruktan asma testinde gözlenen hareketsiz kalma sürelerini kısaltarak kaçma davranışını tetiklediği gösterilmiştir. 6 dakikalık test süresi yaygın olarak kullanılmaktadır. Kuyruktan asma testi de zorunlu yüzme testi gibi uygulaması kolay, hızlı ve yaygın kullanım gören bir yöntemdir. Bilgisayar destekli otomatik ölçüme imkan vermesi bir diğer öne çıkan özelliğidir. Diğer taraftan yalnızca farelerde uygulanabilir olması ise bir dezavantaj olarak karşımıza çıkmaktadır (Abelaira ve ark., 2013; Deussing, 2006; Duman, 2010).

Akut antidepresan etkinin değerlendirildiği zorunlu yüzme ve kuyruktan asma testlerinin, klinikte kullanılan antidepresan ilaçların kronik kullanımı sonucu meydana gelen ve yavaş başlayan etkilerini yansıtmaması bu testlerin önemli bir dezavantajı olarak kabul edilmektedir. Bu bakımdan zayıf görünüş geçerliliğine sahip oldukları kabul edilmektedir (Abelaira ve ark., 2013; Czeh ve ark., 2016; Yan ve ark., 2010).

Günümüzde geçerli kabul edilen deneysel depresyon modellerinin geliştirilmesi ile birlikte zorunlu yüzme ve kuyruktan asma testlerinin uygulama alanları akut antidepresan etki tarama fonksiyonlarının ilerisine taşınmıştır.



Şekil 26. Zorunlu yüzme (A) ve kuyruktan asma (B) testleri. Aktif kaçma davranışı mobilite ile ifade edilirken; kaçma çabasının gözlenmediği hareketsiz kalma davranışı immobilite ile ifade edilmiştir. Her iki testte de immobilite süreleri çaresizlik-benzeri davranış olarak değerlendirilmektedir (Abelaira ve ark., 2013).

Bu testler günümüzde özellikle stres etkenli iyi valide edilmiş depresyon modellerinde modele ek olarak uygulanmaktadır. Bu kapsamda model ile oluşturulan depresyon-benzeri davranışların tespiti ve ayrıca tedavi etkinliklerinin değerlendirilmesinde güvenle ve yaygın kullanılmaktadır (Abelaira ve ark., 2013).

4.7.3. Stresle oluşturulan depresyon modelleri

Strese maruziyetin; depresyon gelişmesinde rol oynayan önemli bir çevresel risk faktörü olduğu bilinmektedir (Duman, 2010). Bu noktadan hareketle deneysel depresyon modellerinin büyük çoğunluğunu; çeşitli stres etkenlerinin kullanılmasıyla oluşturulan akut veya kronik stres modelleri oluşturmaktadır (Deussing, 2006). Bu modeller ile klinik depresyon tablosu ile uyumlu birtakım davranışsal ve patofizyolojik değişimler deney hayvanlarında da yaratılabilmekte ve bu değişimler antidepresan tedavi ile geri döndürülebilmektedir. Bu kapsamda deneysel depresyon çalışmalarında birbirlerine göre birtakım farklılıklar gösteren çeşitli stres modelleri kullanılmaktadır (Deussing, 2006). Bunlar arasında; öğrenilmiş çaresizlik, sosyal stres, maternal yoksunluk ve KÖHS modelleri en yaygın kullanılan stres modellerine örnek olarak verilebilir (Abelaira ve ark., 2013; Czeh ve ark., 2016; Deussing, 2006; Duman, 2010; Yan ve ark., 2010). Stres modellerinin genel olarak iyi etiyolojik, görünüş ve yapısal geçerlilik profiline sahip olduğu kabul edilmektedir. Kronik antidepresan ilaç tedavisine yanıtın değerlendirildiği öngörüselle geçerlilik kriterinin ise bazı

stres modellerinde başarıyla sağlanmasına karşın (örn. kronik hafif stres) diğer bazı modellerde (örn. öğrenilmiş çaresizlik) yeterli düzeyde olmadığı bilinmektedir (Czeh ve ark., 2016).

4.7.3.1. Öğrenilmiş çaresizlik modeli

Major depresyonun önemli ve yaygın görülen belirtilerinden biri de çaresizlik hissidir. Bundan hareketle depresyonun ele alındığı klinik ve preklinik çalışmalarda çaresizlik hissi veya davranışı sıklıkla araştırma konusu olmuştur (Pryce ve ark., 2011). Öğrenilmiş çaresizlik modeli; deneysel depresyon literatürüne bu anlamda ilk kazandırılan ve iyi valide edilmiş modellerden biri olarak karşımıza çıkmaktadır (Seligman ve ark., 1968). Öğrenilmiş çaresizlik modelinde deney hayvanı, kontrol edilemeyen, öngörülemeyen ve kaçmanın mümkün olmadığı kapalı bir düzende tekrarlı olarak elektrik ayak şoku stresine maruz bırakılmaktadır. Daha sonra aynı deney hayvanı, bu kez kaçmanın mümkün ve kolay olduğu açık bir sistemde aynı elektrik şokuna maruz bırakıldığında kaçma davranışını yeterli ölçüde veya hiç sergilemediği görülmektedir. Bu şekilde deney hayvanında çaresizlik tablosunun oluşturulduğu kabul edilmekte ve bu tablo öğrenilmiş çaresizlik olarak nitelendirilmektedir (Abelaira ve ark., 2013; Deussing, 2006; Krishnan ve Nestler, 2011).

Öğrenilmiş çaresizlik modeli oluşturulan hayvanlarda; motor aktivitede değişim, ağırlık kaybı, uyku düzeninde değişim, libido azalması, motivasyon kaybı ve bilişsel bozukluklar gibi klinik depresyon tablosuna benzer belirtilerin meydana geldiği bilinmektedir. Bu yönüyle modelin iyi görünüş geçerliliğine sahip olduğu kabul edilmektedir. Diğer taraftan model ile beyinde azalmış noradrenalin ve serotonin düzeyleri, HPA eksen aktivitesinde artış ve hipokampal bölgede sinaps kaybı gibi depresyon ile ilişkili bazı patofizyolojik değişimlerin tetiklendiği gösterilmiştir (Krishnan ve Nestler, 2011). Öğrenilmiş çaresizlik modeli uygulanan deney hayvanlarında meydana gelen depresyon-benzeri tablonun uzun sürmemesi, belirtilerin birkaç gün içinde ortadan kalkması model ile ilgili öne çıkan dezavantajlardan biridir. Klinikte antidepresan ilaçlar ile kronik kullanımda görülen

etkinin aksine; modelde oluşan depresyon-benzeri tablo kısa süreli antidepresan ilaç kullanımı ile geri döndürülebilmektedir. Bu yönüyle modelin öngörüselle geçerlilik kriterini belli bir düzeyde sağladığı kabul edilebilir. Öğrenilmiş çaresizlik protokolünün farklı laboratuvarlarda farklı şekilde uygulanabilmesi model ile ilgili bir diğer dezavantajı olarak gösterilebilir (Abelaira ve ark., 2013; Deussing, 2006; Krishnan ve Nestler, 2011; Yan ve ark., 2010).

4.7.3.2. Erken yaşam stres modelleri

Yaşamın erken döneminde maruz kalınan birtakım travmatik veya olumsuz deneyimlerin yetişkinlik döneminde depresyon gibi stresle ilişkili patolojilere yatkınlığı artırdığı, bu yönüyle erken yaşam stres maruziyetinin depresyon gelişmesinde rol oynayan önemli risk faktörlerinden biri olduğu kabul edilmektedir (Heim ve Nemeroff, 2001). Ebeveyn kaybı, suistimal, fiziksel veya duygusal ihmal gibi olumsuz deneyimlerin ve pre-/postnatal dönemde karşılaşılan diğer çevresel stres maruziyetinin yetişkin dönem duygudurum bozukluklarının etiyolojisini belirleyen önemli faktörler olduğu yapılan epidemiyolojik çalışmalarda gösterilmiştir (Czeh ve ark., 2016; Heim ve Binder, 2012).

Erken postnatal dönem; sinir sisteminin yüksek plastisite göstererek hızla geliştiği dönemdir. Bu dönemde maruz kalınan çevresel etmenler; yetişkin dönemde davranışları etkileyebilen, mevcut kapasiteyi şekillendirmesi bakımından büyük önem taşımaktadır (Abelaira ve ark., 2013). Deneysel erken yaşam stres modelleri arasında pre-/postnatal stres ve maternal yoksunluk modelleri bulunmaktadır. Bahsi geçen modeller ile yaşamın erken döneminde stres maruziyeti, yetişkinlik döneminde depresyon tablosunu yansıtan davranışsal ve nörobiyolojik fenotipler meydana getirmekte ve bu değişimler antidepresan tedaviler ile geri döndürülebilmektedir (Deussing, 2006).

Maternal yoksunluk modeli en sık kullanılan erken yaşam stres modellerinin başında gelmektedir. Bu model; anne ile yenidoğan arasındaki ilişkinin zarar gördüğü ihmal veya ebeveyn kaybını yansıtan, gelişimsel süreçte etkili erken dönem stresinin taklit edilmesi esasına dayanmaktadır. Bu modelde yavruların postnatal dönemin ilk

iki haftasında her gün belli sürelerde anneden ayrılması sağlanmaktadır. Maternal yoksunluk oluşturulan yavruların yetişkin dönemlerinde anksiyete ve depresyon-benzeri davranışlar sergilediği gösterilmiş; bu belirtilere HPA eksen hiperaktivitesi ve nörotrofik destekte azalmanın eşlik ettiği rapor edilmiştir. Diğer taraftan antidepresan tedavilerle model ile oluşturulan depresyon-benzeri davranışlar geri çevrilmekte ve nörogenezis indüklenmektedir (Reus ve ark., 2011; Ruedi-Bettschen ve ark., 2006). Maternal yoksunluk modeliyle ilgili öne çıkan problemlerden biri farklı protokollerin aynı başlık altında incelenmesi ve dolayısıyla model ile ilgili kimi zaman birbiriyle çelişen farklı etkilerin rapor edilmesidir (Czeh ve ark., 2016).

4.7.3.3. Sosyal yenilgi stres modelleri

Sosyal etkileşimle ilişkili stres faktörlerinin depresyon gelişmesinde rol oynayan önemli çevresel etkenlerden biri olduğu kabul edilmektedir (Bjorkqvist, 2001). Sosyal yönden yenilgiye uğrayan bireylerde kendini yalnız hissetme, anksiyete, sosyal sakınma, özsaygının azalması gibi çeşitli depresyon belirtilerinin eşlik ettiği bilinmektedir (Huhman, 2006). Buradan hareketle deney hayvanlarında oluşturulan sosyal yenilgi modelleri; depresyonun bazı endofenotiplerinin araştırılmasına olanak tanınması bakımından dikkatleri üzerine toplamıştır (Huhman, 2006). Bu kapsamda kullanılan sosyal yenilgi modelleri ikili veya grup şeklinde gerçekleştirilen sosyal etkileşim düzeyinde oluşturulabilmektedir. Sosyal yenilgi stres modeli temel olarak yerleşik-işgalci paradigmasına dayanmaktadır. Model kapsamında erkek sıçan/fareler kullanılmaktadır. Agresif ve dominant deney hayvanı işgalci olarak tanımlanmakta ve aynı türden bir başka hayvanın (yerleşik) bulunduğu ortama alınarak yerleşik hayvan ile fiziksel veya fiziksel olmayan tekrarlı bir etkileşime maruz bırakılmaktadır (Blanchard ve ark., 2001). Bu etkileşim ile sosyal yenilgi oluşturulan yerleşik hayvanda başta anhedoni ve sosyal sakınma olmak üzere, seksüel aktivitede azalma, anksiyete, azalmış motor aktivite ve keşifçi davranış, uyku fizyolojisi veya sirkadyen ritimde değişiklikler, ağırlık kaybı gibi depresyon tablosunu yansıtan değişimler meydana gelmektedir (Blanchard ve ark., 2001; Duman, 2010; Rygula ve ark., 2005). Model ile meydana gelen anhedoni ve sosyal sakınma davranışının uzun süre devam etmesi ve yalnızca kronik antidepresan tedavi ile düzelmesi modelin öne çıkan

özellikleri olarak belirtilmektedir. Davranışlara ek olarak model ile meydana gelen ve klinik depresyonu yansıtan morfolojik, nöroendokrin, nörotrofik ve nörotransmitter sistemler üzerindeki değişimler de kronik antidepresan kullanımı ile geri döndürülebilmektedir (Blanchard ve ark., 2001; Duman, 2010).

4.7.3.4. KÖHS modeli

KÖHS modeli en iyi geçerlilik profiline sahip deneysel depresyon modellerinden biri olarak kabul edilmektedir (Czeh ve ark., 2016). Model ile depresyonun en temel göstergelerinden biri olan anhedoninin deney hayvanlarında oluşturulması mümkün olmaktadır (Willner, 2005). Model; deney hayvanlarının çeşitli çevresel stres etmenlerine öngörülemez bir düzende kronik olarak maruz bırakılması esasına dayanmaktadır. Bu kapsamda deney hayvanlarına; gündüz/gece döngüsünün ters çevrilmesi, eş değişimi, sosyal izolasyon, aç bırakma, soğuk ve sıcak suda yüzdürme, kafes sallama, kafes eğimlendirme, talaş ıslatma, kısıtlama, ve kuyruktan kıştırma gibi hafif etkili stresörler model süresince kronik olarak uygulanmaktadır. Bu süre zarfında deney hayvanları her gün söz konusu stresörlerin bir veya ikisine, aynı stresör ardışık günlerde uygulanmayacak şekilde ve stresörler arasında belirli bir sıralama izlenmeksizin maruz bırakılmakta, böylece deney hayvanının stresörleri öngörmesinin ve strese karşı adaptasyonun önüne geçilmektedir. Model süresi literatürde en az iki hafta olmak üzere 4, 6 hafta veya kimi çalışmalarda aylarla ifade edilen farklı sürelerde bildirilmektedir (Czeh ve ark., 2016; Willner, 2005; Willner, 1997). Model ile meydana gelen davranışsal, nörokimyasal, nöroimmün ve nöroendokrin bozuklukların klinik depresyonu yansıtan düzeyde uzun sürmesi modelin önemli avantajlarından biri olarak kabul edilmektedir (Wiborg, 2013; Willner, 2005; Willner, 1997). Ayrıca model ile deney hayvanlarında oluşan anhedoni-benzeri davranışların yalnızca kronik antidepresan tedavi ile düzelmesi modelin geçerlilik profilini öne çıkaran bir diğer önemli özelliğidir (Czeh ve ark., 2016).

Tarihsel boyutta incelendiğinde modele ilişkin konsept ilk kez 80'li yılların başlarında Katz ve arkadaşları tarafından ortaya atılmış; daha sonra Willner'in izleyen çalışmalarıyla KÖHS adı altında geliştirilmiştir (Katz ve ark., 1981a; 1981b; Willner,

1984; Willner ve ark., 1992). Katz ve arkadaşlarının geliştirdikleri modelde deney hayvanlarına 3 hafta süreyle ağır stresörler uygulanmış ve strese maruz kalan hayvanlarda bazal kortikosteron düzeylerinin yükseldiği ve anhedoninin göstergesi olarak sükroz tercihinin azaldığı gösterilmiştir (Katz, 1982; Katz ve Hersh, 1981a). Katz ve arkadaşlarının çalışmalarından hareketle Willner ve arkadaşları daha hafif stresörlerin daha uzun süre uygulandığı bir modifikasyon geliştirmişlerdir (Willner ve ark., 1987). Willner'in KÖHS adı altında tanımladığı bu yeni dizaynın insanların karşılaştığı günlük yaşam stresini Katz modeline göre daha iyi karşıladığı kabul edilmiştir (Czeh ve ark., 2016; Willner ve ark., 1992; Willner ve ark., 1987).

KÖHS modelinde depresyon-benzeri davranışlar yönünden değerlendirilen temel parametre hedonik aktivitedir. Bu bağlamda anhedoni-benzeri davranışlar sükroz tercih veya sükroz tüketim testleri ile tespit edilebilmektedir (Willner, 2005). Bahsi geçen testlerde belli oranda hazırlanan sükroz çözeltileri deney hayvanlarına sunulmakta ve deney hayvanlarının tükettikleri sükroz çözeltisi miktarları suya karşı (tercih) veya tek başına (tüketim) değerlendirilebilmektedir. Bu noktada anhedoni-benzeri davranışların değerlendirilmesinde kullanılan sükroz tüketiminin hayvanların sıvı ve gıda tüketimi yönelimlerinden etkilenebileceğine ilişkin eleştiriler gündeme gelmiştir. Ancak yapılan çalışmalarla KÖHS modelinin deney hayvanlarında sıvı tüketim davranışını etkilemediği gösterilmiş ve bundan hareketle sükroz tüketiminde meydana gelen azalmanın sükroza özgü bir tercih olduğu doğrulanmıştır (Czeh ve ark., 2016; Willner ve ark., 1992). Diğer taraftan sükroz yerine kalori içermeyen sakkarin çözeltisi kullanıldığı durumda hayvanların tercihinin etkilenmediği gösterilmiş ve dolayısıyla sükroz kalori içeriğinin sükroz tercihinde bir yanlılık oluşturmadığı kabul edilmiştir (Ayensu ve ark., 1995). Ek olarak model ile azalan sükroz tercihinin deney hayvanlarının açlık/tokluk durumundan etkilenmediği de gösterilmiştir (Ayensu ve ark., 1995; Willner, 1997; Willner ve ark., 1992). Söz konusu bulgulardan hareketle model ile azalan sükroz tercihi/tüketiminin fizyolojik değil mental bir fenomen olarak hedonik aktivitedeki azalmanın bir belirteci olabileceği kabul edilmektedir (Wiborg, 2013). KÖHS modelinde anhedoni-benzeri davranışlar dışında seksüel aktivite, agresyon ve keşifçi davranışlarda azalma gibi depresyon tablosunu yansıtan diğer bazı davranışsal değişimler de rapor edilmiştir (Yan ve ark., 2010).

KÖHS modelinde yapısal geçerliliğin göstergesi olarak depresyon nörobiyolojisinde rol oynayan temel patofizyolojik değişimlerin deney hayvanlarında da tetiklendiği bilinmektedir. Bunlar arasında; nörotrofik faktör düzeylerinin azalması, HPA eksen aktivitesinin artması, antioksidan homeostazın bozulması, proinflamatuvar sitokinler aracılı inflamatuvar yanıtların artması ve nörotransmitter metabolizmasında meydana gelen değişimler örnek olarak gösterilebilir (Abelaira ve ark., 2013). Diğer depresyon modelleri arasında KÖHS modelinin etiyolojik, görünüş, öngörüşel ve yapısal geçerlilik kriterlerini en iyi ölçüde sağladığı kabul edilmektedir (Czeh ve ark., 2016; Yan ve ark., 2010). Bu yönüyle olasılıkla en yaygın kullanılan deneysel depresyon modeli olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu önemli avantajının yanında modelin bazı dezavantajları da bulunmaktadır. Bunlardan ilki; model kapsamında gerçekleştirilen deneylerin pratik uygulamalarının zor oluşu ile ilgilidir. Uygulamalar yoğun iş yükü başta olmak üzere, geniş alan ve uygun laboratuvar ortamı gerektirmekte ve söz konusu koşulların görece uzun olan model süresi boyunca kesintiye uğramaması gerekmektedir. Bu yönüyle KÖHS modelinin farklı laboratuvarlarda aynı şartlar altında uygulanması çoğu zaman güç olmakta; bu da model ile ilişkin bilimsel verilerin tekrar edilebilirliğini zorlaştırmaktadır (Abelaira ve ark., 2013; Willner, 2005; Willner, 1997; Yan ve ark., 2010).

4.7.4. Diğer modeller

Deneysel depresyon çalışmalarında görece iyi geçerlilik profiline sahip ve yaygın olarak kullanılan çeşitli stres modellerinin yanında günümüzde daha az kullanılan farmakolojik, genetik, cerrahi lezyon veya inflamasyon ile indüklenen çeşitli depresyon modelleri de bulunmaktadır (Yan ve ark., 2010).

Deney hayvanlarında depresyonun modellenmesinde geliştirilen ilk yaklaşımlar depresyonda monoamin hipotezini temel alan farmakolojik uygulamaları kapsamaktadır. Bu uygulamalar; çeşitli farmakolojik manipülasyonlar aracılığıyla deney hayvanlarında monoaminergic aşırımda düzensizlik veya monoamin eksikliği oluşturulması esasına dayanmaktadır (Czeh ve ark., 2016; Deussing, 2006; Yan ve ark., 2010). Farmakolojik modellerin en tipik örneği rezerpin uygulaması ile

oluşturulan depresyon modelidir (Willner, 1984). Antihipertansif ve antipsikotik etkileri bilinen rezerpin; monoamin yapıdaki nörotransmitterleri seçici olmayan bir şekilde tüketmesinden yola çıkılarak geçmiş tarihli çalışmalarda deney hayvanlarında depresyon modeli oluşturmak için kullanılmış; lokomotor aktivite ve vücut sıcaklığında azalma, pitozis gibi etkileri rapor edilmiştir (Czeh ve ark., 2016; Deussing, 2006; Willner, 1984). Rezerpin modeli ile oluşturulan lokomotor aktivitede azalma ve pitozis klinikte kullanılan ve monoamin hipotezini hedef alan bazı antidepressanlar ilaçlar ile geri çevrilebilir olmasına karşın; temel depresyon belirtilerinin deney hayvanlarında rezerpin uygulaması ile oluşmaması modele ilişkin en büyük eleştirilerden biridir (Czeh ve ark., 2016; Deussing, 2006; Willner, 1984). Farmakolojik modellere bir diğer örnek ise psikostimülan yoksunluğu ile oluşturulan modellerdir (Barr ve Markou, 2005). Bu model; insanlarda amfetamin, kokain gibi psikostimülan maddelerin kronik kullanım sonucu maddenin yoksunluğuna bağlı olarak görülen davranışsal ve fizyolojik değişikliklerin depresyonun bazı semptomları ile büyük ölçüde paralellik göstermesi esasına dayanmaktadır (Deussing, 2006). Benzer şekilde; deney hayvanlarına kronik olarak uygulanan amfetamin veya kokain gibi psikostimülan maddelerin yoksunluğunda hayvanlarda ödül yanıtlarının bozulduğu, ödül eşik seviyelerinin yükseldiği ve akut tarama testlerinde hareketsiz kalma sürelerinin uzadığı gösterilmiştir. Modele bağlı oluşan bu davranışsal değişimler antidepressan uygulaması ile geri döndürülebilmektedir (Barr ve Markou, 2005; Czeh ve ark., 2016; Deussing, 2006). Rezerpin ve psikostimülan yoksunluğu ile oluşturulan farmakolojik modellerde depresyon-benzeri davranışlar görülmesi nedeniyle psikostimülan yoksunluğu modelinin rezerpin modelinden üstün olduğu kabul edilmektedir (Deussing, 2006). Bahsi geçen farmakolojik modellerin kısıtlı geçerlilik profiline sahip olmaları, depresyon nörobiyolojisindeki güncel görüşleri yansıtmaması nedeniyle günümüzde bu modellerin yerini iyi valide edilmiş stres etkenli depresyon modelleri almıştır (Yan ve ark., 2010).

Bilateral olfaktör bulbektomi; ilk kez Leonard tarafından 1984 yılında geliştirilen bir cerrahi depresyon modelidir (Leonard, 1984). Olfaktör bulbektomi; meydana getirdiği fizyolojik, nörokimyasal ve davranışsal değişiklikler bakımından klinik depresyon tablosunu iyi yansıttığı düşünülen, iyi valide edilmiş ve yaygın kabul

görmüş bir depresyon modelidir (Kelly ve ark., 1997; Song ve Leonard, 2005). Cerrahi olarak olfaktör bulbus'ların alınmasıyla oluşturulan model ile oluşan tipik davranışsal değişimler arasında motor aktivitede artış, keşifçi ve sosyal davranışlarda bozulma, öğrenme-bellek kayıpları ve anhedoni sayılabilir (Hendriksen ve ark., 2015). Bu bağlamda görülen davranışsal değişimlerin olfaktör bulb'ların korteks, amigdala, hipokampus gibi çeşitli mezokortikal ve subkortikal beyin bölgeleri ile olan yoğun sinirsel bağlantıları ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir. Model ile bu bölgelerdeki iletişimin kesilmesi söz konusu beyin yapılarında depresyon tablosunda görülen nörobiyolojik ve biyokimyasal bozukluklara yol açmaktadır (Rinwa ve Kumar, 2014; Song ve Leonard, 2005). Olfaktör bulbektomi modelinde gelişen depresyon-benzeri davranışlara mevcut antidepresan ilaçların akut uygulamalarıyla yanıt alınamazken, ancak kronik uygulama sonrası davranış düzeyinde iyileştirici etkilerin görülmesi; hastalığın klinik yönünü önemli ölçüde taklit eden bir model olarak kabul görmesini beraberinde getirmiştir. Bunun yanında olfaktör bulbektomi sonucu limbik beyin bölgelerinde meydana gelen progresif, dejeneratif süreçler ve locus coeruleus, dorsal rafe çekirdekleri gibi yapılarda görülen noradrenerjik ve serotonerjik sistem disfonksiyonları gibi patolojik değişikliklerin hastalığın klinik patogenezini önemli ölçüde yansıttığı düşünülmektedir (Pudell ve ark., 2014; Rinwa ve Kumar, 2014; Song ve Leonard, 2005).

Özellikle son yıllarda genetik alandaki ilerlemeler doğrultusunda genetik depresyon modelleri gündeme gelmiştir. Genetik yapıları değiştirilen mutant fareler ile yapılan çalışmalarla çeşitli genlerin depresyonla ilişkisi araştırılabilmektedir (Yan ve ark., 2010). Bu kapsamda özellikle depresyon nörobiyolojisine ilişkin nörotrofik faktörler, HPA eksen aktivitesi veya monoamin teorilerini hedef alan genetik çalışmalar ön planda yer almaktadır (örn. 5-HT_{1A} reseptör knockout, noradrenalin transporter knockout, CRH reseptör-1 knockout, BDNF-knockout fare modelleri, gibi) (Barkus, 2013; Heisler ve ark., 1998; Muller ve ark., 2003; Xu ve ark., 2000). Bu alanda geliştirilen mutant farelerin ancak az bir kısmı genetik depresyon modeli veya stres maruziyeti ile gelişen depresif sendroma yatkınlık modeli olarak kabul edilebilmektedir (Yan ve ark., 2010). Genetik modellerin geçerlilik kriterlerini iyi ölçüde sağlamadığı kabul edilmektedir. Bu modeller ile genellikle tek bir proteini

(reseptör, taşıyıcı gibi) kodlayan gen üzerinden gerçekleştirilen manipölasyonlar; karmaşık depresyon patofizyolojisinin yeterli ölçüde yansıtılmasını mümkün kılmamaktadır (Czeh ve ark., 2016). Genetik modellerin zayıf görünüş ve öngörüsöl geçerliliğine sahip oldukları; etiolojik ve yapısal geçerliliklerinin ise kısıtlı ölçüde var olduğu kabul edilmektedir. Genetik modellere ilişkin bir diğör sorun; modelin genellikle fareler ile kısıtlı kalışı, diğör taraftan farelerin davranışlarının değörlendirilmesinde kullanılan testlerin büyük çoğunluğunun ise sıçanlara yönelik oluşu ile ilgilidir (Czeh ve ark., 2016).



5. GEREÇ ve YÖNTEM

5.1. Kimyasal Maddeler

Çalışmada imipramin HCl (Sigma-Aldrich®; I7379), agmatin sülfat (Sigma-Aldrich®; A7127), aminoguanidin HCl (Sigma-Aldrich®; 396494), 3-Br-7-NI (Alfa Aesar®; J63840), dimetilsülfoksit (DMSO) (Merck®; 116743) ve süktroz (Glentham®; GC4473) kullanıldı. İmipramin HCl, agmatin sülfat ve aminoguanidin HCl %0,9 serum fizyolojik içerisinde ve 3-Br-7-NI ise %50 (h/h) oranında DMSO içeren serum fizyolojik çözünüsü içerisinde çözündürüldü. Tüm maddeler uygulama öncesi taze olarak hazırlandı. Süktroz ise yalnızca süktroz tercih testinde kullanılmak üzere testin yapılacağı günlerde hazırlandı. Moleküler incelemelerde NLRP1 (Cell Signaling®, 4990S), NLRP3 (Biorbyt®, orb101128), kaspaz-1 (Santa cruz®, sc-56036), ASC (Biorbyt®, orb136866), β -aktin (Santa Cruz Biotechnology®, sc-1616-R) ve IL-1 β (Abbkine®, ABP52932), immünohistokimyasal incelemelerde ise GFAP (Millipore®, MAB3402) antikorları kullanıldı. Çalışmada kullanılan gen primerleri ise DNA Technology® (DN-10) firmasından temin edildi.

5.2. Deney Hayvanları ve Ortam Koşulları

Çalışmada deney hayvanı olarak erişkin erkek (290-315 gram) Sprague Dawley sıçanlar kullanıldı ve Marmara Üniversitesi Hayvan Deneyleri Araştırma Merkezi'nden temin edildi. Sıçanlar depresyon modeli kapsamında yapılan uygulamalar dışında çalışma süresince standart laboratuvar koşullarında; 12 saat aydınlık, 12 saat karanlık döngüsünde, sabit sıcaklık ($22\pm 2^\circ\text{C}$) ve nem (% 65-70 bağıl nem) sağlanan, özel havalandırılmalı ortamda barındırıldı. Standart pleksiglas kafeslerde (27x40x18 cm) ve her kafeste 4-5 sıçan olacak şekilde gruplandırıldı. Model gereği 24 saat aç bırakma periyotları dışında su ve yem kısıtlaması yapılmadı. Tüm davranış deneyleri günün aydınlık periyodunda gerçekleştirildi. Çalışmanın model oluşturma ve davranış deneyleri Gülhane Askeri Tıp Akademisi Deney Hayvanları Laboratuvarı'nda, moleküler analizler İstanbul Üniversitesi Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü Sinirbilim Anabilim Dalı Laboratuvarı'nda, immünohistokimyasal analizler ise Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji

Anabilim Dalı Araştırma Laboratuvarı'nda yürütüldü. Tüm hayvan deneyleri etik kurallar ve esaslarına uygun olarak gerçekleştirildi. Bu çalışma Marmara Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun onayı ile yürütüldü (Protokol Kodu: 55.2015.mar).

5.3. Deney Grupları

Çalışmada kullanılan sıçanlar randomize olarak 6 gruba ayrıldı. Tedavi uygulamaları 6 haftalık KÖHS modelinin son 3 haftası (21 gün) boyunca yapıldı. Buna göre;

Kontrol Grubu (n=12): Herhangi bir çevresel stres etkenine maruz bırakılmayan ve diğer gruplara paralel olarak aynı zaman dilimlerinde, 3 hafta süreyle 0,1 ml/100 g olacak şekilde serum fizyolojik (n=6) veya çözücü (n=6) (i.p) uygulanan sıçanları ifade etmektedir.

KÖHS Grubu (n=11): KÖHS depresyon modeli oluşturulan ve tedavi gruplarına paralel olarak aynı zaman dilimlerinde 3 hafta süreyle 0,1 ml/100 g olacak şekilde serum fizyolojik (n=6) veya çözücü (n=5) (i.p) uygulanan sıçanları ifade etmektedir.

KÖHS+İMİ Grubu (n=12): KÖHS depresyon modeli oluşturulan ve diğer gruplara paralel olarak 3 hafta süreyle 10 mg/kg/gün dozunda imipramin HCl (i.p) uygulanan sıçanları ifade etmektedir.

KÖHS+AGM Grubu (n=12): KÖHS depresyon modeli oluşturulan ve diğer gruplara paralel olarak 3 hafta süreyle 40 mg/kg/gün dozunda agmatin sülfat (i.p) uygulanan sıçanları ifade etmektedir.

KÖHS+iNOSi Grubu (n=12): KÖHS depresyon modeli oluşturulan ve diğer gruplara paralel olarak 3 hafta süreyle 50 mg/kg/gün dozunda iNOS inhibitörü aminoguanidin HCl (i.p) uygulanan sıçanları ifade etmektedir.

KÖHS+nNOSi Grubu (n=11): KÖHS depresyon modeli oluşturulan ve diğer gruplara paralel olarak 3 hafta süreyle 20 mg/kg/gün dozunda nNOS inhibitörü 3-Br-7-NI (i.p) uygulanan sıçanları ifade etmektedir.

5.4. KÖHS Modeli

Çalışmamızda KÖHS depresyon modeli kullanıldı. İlk kez 1980’li yılların sonlarında Willner ve arkadaşları tarafından tanımlanan KÖHS modeli; deneysel hayvan modellerinin geçerlilik ve güvenilirliğinin belirlenmesinde kabul gören 3 temel kriteri (görünüş, yapısal ve öngörülse geçerlilik) sağlayan, bu yönüyle günümüzde çeşitli modifikasyonlarla yaygın olarak kullanılan bir depresyon modelidir (Czeh ve ark., 2016; Willner ve ark., 1992; Willner ve ark., 1987). Bu çalışmada model 6 hafta süreyle uygulandı ve sıçanlar aşağıda belirtilen hafif stresörlere öngörülemez bir düzende (aynı stresör ardışık olmayacak biçimde ve her defasında günün farklı bir zaman diliminde), her gün bir veya ikisine maruz bırakıldı. Kontrol grubu ise bu süre boyunca stres gruplarından farklı bir odada, standart laboratuvar koşulları korunarak barındırıldı ve araştırmacı ile karşılaşma, elle tutulma, tartım, kafes temizliği, su/yem sağlama ve enjeksiyonlar dışında herhangi bir çevresel stres etmenine maruz bırakılmadı. Uygulanan stresörler;

- 1) Kuyruk kıstırma (1 dakika)
- 2) Kafes sallama (10 dakika)
- 3) Soğuk suda yüzdürme ($13\pm1^{\circ}\text{C}$ / 5 dakika)
- 4) Talaş ıslatma (Yaklaşık 200 ml su ile her kafeste bulunan talaşın 24 saat süre ile ıslak kalması)
- 5) Kafes eğimlendirme (45 derece/24 saat)
- 6) Sıcak suda yüzdürme ($40\pm1^{\circ}\text{C}$ / 5 dakika)
- 7) Gündüz/gece döngüsünün ters çevrilmesi (24 saat)
- 8) Yiyecek erişiminin engellenmesi (24 saat)
- 9) Kafesler arası eş değişimi (48 saat)

Sıçanların uygulanan stresörleri öngörmemesi, dolayısıyla olası bir adaptasyonun önlenmesi amacıyla bazı hususlara dikkat edildi. Buna göre;

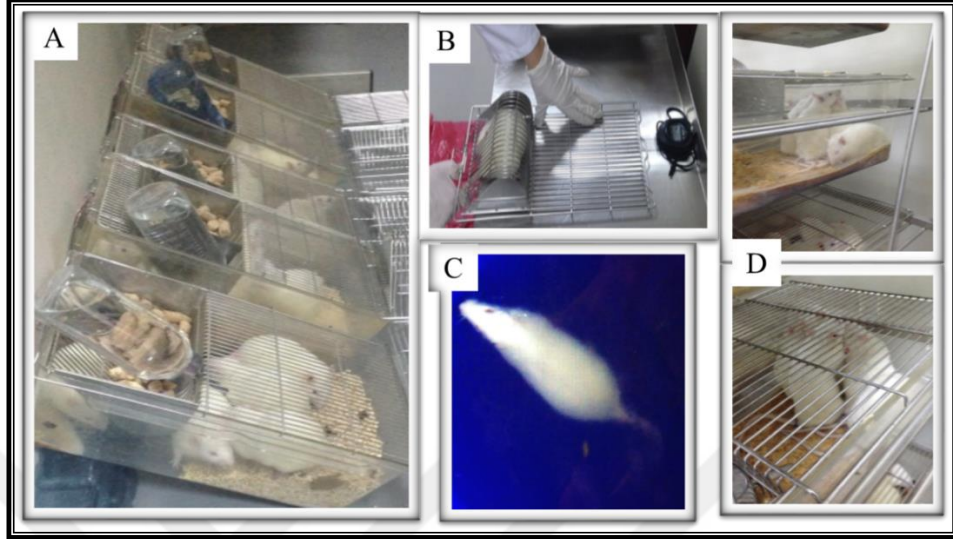
- 1) Aynı sıçana aynı stresör ardışık günlerde uygulanmadı.
- 2) Stresör sıralaması birbirini tekrar etmeyecek şekilde planlandı.
- 3) Stresörler farklı gün ve saatlerde uygulanacak şekilde planlandı. Bu kapsamda uygulanan 6 haftalık stresör takvimi Tablo 8’de gösterildi.

Tablo 8. Haftalık KÖHS prosedürü takvimi

6 haftalık stresör takvimi							
Haftalar	Pazartesi	Salı	Çarşamba	Perşembe	Cuma	Cumartesi	Pazar
1.		Kafes sallama (10 dk)	Soğuk suda yüzdürme (5 dk)	Talaş ıslatma (24 saat) →	Talaş ıslatma bitiş		Kafesler arası eş değişimi (48 saat)
					Kuyruk kıstırma (1 dk)		
2.	Kafesler arası eş değişimi bitiş		Aç bırakma (24 saat) →	Aç bırakma bitiş			Kafesler arası eş değişimi (48 saat)
	Kafes eğimlendirme (24 saat) →	Kafes eğimlendirme bitiş		Gündüz/gece döngüsünün ters çevrilmesi (24 saat)	Bitiş Kafes sallama (10 dk)		
		Sıcak suda yüzdürme (5 dk)					
3.	Kafesler arası eş değişimi bitiş			Sıcak suda yüzdürme (5 dk)	Gündüz/ gece döngüsünün ters çevrilmesi (24 saat) →	Bitiş	Kuyruk kıstırma (1 dk)
	Aç bırakma (24 saat) →	Aç bırakma bitiş -STT*-				Kafes sallama (10 dk)	
	Soğuk suda yüzdürme (5 dk)	Kafes eğimlendirme (24 saat) →	Kafes eğimlendirme bitiş				
			Kuyruk kıstırma (1 dk)				
4.	Kafesler arası eş değişimi (48 saat) →	Kafesler arası eş değişimi bitiş			Sıcak suda yüzdürme (5 dk)		Kafesler arası eş değişimi (48 saat)
		Kafes eğimlendirme (24 saat) →	Kafes eğimlendirme bitiş				
			Talaş ıslatma (24 saat) →	Talaş ıslatma bitiş			
5.	Kafesler arası eş değişimi bitiş		Kuyruk kıstırma (1 dk)	Kafes sallama (10 dk)	Soğuk suda yüzdürme (5 dk)	Gündüz/gece döngüsünün ters çevrilmesi (24 saat) →	Bitiş
	Aç bırakma (24 saat) →	Aç bırakma Bitiş -STT*-					Kafesler arası eş değişimi (48 saat)
	Soğuk suda yüzdürme (5 dk)	Kafes sallama (10 dk)					
6.	Kafesler arası eş değişimi (48 saat) →	Kafesler arası eş değişimi bitiş	Talaş ıslatma (24 saat) →	Talaş ıslatma bitiş	Sıcak suda yüzdürme (5dk)	Soğuk suda yüzdürme (5 dk)	Kafes eğimlendirme (24 saat)
	Kafes eğimlendirme bitiş	Aç bırakma (24 saat) →	Aç bırakma Bitiş -STT*-				
	Gündüz/gece döngüsünün ters çevrilmesi (24 saat) →	Bitiş					

* STT; sükröz tercih testi

Model kapsamında uygulanan söz konusu stresörlerin bazılarına ilişkin deney görüntülerine Resim 1’de yer verildi.



Resim 1. KÖHS modelinde uygulanan bazı stresörler. A; kafes eğimlendirme (~45 derece, 24 saat), B; kuyruk kıştırma (1 dakika), C; soğuk/sıcak suda yüzdürme ($13\pm1/40\pm1^{\circ}\text{C}$ 5 dakika), D; talaş ıslatma (~200 ml su/kafes, 24 saat)

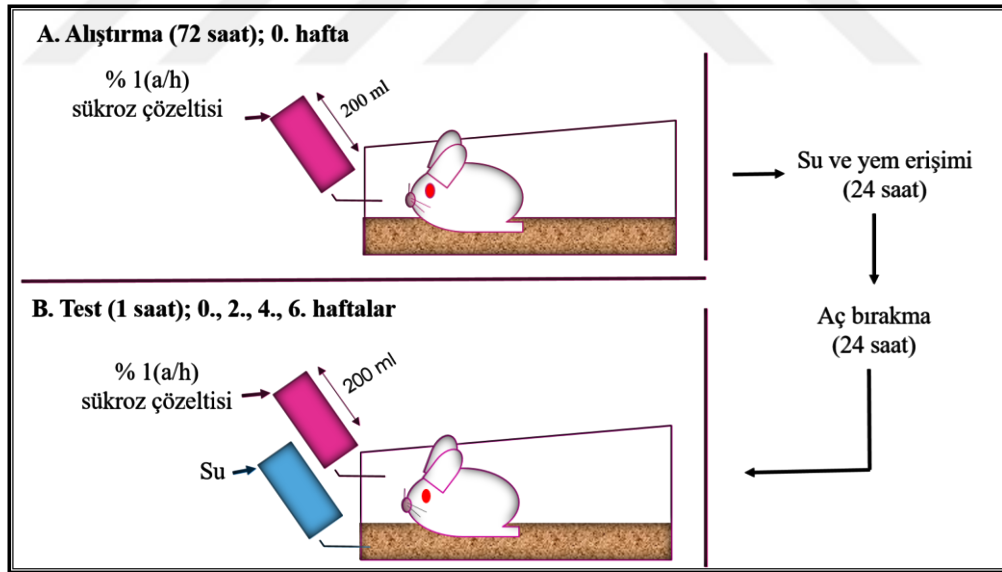
5.5. Davranış Testleri

5.5.1. Sükroz tercih testi

KÖHS modelinde; depresyonun önemli klinik belirtilerinden biri olarak kabul edilen anhedoninin deney hayvanlarında değerlendirilmesi mümkün olmaktadır. KÖHS modelinde anhedoninin tespiti için sükroz tercih testi yaygın olarak kullanılmaktadır (Willner, 2005; Willner, 1997). Test temel olarak sıçan, fare gibi kemirgenlerin normal şartlarda suya karşı şeker (sükroz) içeren çözeltiyi tercih etmeleri esasına dayanmaktadır. Sükroza olan tercihin azalması hedonik aktivitede azalma veya anhedoninin bir göstergesi olarak kabul edilmektedir (Wiborg, 2013). Sükroz tercih testi çalışmamızda depresyon modeli oluşturulmadan önce ve model sırasında iki haftalık aralıklarla toplam 4 kez (0., 2., 4., 6. haftalar) uygulandı. Literatürde yaygın kullanılan bu tekrarlı test tasarımı ile anhedoninin stres uygulamasının hangi döneminde geliştiği ve tedaviye ne zaman başlanabileceğine karar verebilmek mümkün olmaktadır (Wiborg, 2013). Bu yönüyle gerek depresyon

modelinin oluştuğunun gösterilmesi gerekse antidepresan etki potansiyelinin zamana bağlı irdelenmesine olanak tanınması açısından çalışmamızda da sükroz tercih testi tekrarlı uygulandı.

Bu doğrultuda, depresyon modeli oluşturulmadan önce başlangıç (bazal) sükroz tercih düzeylerinin tespit edilmesi için tüm sıçanlar teste alındı. Testten önce sıçanların %1 (a/h) sükroz içeren musluk suyuna alışmaları sağlandı. Bu alıştırma kapsamında sıçanların barınma kafeslerine 72 saat boyunca çift su şişesi içerisinde %1’lik sükroz çözeltisi (200 ml) yerleştirildi ve bu süreçte musluk suyu ve yem erişimleri engellendi. 72 saat sonunda sükroz çözeltileri kafeslerden alınarak; sıçanlar 24 saat süre ile normal beslenme koşullarına geri döndürüldü. Ertesi gün yem erişimleri engellenerek 24 saat aç bırakılan sıçanlar bu sürenin sonunda sükroz tercih testine alındı. Sıçanların sükroz çözeltisine alıştırılması için yapılan bu uygulama bazal testten önce olmak üzere deney süresince yalnızca 1 kez yapıldı (şekil 27). Testte akıtmayan bilyeli suluklar kullanıldı. Sulukların kafese yerleştirme ve alma işlemleri akıtmayı engelleyecek biçimde dikkatle yürütüldü.

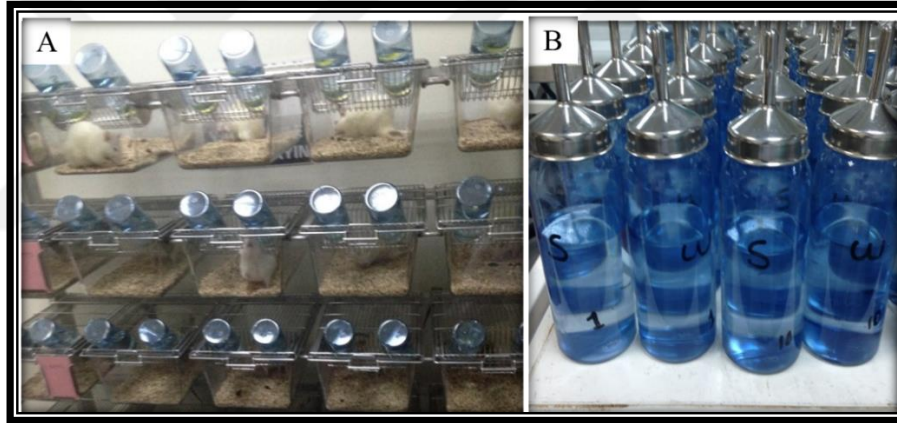


şekil 27. Sükroz tercih testinin yapılışı. A; alıştırma, B; test seanslarını göstermektedir. Sıçanlar, 0. hafta gerçekleştirilen bazal testten önce 72 saat süreyle sükroz çözeltisine alıştırıldı (A). Bu amaçla su/yem erişimleri engellenen sıçanlara 72 saat boyunca %1 (a/h) sükroz çözeltisi sunuldu. Alıştırma periyodundan sonra sıçanlar 24 saat süreyle normal beslenme düzenlerine geri döndürüldü ve bunu takip eden 24 saatlik açlık sonrası teste alındı.

Bu testte her bir sıçan tek tek kafeslere alındı ve her kafese biri %1 süktroz çözeltisi diğeri ise musluk suyu içeren 200 ml'lik 2 adet şişe (suluk) sunuldu (Resim 2). Suluklar; kafeslere sol ve sağ hizalardan olmak üzere standart bir biçimde yerleştirildi. Sıçanlarda sulukların konumlarına karşı gelişebilecek olası bir tercih yanlılığını önlemek amacıyla su ve süktroz çözeltisinin konumları her test seansında değıştirildi. Sulukların kafeslere yerleştirilmesinden hemen sonra 1 saatlik test süresi başlatılarak test odası terkedildi. Test öncesi ve sonrası sulukların tartımları kaydedilerek her bir sıçan için % süktroz tercihi aşğıdaki formüle göre hesaplandı:

$$\% \text{ Süktroz tercihi} = \frac{\text{Tüketilen süktroz çözeltisi (g)}}{\text{Tüketilen toplam sıvı miktarı (g)}} \times 100$$

Test sonunda sıçanlar önceki kafes düzenlerine geri döndürüldü ve yem/su erişimleri yeniden sağlandı.



Resim 2. Süktroz tercih testi düzeneğı. Sıçanların tek tek yerleştirildikleri test kafesleri ve her kafese sağ ve sol hizalardan sunulan ikişer adet biyeli suluk görülmektedir (A). Sulukların birinde 200 ml su, diğesinde ise aynı hacimde %1'lik süktroz çözeltisi bulunmaktadır. Testten önce su ve süktroz içeren suluklara numara ve isim verildi (B) (Örneğın; W ile isimlendirilen suluk suyu; S ile isimlendirilen suluk ise süktroz çözeltisini ifade etmektedir).

Bu alanda yapılan çalışmalarda da önerildiğı üzere; sıçanların bazal süktroz tercihi verilerine göre deney grupları yeniden düzenlendi ve buna göre süktroz tercihi %60'ın altında olan sıçanlar deney dışı bırakıldı (Deng ve ark., 2015a; 2015b; Pan ve ark., 2014; Taksande ve ark., 2013). Bunun amacı; KÖHS prosedürüne başlamadan önce tüm grupların süktroz tercihlerinin birbirinden anlamlı ölçüde farklı olmadığı ve her

grupta bulunan sıçanların % sükröz tercihi değerin kabul edilebilir sağlıklı düzeyde ($\geq 55-60$) olduğundan emin olunmasıdır. Söz konusu dizayn KÖHS modelini kullanan birçok çalışmada yaygın olarak kullanılmaktadır (Wiborg, 2013).

5.5.2. Zorunlu yüzme testi

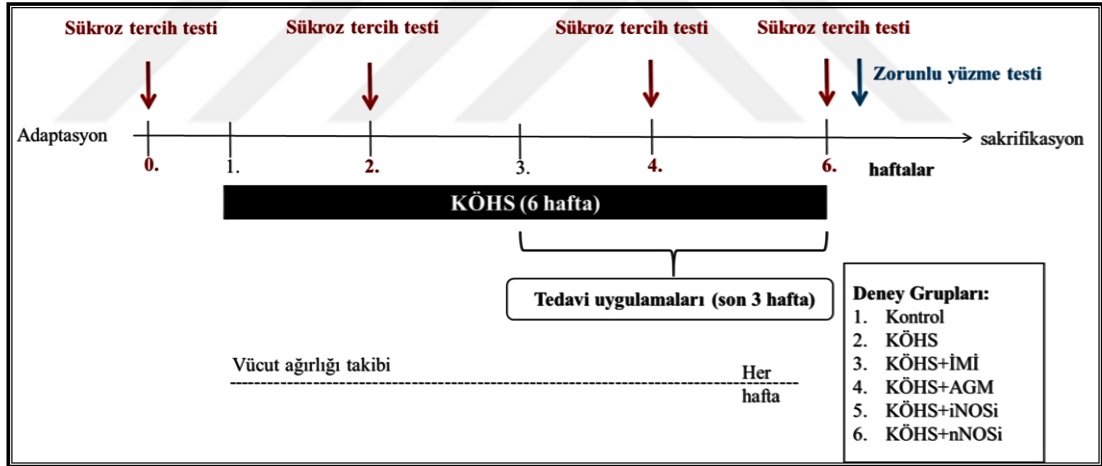
Zorunlu yüzme testi yaygın olarak kullanılan bir antidepresan aktivite tarama testi olup, ilk kez 1977 yılında Porsolt tarafından geliştirilmiştir (Porsolt ve ark., 1977). Test, fare veya sıçanların belirli yükseklikte su ile doldurulmuş bir silindir fanus içinde belirli sürede yüzdürülmesi esasına dayanır. Zorunlu yüzme testi sıçanlarda 24 saat ara ile gerçekleştirilen alıştırmaya ve test kısımlarından oluşmaktadır. Testte değerlendirilen temel parametre hareketsiz kalma (immobilite) süreleridir. İmmobilite; sıçanın başını suyun üstünde tutmaya yetecek kadar küçük hareketler yapmak dışında hareketsiz kalma durumu; diğer bir ifade ile sıçanın aktif yüzme davranışını sergilemediği anlar şeklinde değerlendirilmektedir (Abelaira ve ark., 2013; Czeh ve ark., 2016; Deussing, 2006; Duman, 2010). Bu sürenin uzaması depresyonun önemli belirtilerinden biri olan çaresizlik davranışı ile ilişkilendirilirken; antidepresan etkinliğin bu süreyi kısalttığı bilinmektedir (Deussing, 2006).

Çalışmamızda alıştırmaya günü sıçanlar sabit ve nötral ısıda ($25 \pm 1^\circ\text{C}$) su ile doldurulmuş 40 cm yüksekliğinde 14 cm çapında silindir fanuslar içerisine yavaşça bırakılarak 15 dakika süresince yüzmeleri sağlandı. Su yüksekliği sıçanların kaçma veya kuyruktan destek almalarına imkan verilmeyecek şekilde ayarlandı (yaklaşık 30 cm). Alıştırmadan 24 saat sonra gerçekleştirilen test seansında sıçanlar aynı koşullar altında bu kez 5 dakika boyunca yüzdürülerek sıçanların hareketleri bu esnada video kaydına alındı ve immobilite süreleri değerlendirildi (Resim 3). Testin sonunda fanustan alınan sıçanlar bir havlu yardımıyla kurularak sıcak bir ortama alındı ve bir sonraki hayvan için fanusların içerisindeki su değiştirildi.



Resim 3. Zorunlu yüzme testi düzeneği.

Zorunlu yüzme testinden sonra sıçanlar sakrifiye edilerek çalışmanın hayvan deneyleri bölümü sonlandırıldı. Bu kapsamda çalışma süresince deney hayvanları üzerinde gerçekleştirilen prosedürler Şekil 28’de gösterildi.



5.6. Moleküler Analizler

5.6.1. Dekapitasyon ve fiksasyon

Davranış deneyleri tamamlanan sıçanlar randomize olarak iki gruba ayrıldı. Buna göre moleküler analizlerde kullanılacak olan sıçanlar dekapite edilip beyin dokuları çıkarıldı. Ardından makroskopik diseksiyonla prefrontal korteks ve hipokampus bölgeleri ayrılıp hemen sıvı azotta dondurularak analizlerin yapıldığı tarihe kadar -80 °C’de saklandı. İkinci grup ise immünohistokimyasal incelemeler için ketamin/ksilazin anestezisi altında paraformaldehit ile perfüzyon fiksasyona alındı.

İmmünohistokimyasal analizler için sıçanlar ketamin (100 mg/kg) ve ksilazin HCl (10 mg/kg) anestezisi altında paraformaldehit perfüzyon fiksasyonuna alındı. Perfüzyon fiksasyonu; 0,1 M fosfat tamponu (pH: 7,3) içinde taze olarak hazırlanmış %4’lük paraformaldehit çözeltisi ile otomatik perfüzyon pompası kullanılarak gerçekleştirildi. Bunun için sternumun hemen altından deri penset ile kavranak, bir makas yardımıyla deriye dik açılı bir kesi atıldı. Künt diseksiyonla kesi tüm göğüs kafesi boyunca genişletildi. Ardından dik açıyla yapılan ikinci bir kesi ile iç organ kavitelerine girildi ve kesi kostalar boyunca genişletildi. Diyafram ayrılarak kalp ekspozite edildi ve penset yardımıyla tutulan sol ventriküle kesi atılarak (bakan göze göre apex’in hafif sağı) enjektör yardımıyla sol ventrikülden aortaya girildi. Vena cava inferiora kesi atılıp perfüzyon pompası çalıştırıldı ve paraformaldehit çözeltisinin dolaşımı sağlandı. Bir sıçan için perfüzyon süresi yaklaşık 6 dakika olarak kaydedildi. Perfüzyon işlemi sonrasında tüm beyin çıkarılarak paraformaldehit çözeltisi içerisine alındı ve gece boyunca 4°C’de aynı fiksatifte postfiksasyona bırakıldı (Resim 4).

5.6.2. Gen ekspresyon analizleri

5.6.2.1. RNA izolasyonu

RNA izolasyonu için hazır ticari solüsyonlar kullanıldı (MRC® RNAzol RT, RN190). Sıçan prefrontal korteks ve hipokampus beyin dokuları -80°C’den buz üzerine alındı. Her örnekten yaklaşık 100 mg doku örneği alınarak 5 ml eppendorf tüpü içerisine konuldu ve üzerine 1ml RNAzol RT solüsyonu eklendi.



Resim 4. Paraformaldehit perfüzyon fiksasyonu

Ardından dokular homojenize edildi (Qiagen Tissue Ruptor®). Homojenizasyon lizatu üzerine 400 µl su eklendi, karışım 15 saniye boyunca çalkalandı ve 15 dakika bekletildi. Daha sonra 12 000 g'de 15 dakika santrifüje edilerek 1ml süpernatant ayrıldı. Üzerine 5 µl 4-bromoanizol eklenerek 15 saniye çalkalanıp, 4 dakika bekletildi. Ardından 12 000 g'de 10 dakika santrifüje edilerek 750 µl hacminde süpernatant ayrıldı. Üzerine aynı oranda izopropanol eklenip 15 dakika bekletildi. 12 000 g'de 15 dakika santrifüje edilip süpernatantı ayrılan çökelti üzerine 400 µl %75 etanol eklendi. 4000 g'de 3 dakika santrifüje edildi. Bu işlem bir kez daha tekrarlandı. Santrifüj sonunda süpernatant atılarak çökelti üzerine 50 µl RNase free su eklendi ve karışım oda ısısında 2-3 dakika vortekslendi.

İzolasyon işlemi tamamlandıktan sonra tüm örneklerde RNA konsantrasyonları ve saflıkları ölçüldü (Thermo Scientific Nanodrop 2000®). 1µl RNA örneği alınarak konsantrasyon miktarı ve saflık oranları (260/280 ve 260/230) belirlendi. RNA örnekleri; komplementer DNA (cDNA) sentezinde kullanılmak üzere analizlerin gerçekleştirildiği tarihe kadar -80°C'de saklandı.

5.6.2.2. cDNA sentezi

RNA eldesinden sonra bir diğer basamak olan cDNA sentezine geçildi. cDNA sentezi için hazır ticari kitler kullanıldı (Jena Bioscience®, PCR511) . Tüm işlemler buz üzerinde ve laminar akım kabini içinde gerçekleştirildi. cDNA sentezi öncesi tüm RNA konsantrasyonları 100 ng/μl olacak şekilde eşitlendi. cDNA reaksiyonu; örnek başına toplam reaksiyon hacmi 20 μl olacak şekilde; RNase free su (10 μl), Script RT buffer (4 μl), dNTP mix (1 μl), Oligo dT Primer (0,5 μl), DTT (1 μl), RNase inhibitörü (1 μl), enzim (0,5 μl) ve RNA ürün (2 μl) cDNA sentez kiti bileşenleri ile gerçekleştirildi. Enzim eklemeyen önce; tüpteki tüm reaktifler birkaç kez pipet ile karıştırıldı ve tüpler Bio-Rad® termal cyclers cihazına alındı. cDNA sentez reaksiyonu; 42°C’de 10 dakika, 50°C’de 60 dakika ve 70°C’de 10 dakika döngüsünde gerçekleştirildi. Bu süre sonunda elde edilen cDNA örnekleri analiz edilinceye kadar -20°C’de saklandı.

5.6.2.3. Real-time PCR

cDNA eldesinden sonra araştırılması hedeflenen genlerin ekspresyon analizleri gerçek-zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (real-time polimerase chain reaction; rt-PCR) yöntemi ile gerçekleştirildi. PCR işlemi için hazır ticari kitler kullanıldı (Jena Bioscience®, qPCR GreenMaster with UNG/lowROX kit, PCR306). Çalışmada kullanılan primerler Tablo 9’da gösterilmiş olup; tüm primerler DNA Technology® (DN-10) firmasından temin edildi. Tüm işlemler buz üzerinde ve laminar akım kabini içinde gerçekleştirildi. PCR; örnek başına toplam reaksiyon hacmi 20 μl olacak şekilde PCR grade su (6,8 μl), Real Time Master Mix (10 μl), Forward Primer (0,6 μl), Reverse Primer (0,6 μl) ve cDNA ürün (2 μl) kit bileşenleri üzerinden gerçekleştirildi. 96 kuyucuklu plaka içine konulan standart ve örnek karışımları Agilent Stratagene 3005P® cihazına konularak reaksiyon gerçekleştirildi. PCR sonrası elde edilen eşik dönüğü değerlerine (Ct; cycle threshold) 2^{-ddCt} metodu uygulandı:

$$2^{-ddCt} = 2^{-[(Ct_{grup} - Ct_{grup \text{ housekeeping}}) - (Ct_{kontrol} - Ct_{kontrol \text{ housekeeping}})]}$$

Tablo 9. Çalışmada kullanılan primer dizileri.

Primer	Baz Dizisi (Forward)	Baz Dizisi (Reverse)
NLRP1	GTTGCAAGTCCCTTCAGCTC	CATCTCTGTTTCCGAGCACA
NLRP3	CCATGAGCTCCCTTAAGCTG	TTGCACAGGATCTTGCAGAC
Kaspaz-1	GCTTGAAAGACAAGCCCAAG	CCTTTCAGTGGTTGGCATCT
ASC	GCAATGTGCTGACTGAAGGA	TGTTCCAGGTCTGTCACCAA
IL-1 β	AGGCTTCCTTGTGCAAGTGT	TGAGTGACACTGCCTTCCTG
IL-18	ATATCGACCGAACAGCCAAC	ATCCCCATTTTCATCCTTCC
IL-6	CCGGAGAGGAGACTTCACAG	ACAGTGCATCATCGCTGTTC
iNOS	CACCTTGGAGTTCACCCAGT	ACCACTCGTACTTGGGATGC
eNOS	GCAAGACCTCCTGAGGACAG	TAGGCAAGCGCTTTACCACT
nNOS	GACAACGTTCTGTGGTCCT	GAAGAGCTGGTCCTTTGTGC
β -aktin	GCCCCCGGTTTCTATAAATTG	GTCGAACAGGAGGAGCAGAGA

5.6.3. Western blot protein ekspresyon analizleri

Prefrontal korteks doku örnekleri -80°C'den alınarak; 50 mM Tris-HCl, % 1 Ipegal 630, 150 mM NaCl, % 0,5 sodyum deoksikolat, % 0,1 sodyum dodesil sülfat (SDS), PMSF, aprotinin, leupeptin, ve TritonX içeren tamponda homojenize edildi (Tissue Ruptor-Qiagen Sample and Assay Technologies®). Ardından % 10'luk doku homojenatları hazırlandı. Homojenatlar 30 dakika buzda inkübasyona bırakıldıktan sonra +4°C'de 500 g'de 5 dakika santrifüje edildi ve supernatantlar ayrıldı. Ardından +4°C'de 5000 g'de 10 dakika santrifüje edilerek süpernatant ayrıldı ve örnekler aynı tamponla resuspende edilerek 10 saniye süresince sonikasyon işlemine tabi tutuldu. Süpernatant içeren homojenatlar 13-14 000 g'de 10 dakika santrifüje edilerek süpernatantlar alındı. Süpernatant fraksiyonlarında bişikonik asit yöntemi ile protein tayini yapıldı (Smith ve ark., 1985). SDS-poliakrilamid jeller hazırlandı ve süpernatantlar sulandırıldıktan sonra Laemli tamponu ile karıştırılarak 50 μ g protein/kuyucuk olacak şekilde kuyucuklara yüklendi. 100 voltta (30 mA) yaklaşık 1,5 saat elektroforez yapıldıktan sonra jeller çıkarılarak Poliviniliden florid (PVDF) membrana (Millipore®) proteinler transfer edildi. PVDF membran, % 3 yağsız

süt tozu ve % 0,05 Tween 20 içeren fosfat tamponlu tuz çözeltisi ile 1 saat bloke edildi. Membranlar anti-NLRP1 (1:200) (Cell Signaling®, 4990S), anti-NLRP3 (1:200) (Biorbyt®, orb101128), anti-kaspaz-1 (1:50) (Santa cruz®, sc-56036), anti-IL-1 β (1:1000) ve anti-ASC (1:400) antikorlarıyla tüm gece +4°C’de inkübe edildi. Membranlar fosfat tamponlu tuz çözeltisi ile yıkandıktan sonra ‘goat anti-rabbit’ sekonder antikor horse radish peroksidaz (HRP)-konjuge IgG (Santa Cruz Biotechnology®, sc-2004) ile 1 saat inkübe edildi (1:2000). İnkübasyon sonunda membranlar 3x10 dakika fosfat tamponlu tuz çözeltisi ile yıkandı. Daha sonra kemilüminesans kiti (Thermo Scientific®, ECL Western blotting substrate) ile ışıma yaptırıldı (Resim 5).

Oluşan bantlar görüntülenerek bilgisayar sistemine aktarıldıktan sonra miktar tayini Licor® bilgisayar programı ile yapıldı. İnternal standart olarak β -aktin kullanıldı. Membranlar %2,5 SDS içeren 25 mM Glisin tamponu (pH: 2,5) ile 60°C’de 30 dakika inkübe edilerek soyuldu. Anti- β -aktin rabbit poliklonal antikor (Santa Cruz Biotechnology®, sc-1616-R) ile işaretlendi. Her bir örneğin β -aktin miktarı tayin edilerek tüm örnekler β -aktin ile standardize edildi.

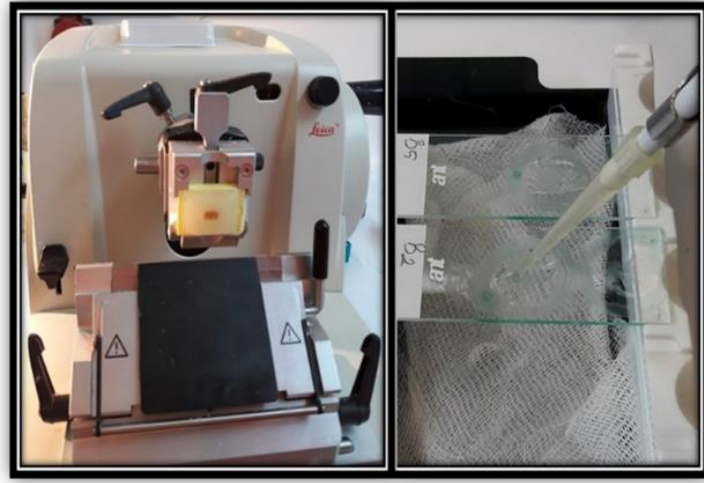


Resim 5. Western blot deneyleri.

5.7. İmmünohistokimyasal Analizler

Fikse edilen beyinler dorsal hipokampus seviyesinden kesilerek küçültüldü ve doku takip cihazı (Leica TP 1020®) ile yükselen alkol serilerinden (%70, %90, %96, %100) geçirilerek dehidrate edildi. Ksilende şeffaflandırmanın ardından gece boyunca sıvı parafin içerisinde 60°C'lik etüvde bekletildi. Daha sonra doku gömme cihazında (Leica EG 1150 C®) kasetlerle bloklama işlemi uygulandı. Daha sonra döner mikrotom (Leica RM 2125 RT®) ile 5 mikron kalınlığında alınan parafin kesitler; deparafinizasyon için ksilolde bekletildi. İnen alkol serilerinden geçirilen kesitler %3 hidrojen peroksit solüsyonu ile 10 dakika muamele edildikten sonra çeşme suyu ve distile su ile yıkandı. Antijen geri kazanımı için mikrodalga fırında sodyum sitrat solüsyonu uygulandı ve fosfat tamponu ile yıkama yapıldı. Kesitlerin etrafı Pap pen ile çizilerek bloklama solüsyonunda bekletildi (Resim 6).

Hipokampal kesitlerde nöroinflamasyonun temel göstergelerinden glial aktivasyonunun değerlendirilmesi amacıyla glial fibriller asidik protein (GFAP) immünoreaktivitesi incelendi. Bunun için kesitlerin üzerine anti-GFAP (Millipore®, MAB3402) antikoru uygulanarak 37°C'de etüvde nemli ortam sağlanarak 1 saat bekletildi. Biyotinli sekonder antikorda 20 dakika tutulan kesitler HRP streptavidinde (Invitrogen®, Histostain Plus Broad Spectrum, 859043) 20 dakika bekletildi. Ardından 3,3'-diaminobenzidin (DAB) (Invitrogen®, DAB Plus Substrate Kit, 002020) uygulandı. Zıt boyama için Mayer hematoksileni kullanıldı. Çeşme suyunda yıkandıktan sonra kesitler yükselen alkol serilerinden geçirilerek kurutuldu ve entellan ile kapatıldı. Mikroskopik inceleme ve fotoğraflama için Olympus® DP72 CCD kamera sistemi eklentili Olympus® BX51 ışık mikroskobu kullanıldı. Hipokampus bölgesinde x 400 büyütmede toplam 5 alanda GFAP immünreaktif hücreler sayıldı ve 5 alanın ortalaması alındı.



Resim 6. Mikrotom cihazında kesit alınması ve antikor uygulaması

5.8. Verilerin İstatistiksel Analizi

Verilerin istatistiksel analizi GraphPad Prism 5[®] bilgisayar programı kullanılarak yapıldı. Zamana bağlı incelenen sükröz tercih testi ve vücut ağırlığı verilerinin istatistiksel analizinde iki faktörlü varyans analizi yöntemi kullanıldı, post-hoc Bonferroni testi uygulandı. Diğer bulguların analizinde ise tek yönlü varyans analiz yöntemi ve post-hoc Tukey testi kullanıldı. Tüm veriler ortalama±standart hata şeklinde gösterildi. P değerinin <0,05 olduğu durumlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

6. BULGULAR

6.1. Vücut Ağırlığı Bulguları

Sıçanların ağırlıkları deney süresince haftada bir kaydedildi (Tablo 10). Model oluşturulmadan önce gruplar arasında bazal vücut ağırlıkları bakımından bir anlamlı bir farklılık olmadığı saptandı. Grupların 6 hafta sonunda kaydedilen ağırlıkları kendi bazal değerleri ile karşılaştırıldığında; Kontrol ($p<0,001$), KÖHS ($p<0,01$) ve KÖHS+AGM ($p<0,05$) gruplarında ortalama ağırlıkların zamana bağlı olarak anlamlı düzeyde arttığı görüldü. KÖHS+İMİ ve KÖHS+iNOSi gruplarında ise zamana bağlı bir artma eğilimi görülmesine karşın, bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. Diğer taraftan KÖHS+nNOSi grubunun vücut ağırlığında zamana bağlı azalma eğilimi görülürken, bu azalma kendi bazal değerleri ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmadı. Gruplar arası karşılaştırmalarda ise KÖHS+nNOSi grubunun ortalama ağırlık bulguları 4. ($p<0,05$) ve 6. ($p<0,01$) haftalarda kontrol grubuna göre; 4. ($p<0,05$), 5. ($p<0,05$) ve 6. ($p<0,001$) haftalarda ise KÖHS grubuna göre anlamlı ölçüde az bulundu.

Tablo 10. Deney grupları ağırlık bulguları (g). Veriler ortalama $\pm$ standart hata şeklinde gösterildi. İstatistiksel analiz iki faktörlü varyans ile yapıldı, Post-hoc Bonferroni testi uygulandı ($n=9-10/\text{grup}$). * $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$ bazal değerler ile, + $p<0,05$, ++ $p<0,01$ kontrol grubu ile, # $p<0,05$, ### $p<0,001$ KÖHS grubu ile anlamlı farklılığı göstermektedir. Kronik öngörülemez hafif stres; KÖHS imipramin; İMİ, agmatin; AGM, iNOSi; iNOS inhibitörü, nNOS inhibitörü; nNOSi.

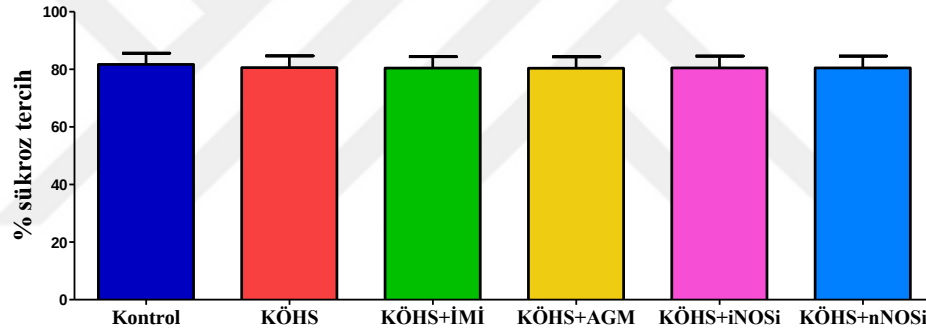
Hafta	Kontrol	KÖHS	KÖHS+İMİ	KÖHS+AGM	KÖHS+iNOSi	KÖHS+nNOSi
Bazal	300,5 $\pm$ 11	315,2 $\pm$ 9	312,0 $\pm$ 9	292,9 $\pm$ 9	314,8 $\pm$ 12	292,0 $\pm$ 11
1.	314,3 $\pm$ 12	314,2 $\pm$ 10	316,8 $\pm$ 10	305,0 $\pm$ 10	322,0 $\pm$ 12	301,0 $\pm$ 10
2.	327,7 $\pm$ 12	310,0 $\pm$ 10	320,5 $\pm$ 10	294,3 $\pm$ 9	312,0 $\pm$ 13	296,0 $\pm$ 11
3.	323,8 $\pm$ 10	323,5 $\pm$ 10	333,0 $\pm$ 9	309,9 $\pm$ 10	324,9 $\pm$ 13	303,0 $\pm$ 10
4.	334,0 $\pm$ 12	315,8 $\pm$ 10	316,4 $\pm$ 9	297,0 $\pm$ 9	322,3 $\pm$ 12	279,0 $\pm$ 10 ^{+,#}
5.	310,7 $\pm$ 12	326,0 $\pm$ 10	314,3 $\pm$ 8	304,1 $\pm$ 10	326,0 $\pm$ 12	288,6 $\pm$ 9 [#]
6.	334,6 $\pm$ 16 ^{***}	336,4 $\pm$ 10 ^{**}	320,0 $\pm$ 9	309,4 $\pm$ 11 [*]	331,7 $\pm$ 13	283,0 $\pm$ 9 ^{++,###}

6.2. Davranış Bulguları

Çalışmamızda KÖHS modeli ve uygulanan tedavilerin antidepresan etki potansiyeli sükröz tercih ve zorunlu yüzme testleri ile değerlendirildi.

6.2.1. Sükröz tercih testi

Bazal testte elde edilen % sükröz tercihi bulgularına göre her grupta hedonik aktivite bakımından sağlıklı bir örneklem düzeyine erişilecek şekilde (ortalama % sükröz tercihi ≥ 60) deney grupları oluşturuldu. Buna göre; bazal sükröz tercih değeri %60'ın altında kalan sıçanlar doğal anhedonik kabul edilerek çalışma dışı bırakıldı. Oluşturulan deney grupları arasında ortalama bazal % sükröz tercihi değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilmedi (Şekil 29).

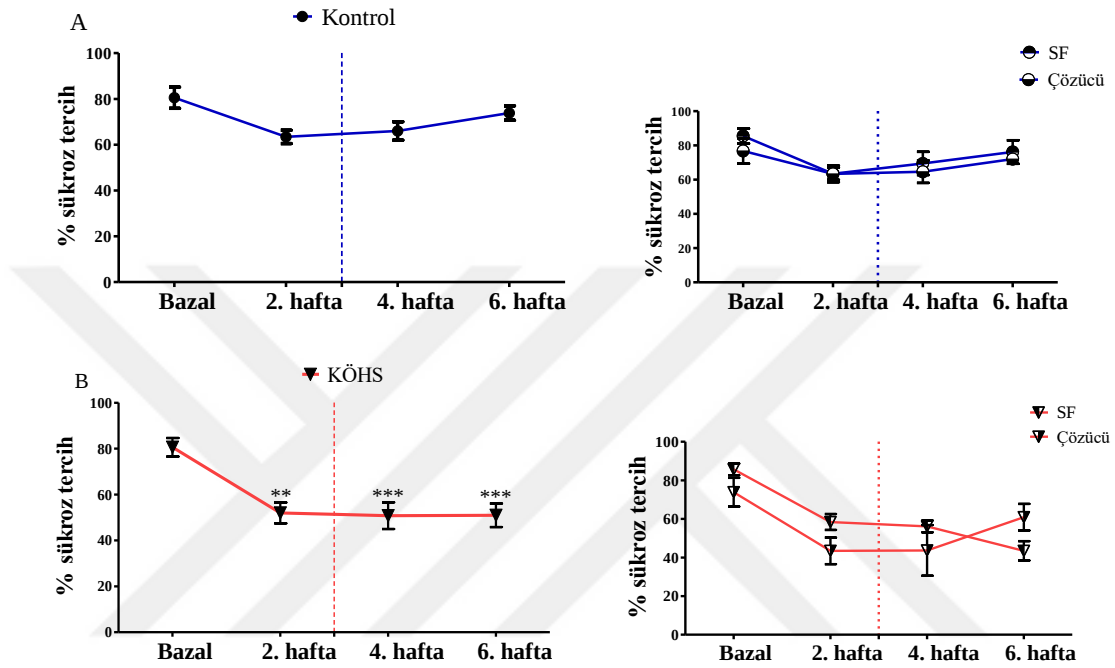


Şekil 29. Deney gruplarının bazal sükröz tercih değerleri. Veriler ortalama $\pm$ standart hata şeklinde gösterildi. İstatistiksel analiz tek yönlü varyans analizi ile yapıldı (n=8-10/grup). Kronik öngörülemez hafif stres; KÖHS, agmatin; AGM, imipramin; İMİ, iNOS inhibitörü, iNOSi; nNOS inhibitörü, nNOSi.

6 haftalık KÖHS prosedürü süresince zamana karşı incelenen sükröz tercih testi verilerinin istatistiksel analizlerinde iki yönlü varyans analizi yöntemi kullanıldı. Sükröz tercih testi verileri grup içi zamana bağlı değişimler ve gruplararası karşılaştırmaların ayrı olarak incelenmesine olanak tanınması açısından ayrı grafikler olarak gösterildi.

Kontrol grubunun sükröz tercihinde deney süresince zamana bağlı anlamlı bir değişim meydana gelmediği görüldü (Şekil 30A). KÖHS grubunda ise sükröz tercihi;

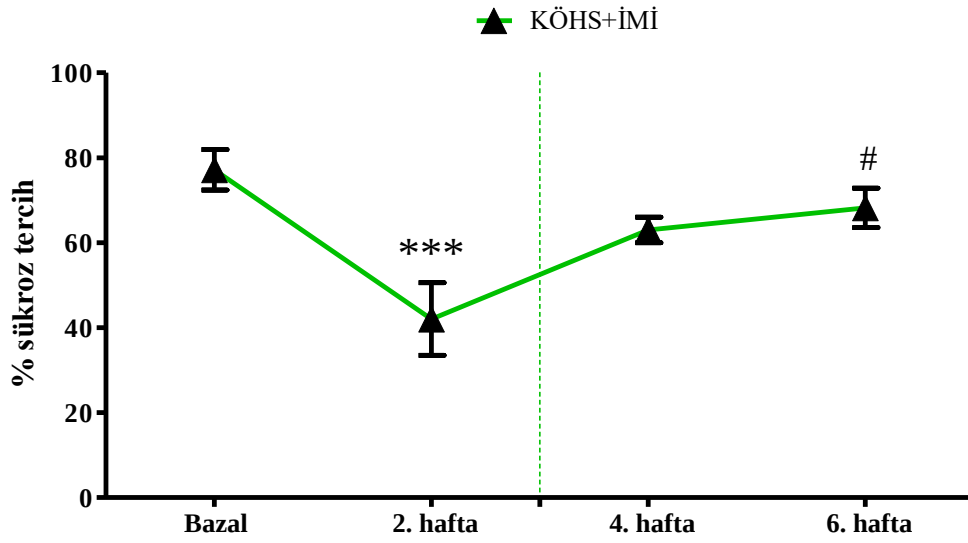
stres uygulamasının 2. haftasından itibaren grubun bazal değerlerine göre anlamlı ölçüde azaldı ($p<0,01$) ve bu azalma 4. ve 6. haftalarda daha da artarak devam etti ($p<0,001$) (Şekil 30B). Kontrol ve KÖHS gruplarında serum fizyolojik veya çözücü uygulamalarının sükroz tercihinde anlamlı bir farklılık oluşturmadığı görüldü (Şekil 30).



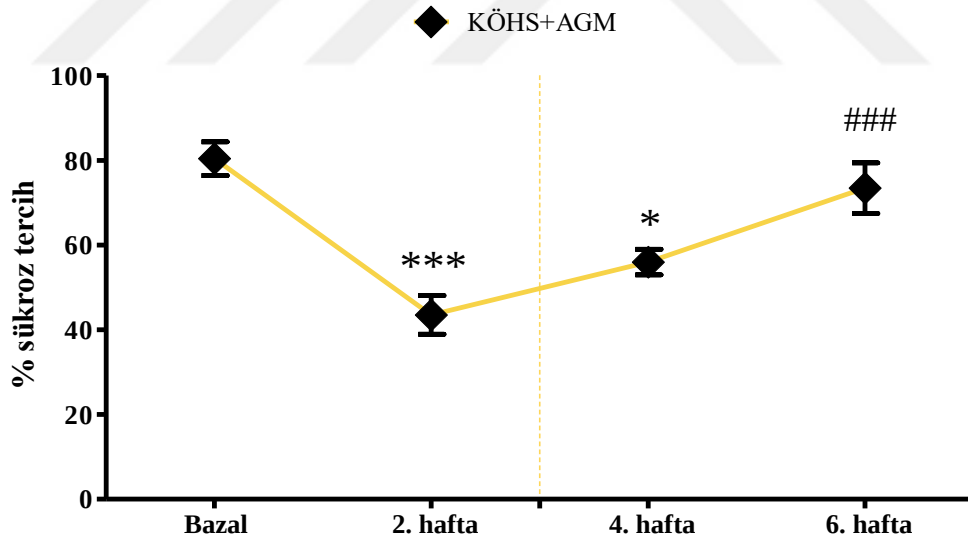
Şekil 30. Kontrol (A) ve KÖHS (B) gruplarının sükroz tercihleri. Veriler ortalama $\pm$ standart hata şeklinde gösterildi. İstatistiksel analiz iki faktörlü varyans analizi ile yapıldı. Post-hoc Bonferroni testi uygulandı ($n=9-10/\text{grup}$). $**p<0,01$, $***p<0,001$; bazal değeri ile anlamlı farklılığı göstermektedir. Kesikli çizgi tedavi başlangıcını göstermektedir. Kronik öngörülemez hafif stres; KÖHS.

KÖHS grubunda olduğu gibi tedavi öncesi KÖHS+İMİ grubunda da 2. hafta sükroz tercihleri grubun bazal değerlerine göre anlamlı düzeyde azalırken ($p<0,001$); strese bağlı olarak oluşan bu azalmanın 3 haftalık imipramin tedavisi sonunda (6.hafta) anlamlı ölçüde arttığı görüldü ($p<0,05$) (Şekil 31).

Benzer şekilde KÖHS+AGM grubunda da kronik strese bağlı olarak 2. hafta istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azalan sükroz tercihinin ($p<0,001$); agmatin uygulaması ile 4. haftada arttığı ve 6. haftada grubun bazal bulgularına yakın değerlerine ulaştığı gösterildi ($p<0,001$) (Şekil 32).

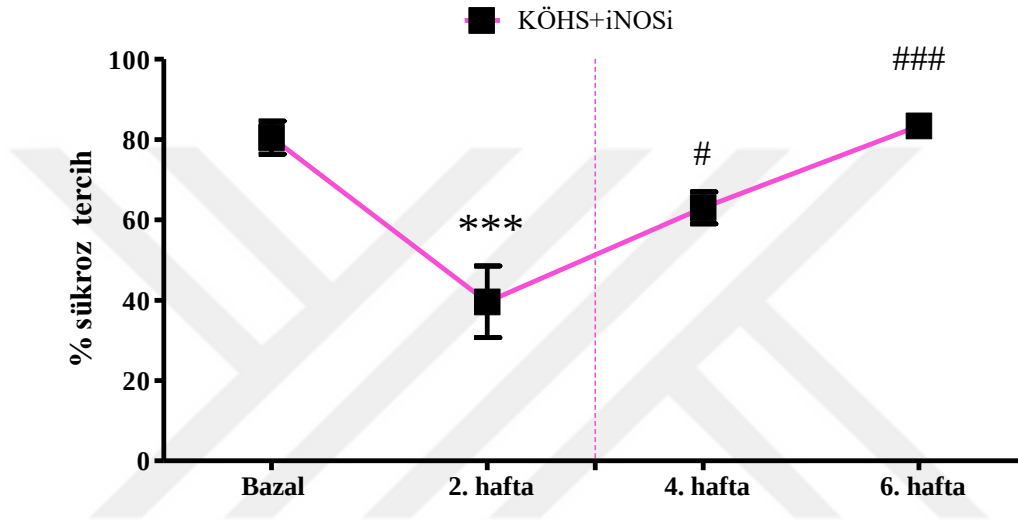


Şekil 31. İmipramin grubunun sükröz tercihi. Veriler ortalama $\pm$ standart hata şeklinde gösterildi. İstatistiksel analiz iki faktörlü varyans analizi ile yapıldı. Post-hoc Bonferroni testi uygulandı ($n=8/\text{grup}$). *** $p<0,001$; bazal değerler ile, # $p<0,05$; 2. hafta değerleri ile anlamlı farklılığı göstermektedir. Kesikli çizgi tedavi başlangıcını göstermektedir. Kronik öngörülemeden hafif stres; KÖHS, imipramin; İMİ.



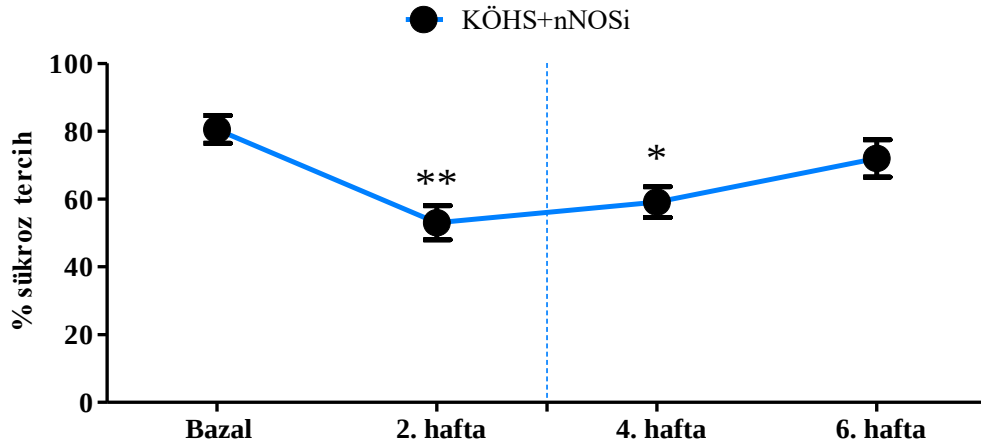
Şekil 32. Agmatin grubunun sükröz tercihi. Veriler ortalama $\pm$ standart hata şeklinde gösterildi. İstatistiksel analiz iki faktörlü varyans analizi ile yapıldı. Post-hoc Bonferroni testi uygulandı ($n=8/\text{grup}$). ** $p<0,01$, *** $p<0,001$; bazal değerler ile, ### $p<0,001$; 2. hafta değerleri ile anlamlı farklılığı göstermektedir. Kesikli çizgi tedavi başlangıcını göstermektedir. Kronik öngörülemeden hafif stres; KÖHS, agmatin; AGM.

iNOS inhibitörü aminoguanidin tedavisi alan KÖHS+iNOSi grubunda 2.haftadan itibaren stres ile azalan sükröz tercihi ($p<0,001$) tedavi ile 4. haftada ($p<0,05$) artış gösterirken 6. haftada stres uygulanması öncesindeki değerlere ulaştı ($p<0,001$) (Şekil 33). nNOS inhibitörü 3-Br-7-NI tedavisi alan KÖHS+nNOSi grubunda stres uygulamasının 2. haftasında azalan sükröz tercihinde ($p<0,01$) tedaviye bağlı bir artış eğilimi görülmesine karşın söz konusu değişim istatistiksel düzeyde anlamlı bulunmadı (Şekil 34).

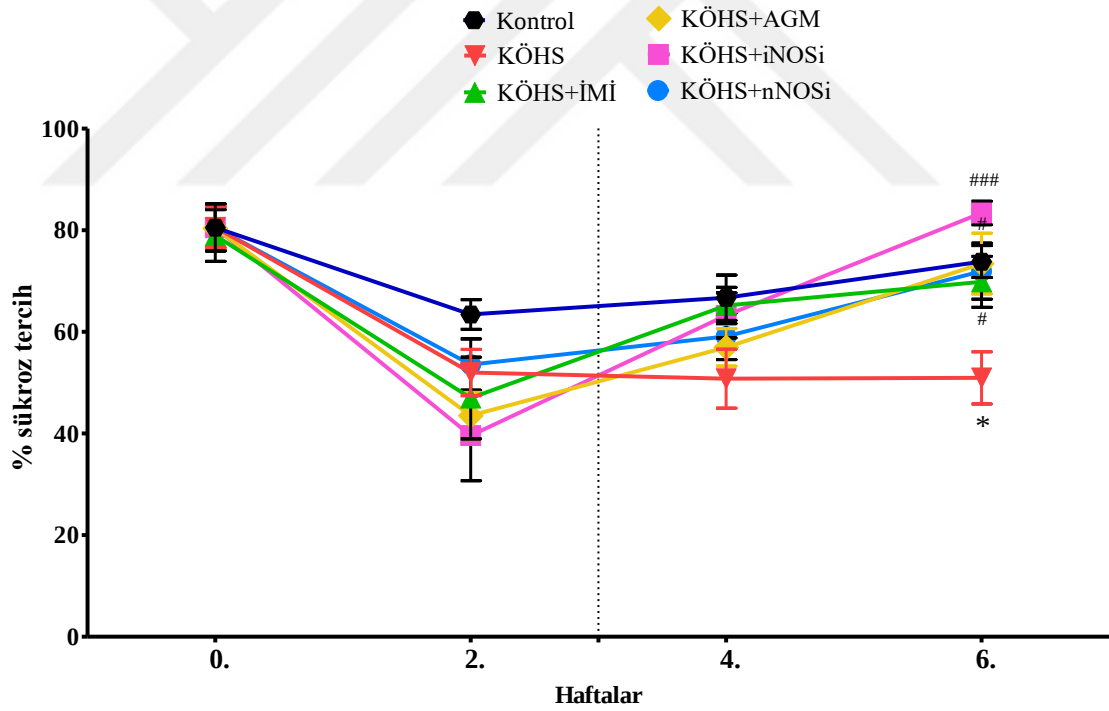


Şekil 33. Aminoguanidin grubunun sükröz tercihi. Veriler ortalama $\pm$ standart hata şeklinde gösterildi. İstatistiksel analiz iki faktörlü varyans analizi ile yapıldı. Post-hoc Bonferroni testi uygulandı ($n=8$ /grup). *** $p<0,001$; bazal değerler ile, # $p<0,05$, ### $p<0,001$; 2. hafta değerleri ile anlamlı farklılığı göstermektedir. Kesikli çizgi tedavi başlangıcını göstermektedir. Kronik öngörülemez hafif stres; KÖHS, iNOS inhibitörü (aminoguanidin); iNOSi.

Yukarıda grup içi zamana bağlı değişimleri sunulan gruplar karşılaştırıldığında, 6 haftalık stres uygulaması sonunda KÖHS'e maruz bırakılan sıçanların % sükröz tercihi kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde azalmış bulundu ($p<0,05$). İmipramin tedavisi alan grupta sükröz tercihi KÖHS grubuna göre artmış olmasına karşın söz konusu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. Diğer yandan agmatin ($p<0,05$), iNOS inhibitörü aminoguanidin ($p<0,001$) ve nNOS inhibitörü 3-Br-7-NI ($p<0,05$) tedavisi alan sıçanların sükröz tercihleri, tedavi almayan KÖHS grubuna göre anlamlı düzeyde yüksek bulundu. (Şekil 35).



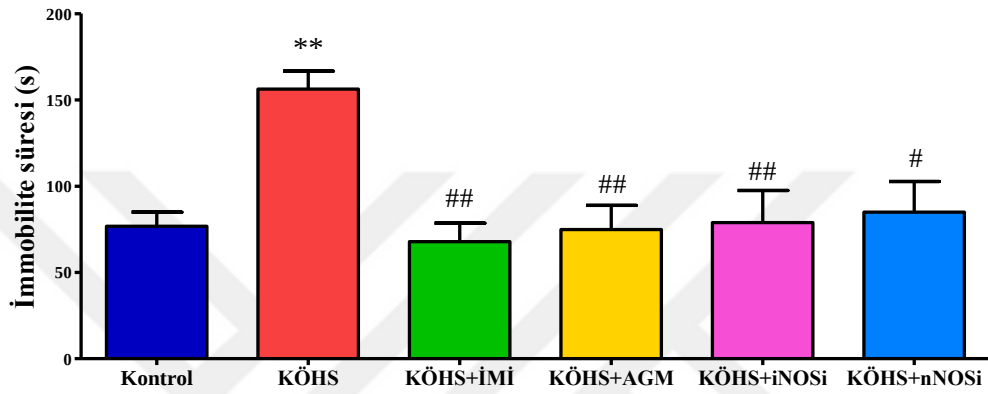
Şekil 34. 3-Br-7-NI grubunun sükroz tercihi. Veriler ortalama $\pm$ standart hata şeklinde gösterildi. İstatistiksel analiz iki faktörlü varyans analizi ile yapıldı. Post-hoc Bonferroni testi uygulandı ($n=8/\text{grup}$). * $p<0,05$, ** $p<0,01$; bazal değerler ile anlamlı farklılığı göstermektedir. Kesikli çizgi tedavi başlangıcını göstermektedir. Kronik öngörülemez hafif stres; KÖHS, nNOS inhibitörü (3-Br-7-NI); nNOSi.



Şekil 35. KÖHS ve uygulanan tedavilerin sükroz tercihi üzerine etkileri. Veriler ortalama $\pm$ standart hata şeklinde gösterildi. İstatistiksel analiz iki faktörlü varyans analizi ile yapıldı. Post-hoc Bonferroni testi uygulandı ($n=8-10/\text{grup}$). * $p<0,05$; Kontrol grubuna göre, # $p<0,05$, ### $p<0,001$; KÖHS grubuna göre anlamlı farklılığı göstermektedir.

6.2.2. Zorunlu yüzme testi

Sıçanların immobil kalma sürelerinin değerlendirildiği zorunlu yüzme testinde KÖHS grubunda kontrol grubuna kıyasla anlamlı düzeyde artış olduğu ($p<0,01$); imipramin ($p<0,01$), agmatin ($p<0,01$), iNOS inhibitörü aminoguanidin ($p<0,01$) ve nNOS inhibitörü 3-Br-7-NI ($p<0,05$) tedavisi alan sıçanlarda ise bu sürenin tedavi almayan KÖHS grubuna göre anlamlı derecede kısaldığı görüldü (Şekil 36).



Şekil 36. KÖHS ve uygulanan tedavilerin immobilité süreleri üzerine etkileri. Veriler ortalama $\pm$ standart hata şeklinde gösterildi. İstatistiksel analiz tek yönlü varyans ile yapıldı, Post-hoc Tukey testi uygulandı ($n=8-10$ /grup). ** $p<0,01$; Kontrol grubuna göre, # $p<0,05$, ## $p<0,01$; KÖHS grubuna göre anlamlı farklılığı göstermektedir. Kronik öngörülemez hafif stres; KÖHS, imipramin; İMİ, agmatin; AGM, iNOS inhibitörü; iNOSi, nNOS inhibitörü; nNOSi.

6.3. Moleküler Analiz Bulguları

6.3.1. Real-time PCR analizleri

Çalışmamızda KÖHS depresyon modelinde farklı tedavi yaklaşımlarının NLRP inflamazom komponentleri (NLRP1, NLRP3, kaspaz-1 ve ASC), proinflamatuvar sitokinler (IL-1 β , IL-18 ve IL-6) ve NOS izoformlarının (iNOS, nNOS ve eNOS) gen ekspresyon düzeylerine etkileri PCR yöntemi ile incelendi. İncelemeler; prefrontal korteks ve hipokampus olmak üzere iki ayrı beyin bölgesinde yapıldı.

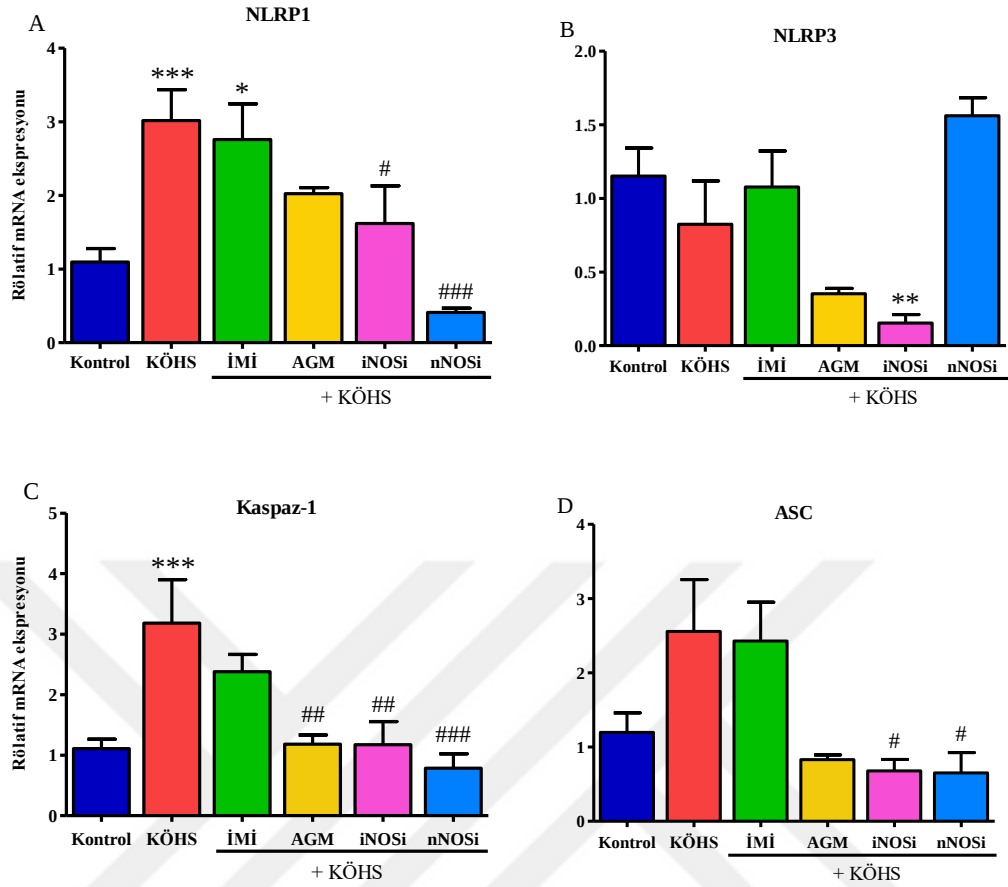
6.3.1.1. Prefrontal korteks gen ekspresyonları

KÖHS grubunda kontrol grubuna göre NLRP1 mRNA düzeylerinin istatistiksel olarak anlamlı düzeyde arttığı bulundu ($p<0,001$) (Şekil 37A). NLRP1 gen düzeyleri KÖHS+İMİ grubunda kontrol grubuna göre anlamlı bir artış göstermesine karşın ($p<0,05$) bu artış KÖHS grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. KÖHS ile artan NLRP1 düzeylerinin KÖHS+iNOSi ($p<0,05$) ve KÖHS+nNOSi ($p<0,001$) gruplarında anlamlı derecede azaldığı KÖHS+AGM grubunda ise azalma eğilimi görülmesine rağmen, istatistiksel olarak bir anlamlılık bulunmadı (Şekil 37A).

KÖHS grubu ne kontrol grubu ne de tedavi grupları ile karşılaştırıldığında NLRP3 mRNA düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı düzeyde bir değişim görüldü (Şekil 37B). Yalnızca KÖHS+iNOSi grubunda NLRP3 mRNA düzeyleri kontrol grubuna anlamlı ölçüde azalmış bulundu ($p<0,01$) (Şekil 37B).

Kaspaz-1 gen düzeyleri KÖHS grubunda kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde yüksek bulundu ($p<0,001$) ve imipramin tedavisi ile anlamlı bir değişim görülmedi (Şekil 37C). Stres ile kaspaz-1 gen düzeylerinde görülen bu artış; agmatin ($p<0,01$), iNOS ($p<0,01$) ve nNOS inhibitörü ($p<0,001$) ile tedavi edilen gruplarda istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azaldı (Şekil 37C).

ASC gen düzeylerinde kronik stres ile artma eğilimi görülmesine karşın; bu değişim istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı (Şekil 37D). KÖHS grubu ile karşılaştırıldığında ASC düzeylerinin imipramin tedavisi alan grupta anlamlı değişim göstermediği; iNOS ve nNOS inhibitörü uygulanan gruplarda ise tedavi almayan KÖHS grubuna göre anlamlı düzeyde azaldığı görüldü ($p<0,05$). Agmatin tedavisi alan grupta ASC düzeyleri azalma eğilimi göstermesine rağmen; söz konusu değişim istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı (Şekil 37D).

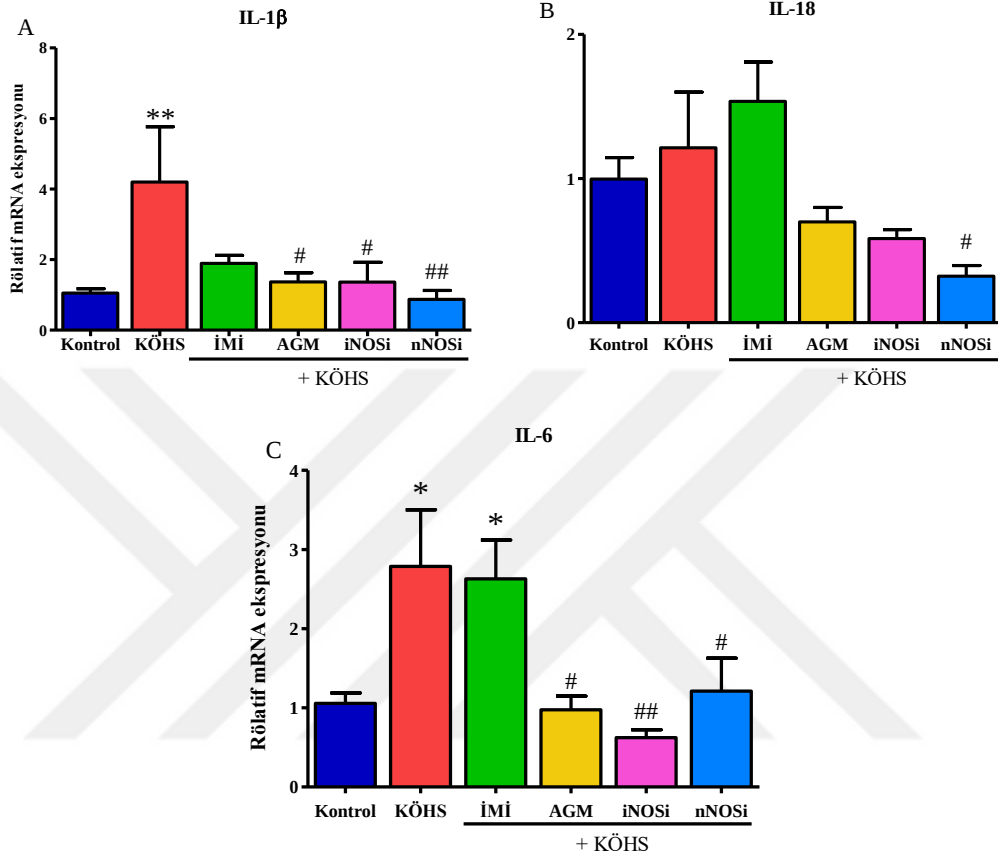


Şekil 37. NLRP inflamazom bileşenlerinin prefrontal korteks mRNA düzeyleri. Veriler ortalama $\pm$ standart hata şeklinde gösterildi. İstatistiksel analiz tek yönlü varyans ile yapıldı. Post-hoc Tukey testi uygulandı ($n=6-7/\text{grup}$). *** $p<0,001$; Kontrol grubuna göre, # $p<0,05$, ## $p<0,01$, ### $p<0,001$; KÖHS grubuna göre anlamlı farklılığı göstermektedir. Kronik öngörülemez hafif stres; KÖHS, imipramin; İMİ, agmatin; AGM, iNOS inhibitörü; iNOSi, nNOS inhibitörü; nNOSi.

Prefrontal kortekste IL-1 β gen düzeylerinin kontrol grubu ile karşılaştırıldığında KÖHS grubunda anlamlı derecede arttığı görüldü ($p<0,01$) (Şekil 38A). Stres ile artan IL-1 β düzeyleri imipramin tedavisi ile azalma eğilimi göstermesine karşın, değişim istatistiksel olarak anlamlı bulunmazken; agmatin ($p<0,05$), iNOS ($p<0,05$) ve nNOS inhibitörü ($p<0,01$) tedavileri ile anlamlı ölçüde azaldı (Şekil 38A).

IL-18 düzeylerindeki değişim ne KÖHS grubu kontrol grubu karşılaştırıldığında ne de tedavi gruplarına göre (KÖHS+nNOSi grubu hariç) istatistiksel olarak anlamlı bulundu (Şekil 38B). Bir diğer proinflatuvar sitokin olan IL-6 düzeyleri KÖHS grubunda kontrolle karşılaştırıldığında anlamlı derecede yüksek bulundu (Şekil 38C).

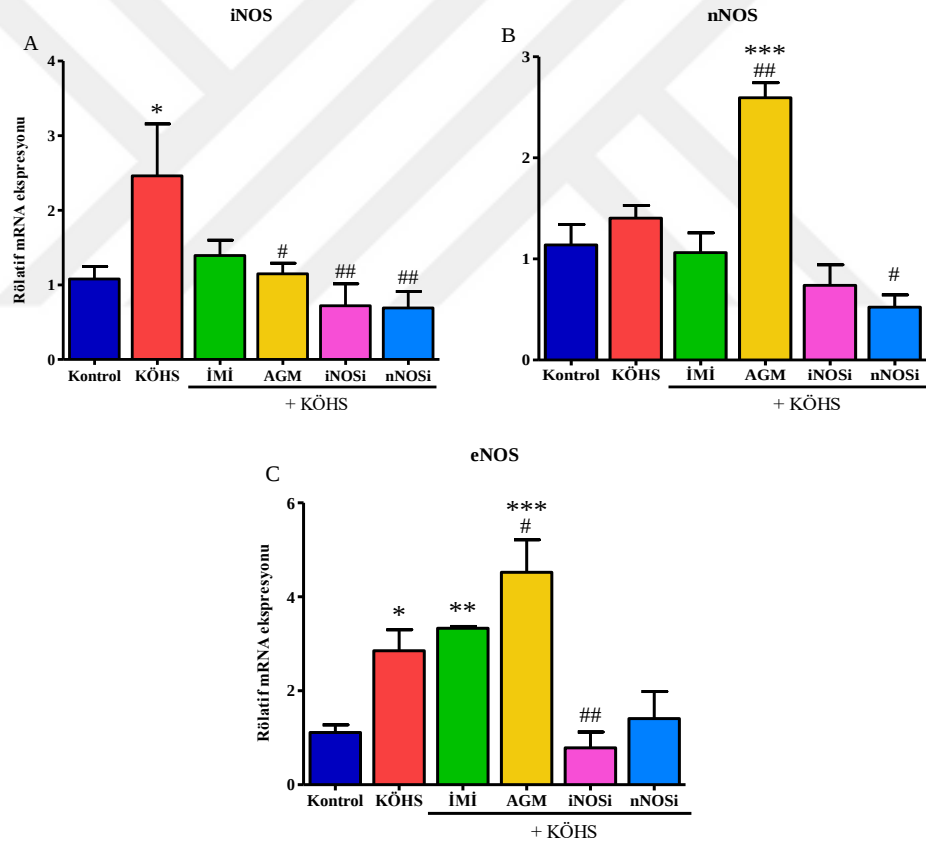
Bu artış KÖHS+İMİ grubunda KÖHS grubu ile karşılaştırıldığında değişmezken KÖHS+AGM ($p<0,05$), KÖHS+iNOSi ($p<0,01$) ve KÖHS+nNOSi ($p<0,05$) gruplarında anlamlı derecede azaldı (Şekil 38C).



Şekil 38. Proinflamatuvar sitokinlerinin prefrontal korteks mRNA düzeyleri. IL-1 β (A), IL-18 (B) ve IL-6 (C) gösterilmiştir. Veriler ortalama $\pm$ standart hata şeklinde gösterildi. İstatistiksel analiz tek yönlü varyans ile yapıldı. Post-hoc Tukey testi uygulandı ($n=6-7$ /grup). * $p<0,05$, ** $p<0,01$; Kontrol grubuna göre, # $p<0,05$, ## $p<0,01$; KÖHS grubuna göre anlamlı farklılığı göstermektedir. Kronik öngörülemez hafif stres; KÖHS, imipramin; İMİ, agmatin; AGM, iNOS inhibitörü; iNOSi, nNOS inhibitörü; nNOSi.

Prefrontal korteks dokularında ayrıca NOS enziminin 3 izoformu olan iNOS, nNOS ve eNOS düzeyleri değerlendirildi. KÖHS modeli kontrol grubuna göre iNOS düzeylerinde anlamlı bir artışa neden oldu ($p<0,05$). İmipramin tedavisinin ise bu artışı azaltmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı düzeyde değiştiremediği görüldü. Ancak agmatin ($p<0,05$), iNOS ($p<0,01$) ve nNOS inhibitörü ($p<0,01$) kullanıldığında KÖHS grubunda görülen artışın istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azaldığı bulundu

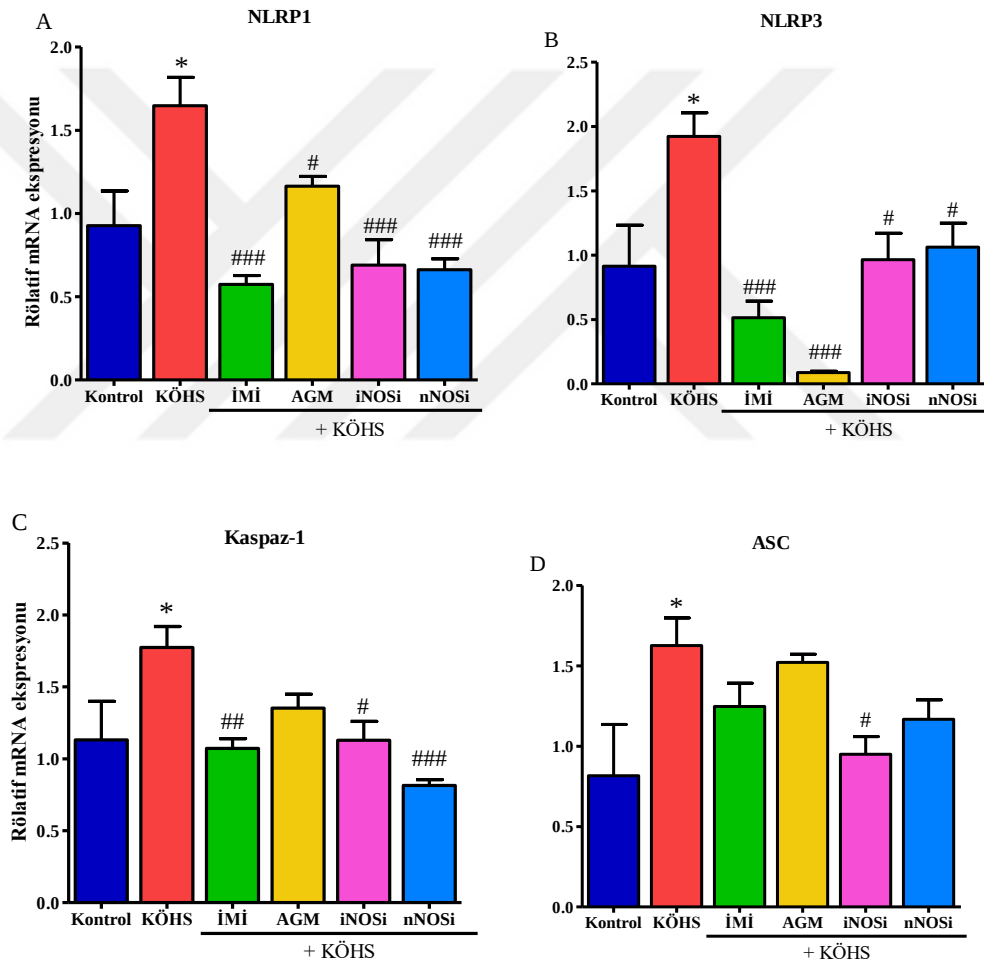
(Şekil 39A). Kronik stres ile nNOS düzeylerinde anlamlı bir değişim görülmezken nNOS inhibitörü ile tedavi edilen grupta anlamlı bir azalma ($p<0,05$) ve agmatin grubunda gerek kontrol ($p<0,001$) ve gerekse KÖHS grubuna göre ($p<0,01$) büyük oranda artış olduğu görüldü (Şekil 39B). KÖHS grubunda kontrol grubu ile karşılaştırıldığında eNOS düzeylerinde anlamlı bir artış olduğu ($p<0,05$) ve bu artışın imipramin tedavisi ile değişmediği görüldü. Kronik stres ile artan eNOS düzeyleri iNOS inhibitörü uygulanması ile anlamlı düzeyde azalırken ($p<0,01$), agmatin grubunda gerek kontrol ($p<0,001$) ve gerekse KÖHS grubu ($p<0,05$) ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulundu. nNOS inhibitörü uygulandığında ise KÖHS grubunda görülen artışta azalma eğilimi görülmesine rağmen değişim istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı (Şekil 39C).



Şekil 39. NOS izoenzimlerinin prefrontal korteks mRNA düzeyleri. iNOS (A), nNOS (B) ve eNOS (C) gösterilmiştir. Veriler ortalama $\pm$ standart hata şeklinde gösterildi. İstatistiksel analiz tek yönlü varyans ile yapıldı. Post-hoc Tukey testi uygulandı ($n=6-7$ /grup). * $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$; Kontrol grubuna göre, # $p<0,05$, ## $p<0,01$; KÖHS grubuna göre anlamlı farklılığı göstermektedir.

6.3.1.2. Hipokampus gen ekspresyonları

KÖHS grubunda hipokampus NLRP1 ($p<0,05$) ve NLRP3 ($p<0,05$) mRNA düzeyleri kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde yüksek bulundu (Şekil 40). Kronik stres ile artan NLRP1 gen düzeylerinin KÖHS+İMİ ($p<0,001$), KÖHS+AGM ($p<0,05$), KÖHS+iNOSi ($p<0,001$) ve KÖHS+nNOSi ($p<0,001$) gruplarında anlamlı düzeyde azaldığı görüldü (Şekil 40A). Hipokampüste stres ile artan NLRP3 mRNA düzeylerinin imipramin ($p<0,001$), agmatin ($p<0,001$), iNOS ($p<0,05$) ve nNOS inhibitörü ($p<0,05$) tedavileri ile anlamlı derece azaldığı tespit edildi (Şekil 40B).



Şekil 40. NLRP inflamazom bileşenlerinin hipokampus mRNA düzeyleri. Veriler ortalama $\pm$ standart hata şeklinde gösterildi. İstatistiksel analiz tek yönlü varyans ile yapıldı. Post-hoc Tukey testi uygulandı ($n=6-7/\text{grup}$). * $p<0,05$; Kontrol grubuna göre, # $p<0,05$, ## $p<0,01$, ### $p<0,001$; KÖHS grubuna göre anlamlı farklılığı göstermektedir. Kronik öngörülemez hafif stres; KÖHS, imipramin; İMİ, agmatin; AGM, iNOS inhibitörü; iNOSi, nNOS inhibitörü; nNOSi.

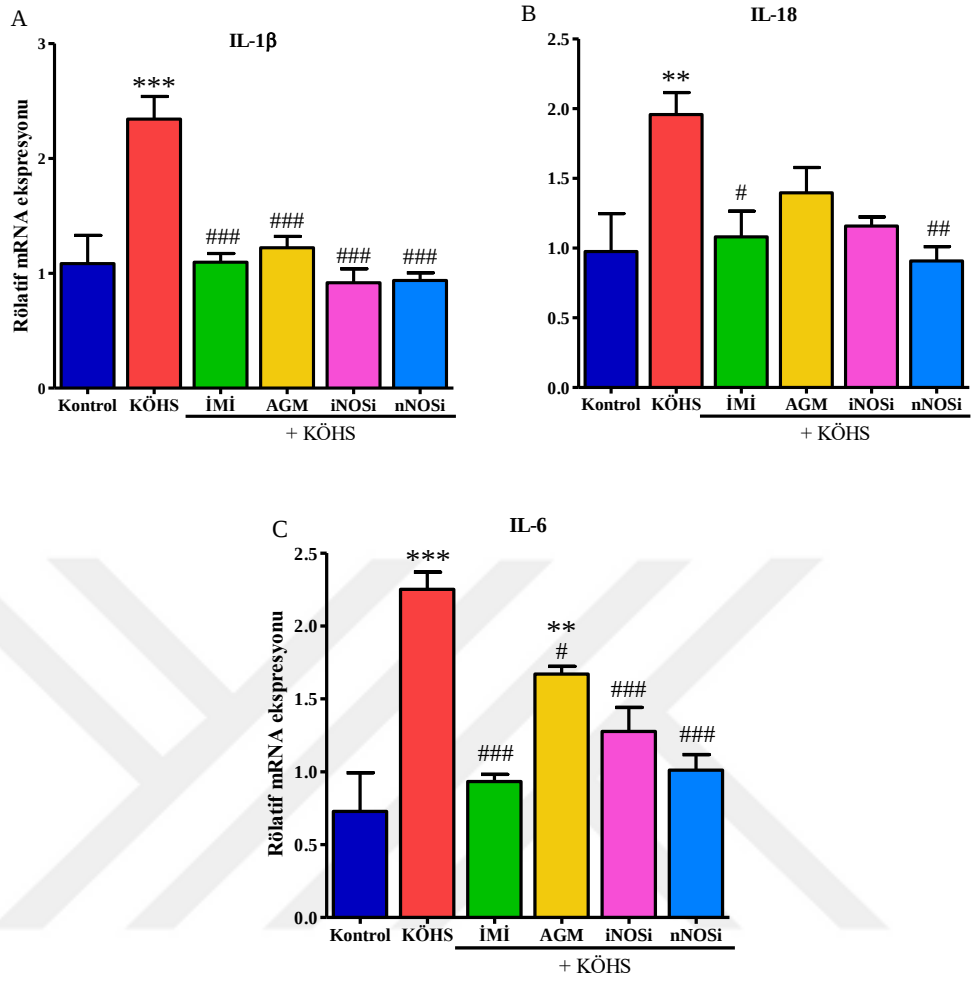
Kaspaz-1 gen düzeyleri KÖHS grubunda kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek bulundu ($p<0,05$) (Şekil 40C). Stres ile artan kaspaz-1 düzeyleri KÖHS+İMİ ($p<0,01$), KÖHS+iNOSi ($p<0,05$) ve KÖHS+ nNOSi ($p<0,001$) gruplarında anlamlı düzeyde azalırken, KÖHS+AGM grubundaki azalma eğilimi istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı (Şekil 40C).

Hipokampüste kronik strese bağlı olarak ASC gen düzeylerinin kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde arttığı, iNOS inhibitörü hariç ($p<0,05$) uygulanan tedavilerin bu artış üzerine etkili olmadıkları görüldü (Şekil 40D).

Kronik stres uygulaması proinflatuvar sitokinler olan IL-1 β ($p<0,001$), IL-18 ($p<0,01$) ve IL-6 ($p<0,001$) gen düzeylerini kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde yükseltti (Şekil 41). Stres ile arttığı görülen IL-1 β düzeylerinin imipramin ($p<0,001$), agmatin ($p<0,001$), iNOS ($p<0,001$) ve nNOS inhibitörü ($p<0,001$) tedavileri ile anlamlı düzeyde azaldığı saptandı (Şekil 41A). IL-18 düzeyleri ise KÖHS+İMİ ($p<0,05$) ve KÖHS+nNOSi ($p<0,01$) gruplarında anlamlı düzeyde azalırken; KÖHS+AGM ve KÖHS+iNOSi gruplarındaki azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı (Şekil 41B). Stres ile artan IL-6 düzeyleri; KÖHS+İMİ ($p<0,001$), KÖHS+AGM ($p<0,05$), KÖHS+iNOSi ($p<0,001$) ve KÖHS+nNOSi ($p<0,001$) tedavi gruplarında anlamlı derecede azaldı (Şekil 41C).

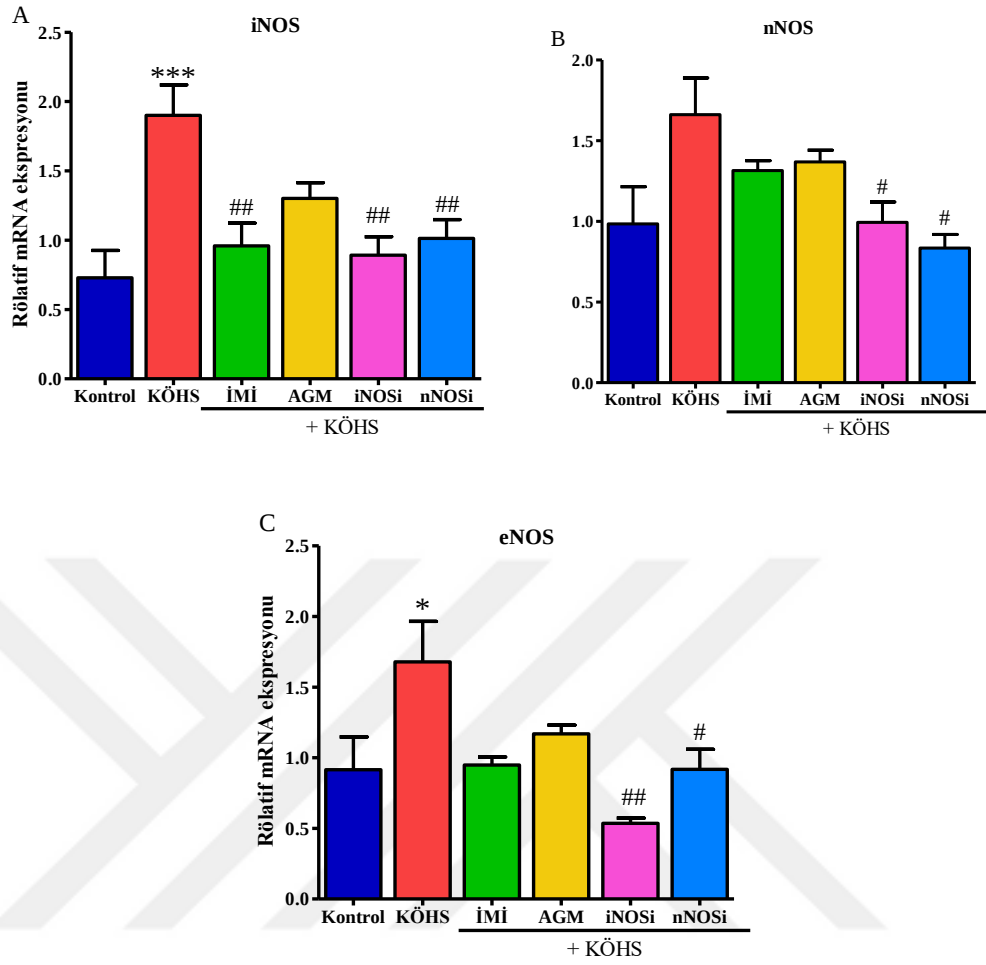
KÖHS modelinde hipokampal iNOS düzeylerinde anlamlı bir artış görüldü ($p<0,001$) (Şekil 42A). İmipramin ($p<0,01$), iNOS inhibitörü ($p<0,01$) ve nNOS inhibitörü ($p<0,01$) ile bu artış anlamlı düzeyde baskılanabilirken; agmatin grubundaki azalma eğilimi istatistiksel anlamlılık düzeyine ulaşmadı (Şekil 42A).

Kronik stres uygulaması ile bu modelde nNOS ekspresyonunda bir artış eğilimi görülmesine rağmen, bu değişim istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı (Şekil 42B). Stresle oluşan bu artma eğiliminin kronik imipramin ve agmatin tedavisi ile kısmen, iNOS ve nNOS inhibitörleri kullanıldığında ise anlamlı derecede baskılanabildiği görüldü ($p<0,05$) (Şekil 42B).



Şekil 41. Proinflamatuvar sitokinlerinin hipokampus mRNA düzeyleri. IL-1 β (A), IL-18 (B) ve IL-6 (C) gösterilmiştir. Veriler ortalama $\pm$ standart hata şeklinde gösterildi. İstatistiksel analiz tek yönlü varyans ile yapıldı. Post-hoc Tukey testi uygulandı (n=6-7/grup). **p<0,01, ***p<0,001; Kontrol grubuna göre, #p<0,05, ##p<0,01, ###p<0,001; KÖHS grubuna göre anlamlı farklılığı göstermektedir Kronik öngörülemez hafif stres; KÖHS, imipramin; İMİ, agmatin; AGM, iNOS inhibitörü; iNOSi, nNOS inhibitörü; nNOSi.

Kronik stresin eNOS ekspresyonunu anlamlı düzeyde artırdığı görüldü (p<0,05) (Şekil 42C). iNOS (p<0,01) ve nNOS inhibitörleri (p<0,05) bu artışı anlamlı düzeyde baskımlarken, imipramin ve agmatin ile görülen baskılanma eğiliminin istatistiksel anlamlılık düzeyine ulaşmadığı görüldü (Şekil 42C).



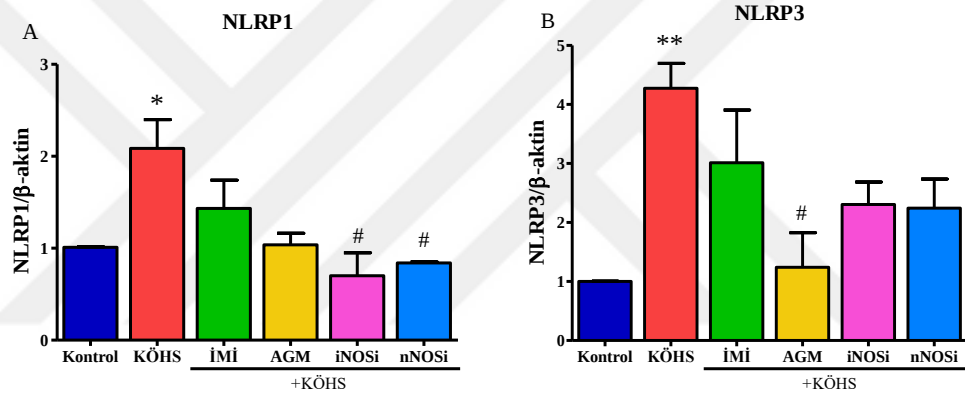
Şekil 42. NOS izoenzimlerinin hipokampus mRNA düzeyleri. iNOS (A), nNOS (B) ve eNOS (C) gösterilmiştir. Veriler ortalama $\pm$ standart hata şeklinde gösterildi. İstatistiksel analiz tek yönlü varyans ile yapıldı, Post-hoc Tukey testi uygulandı (n=6-7/grup). * $p<0,05$, *** $p<0,001$; Kontrol grubuna göre, # $p<0,05$, ## $p<0,01$; KÖHS grubuna göre anlamlı farklılığı göstermektedir. Kronik öngörülemez hafif stres; KÖHS, imipramin; İMİ, agmatin; AGM, iNOS inhibitörü; iNOSi, nNOS inhibitörü; nNOSi.

6.3.2. Western blot analizleri

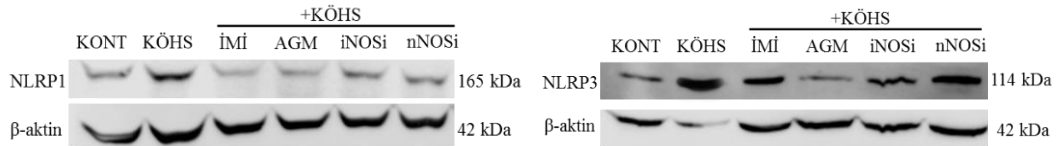
Çalışmamızda NLRP inflamazom komponentleri (NLRP1, NLRP3, kaspaz-1 ve ASC) ve aktivasyonu sonucu üretilen proinflamatuvar sitokin IL-1 β 'nin protein ekspresyon düzeyleri western blot yöntemi ile beynin prefrontal korteks bölgesinde yapıldı.

Kronik stres maruziyetinin NLRP1 ($p<0,05$) ve NLRP3 ($p<0,05$) protein ekspresyonlarında anlamlı düzeyde bir artışa neden olduğu saptandı (Şekil 43) (Resim 7).

Stres ile artan NLRP1 protein düzeylerinin KÖHS+iNOSi ($p<0,05$) ve KÖHS+nNOSi ($p<0,05$) gruplarında anlamlı düzeyde baskılandığı; KÖHS+İMİ ve KÖHS+AGM gruplarında görülen azalma eğiliminin ise istatistiksel anlamlılık düzeyine ulaşmadığı görüldü (Şekil 43A). NLRP3 düzeylerinin KÖHS grubunda kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı düzeyde arttığı, sadece agmatin tedavisi uygulanan grupta bu artışın anlamlı düzeyde baskılandığı tespit edildi ($p<0,05$) (Şekil 43B).



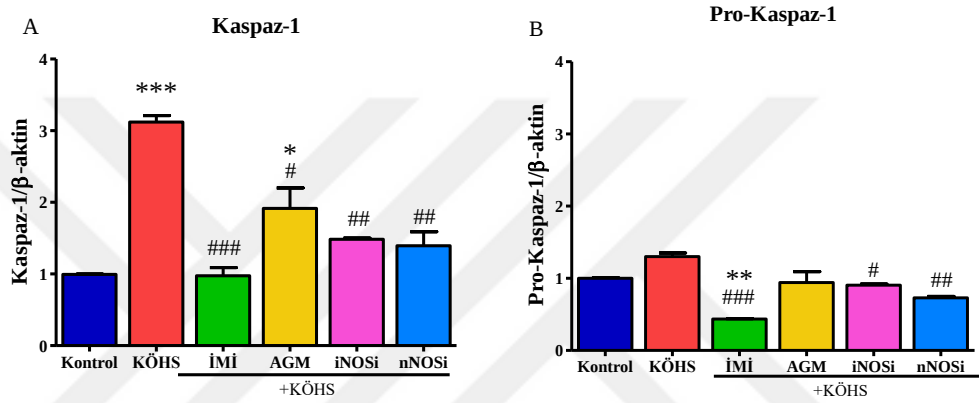
Şekil 43. NLRP1 (A) ve NLRP3 (B) prefrontal korteks protein ekspresyon düzeyleri. Veriler ortalama $\pm$ standart hata şeklinde gösterildi. İstatistiksel analiz tek yönlü varyans ile yapıldı. Post-hoc Tukey testi uygulandı. * $p<0,05$; Kontrol grubuna göre, # $p<0,05$; KÖHS grubuna göre anlamlı farklılığı göstermektedir. Kronik öngörülemez hafif stres; KÖHS, imipramin; İMİ, agmatin; AGM, iNOS inhibitörü; iNOSi, nNOS inhibitörü; nNOSi.



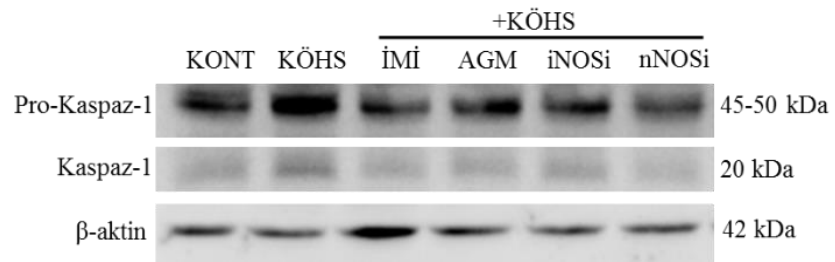
Resim 7. NLRP1 ve NLRP3 western blot protein bandı görüntüleri.

Kaspaz-1 protein ekspresyonu KÖHS grubunda kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek bulundu ($p<0,001$) (Şekil 44) (Resim 8). Stres ile artan kaspaz-1

düzeyleri KÖHS+İMİ ($p<0,001$), KÖHS+AGM ($p<0,05$), KÖHS+iNOSi ($p<0,01$) ve KÖHS+ nNOSi ($p<0,01$) gruplarında anlamlı derecede az olarak saptandı (Şekil 44A). Benzer şekilde kaspaz-1'in öncül formu olan pro-kaspaz-1 ekspresyonu da KÖHS grubunda kontrol grubuna göre bir artış eğilimi göstermesine karşın, bu değişim istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. KÖHS grubu ile karşılaştırıldığında; imipramin ($p<0,01$), iNOS ($p<0,05$) ve nNOS inhibitörü ($p<0,01$) uygulanan gruplarda pro-kaspaz-1 düzeylerinin anlamlı düzeyde azaldığı görülürken; agmatin uygulanan grupta görülen azalma eğilimi istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı (Şekil 44B).

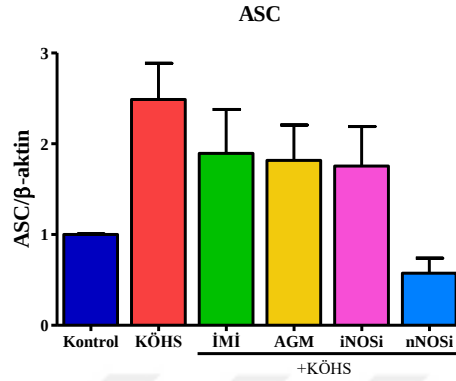


Şekil 44. Kaspaz-1 prefrontal korteks protein ekspresyon düzeyleri. Kaspaz-1 (A) ve pro-kaspaz-1 (B) gösterilmiştir. Veriler ortalama $\pm$ standart hata şeklinde gösterildi. İstatistiksel analiz tek yönlü varyans ile yapıldı. Post-hoc Tukey testi uygulandı. * $p<0,05$, ** $p<0,01$; *** $p<0,001$; Kontrol grubuna göre, # $p<0,05$, ## $p<0,01$, ### $p<0,001$; KÖHS grubuna göre anlamlı farklılığı göstermektedir. Kronik öngörülemez hafif stres; KÖHS, imipramin; İMİ, agmatin; AGM, iNOS inhibitörü; iNOSi, nNOS inhibitörü; nNOSi.

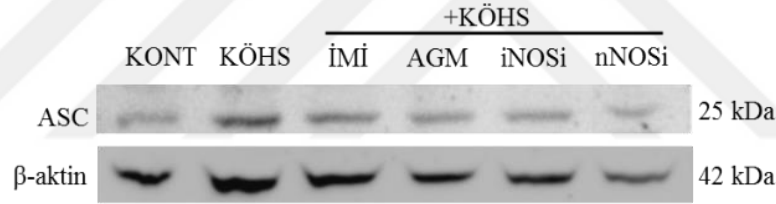


Resim 8. Kaspaz-1 western blot protein bandı görüntüleri.

ASC protein düzeylerinin stres ve uygulanan tedaviler ile sırasıyla artma ve azalma eğilimi göstermesine karşın değişimler istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı (Şekil 45) (Resim 9).

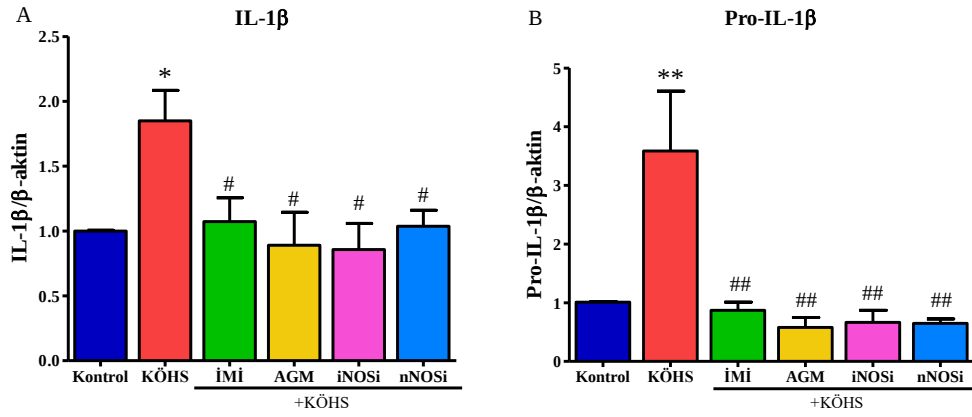


Şekil 45. ASC prefrontal korteks protein ekspresyon düzeyleri. Veriler ortalama $\pm$ standart hata şeklinde gösterildi. İstatistiksel analiz tek yönlü varyans ile yapıldı. Kronik öngörülemez hafif stres; KÖHS, imipramin; İMİ, agmatin; AGM, iNOS inhibitörü; iNOSi, nNOS inhibitörü; nNOSi.

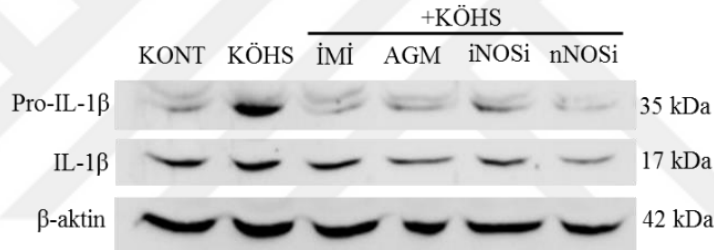


Resim 9. ASC western blot protein bandı görüntüleri.

IL-1 β ($p<0,05$) ve pro-IL-1 β ($p<0,01$) protein ekspresyonlarının kronik stres ile anlamlı düzeyde arttığı saptandı (Şekil 46) (Resim 10). Stres ile artan IL-1 β ekspresyonu imipramin ($p<0,05$), agmatin ($p<0,05$), iNOS ($p<0,05$), ve nNOS inhibitörü ($p<0,05$) tedavileri ile anlamlı düzeyde azaldı (Şekil 46A). Benzer şekilde; IL-1 β 'nın öncül formu olan pro-IL-1 β 'nın stres ile artan düzeylerinin KÖHS+İMİ, KÖHS+AGM, KÖHS+iNOSi ve KÖHS+nNOSi gruplarında anlamlı ölçüde azaldığı görüldü ($p<0,01$) (Şekil 46B).



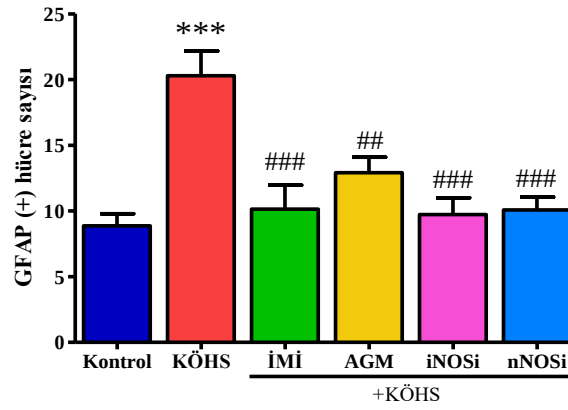
Şekil 46. IL-1β prefrontal korteks protein ekspresyon düzeyleri. IL-1β (A) ve pro-IL-1β (B) gösterilmiştir. Veriler ortalama ± standart hata şeklinde gösterildi. İstatistiksel analiz tek yönlü varyans ile yapıldı. Post-hoc Tukey testi uygulandı. *p<0,05, **p<0,01; Kontrol grubuna göre, #p<0,05, ##p<0,01; KÖHS grubuna göre anlamlı farklılığı göstermektedir. Kronik öngörülemez hafif stres; KÖHS, imipramin; İMİ, agmatin; AGM, iNOS inhibitörü; iNOSi, nNOS inhibitörü; nNOSi.



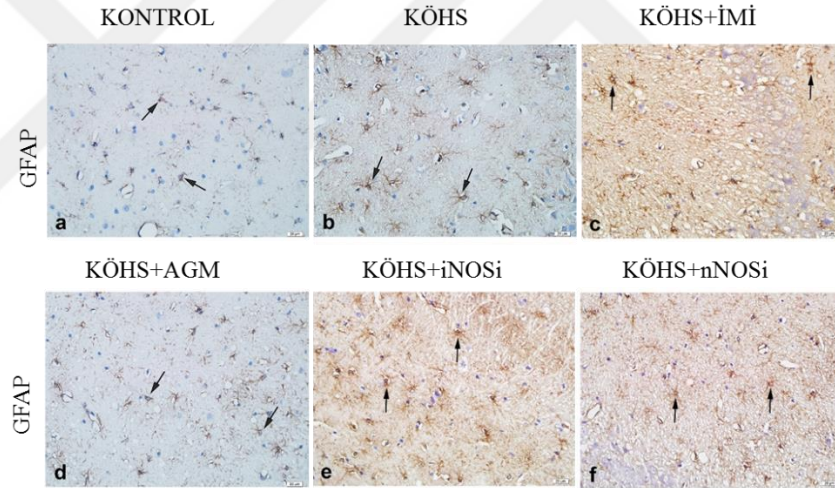
Resim 10. IL-1β western blot protein bandı görüntüleri.

6.4. İmmünohistokimyasal Analizler

Çalışmamızda hipokampus beyin bölgesinde glial aktivasyon göstergesi olarak GFAP immünoreaktivitesi değerlendirildi (Şekil 47) (Resim 11). Elde edilen bulgulara göre; GFAP (+) hücre sayısının KÖHS grubunda kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde arttığı tespit edildi (p<0,001) (Şekil 47). Bu artışın; imipramin (p<0,001), agmatin (p<0,01), iNOS (p<0,001) ve nNOS inhibitörü (p<0,001) tedavisi uygulanan gruplarda anlamlı düzeyde azaldığı görüldü (Şekil 47) (Resim 11).



Şekil 47. Hipokampal GFAP immünopozitif hücre sayısı. Veriler ortalama $\pm$ standart hata şeklinde gösterildi. İstatistiksel analiz tek yönlü varyans ile yapıldı. Post-hoc Tukey testi uygulandı. *** $p < 0,001$; Kontrol grubuna göre, ## $p < 0,01$, ### $p < 0,01$; KÖHS grubuna göre anlamlı farklılığı göstermektedir. Kronik öngörülemez hafif stres; KÖHS, imipramin; İMİ, agmatin; AGM, iNOS inhibitörü; iNOSi, nNOS inhibitörü; nNOSi.



Resim 11. GFAP immünoboyamaları. Bar: 20 μ m. Orjinal büyütme: x400. Hipokampus bölgesinde x 400 büyütmede toplam 5 alanda GFAP immünreaktif hücreler sayıldı. Sayım yapılan 5 alanın ortalaması alındı. Kronik öngörülemez hafif stres; KÖHS, imipramin; İMİ, agmatin; AGM, iNOS inhibitörü; iNOSi, nNOS inhibitörü; nNOSi.

7. TARTIŞMA ve SONUÇ

Çalışmamızda sıçanlarda oluşturulan KÖHS depresyon modelinde agmatin ve NOS inhibitörü tedavi uygulamalarının depresyon-benzeri davranışlar, NLRP inflamazom yolağı ve ilişkili nöroinflamasyon yanıtları üzerindeki etkileri incelendi. Elde edilen bulgulara göre; 6 haftalık KÖHS prosedürünün sıçanlarda sükröz tercih ve zorunlu yüzmeye testleri ile değerlendirilen depresyon-benzeri davranışlara yol açtığı gösterildi. Diğer taraftan KÖHS modelinin son 3 haftasında farklı gruplara uygulanan kronik imipramin, agmatin, iNOS inhibitörü (aminoguanidin) ve nNOS inhibitörü (3-Br-7-NI) tedavilerinin sıçanlarda depresyonun neden olduğu davranış değişikliklerini geri çevirdiği tespit edildi. Çalışmamızda 6 haftalık KÖHS prosedürü sıçanların prefrontal korteks ve hipokampus beyin bölgelerinde inflamazom aktivasyonuna işaret eden ekspresyon değişimleri (NLRP1, NLRP3, kaspaz-1, ASC, IL-1 β ve IL-18) ve artmış iNOS ve eNOS düzeyleri ile ilişkili bulundu. Çalışmamızda; imipramin, agmatin, iNOS ve nNOS inhibitörü ile yapılan tedavilerin KÖHS ile oluşan inflamazom aktivasyonunu bölge ve değerlendirilen parametre bazında farklı düzeylerde baskıladığı görüldü. Elde edilen bulgular genel olarak değerlendirildiğinde çalışmamızda kronik stres maruziyeti ile gelişen depresyon-benzeri davranışlara NLRP1 ve NLRP3 inflamazom aktivasyonunun eşlik edebileceği, agmatin ve NOS inhibitörlerinin antidepresan etki potansiyellerinde ise inflamazom yolağı üzerindeki modülatör etkilerinin kısmen rolü olabileceği gösterildi.

Major depresyon, dünya popülasyonunda yaygın olarak görülen, klinik semptomları hastadan hastaya büyük değişkenlik gösterebilen kompleks bir psikiyatrik hastalıktır (Kessler, 2012). Günümüzde depresyonun tedavisinde kullanılan mevcut antidepresan ilaçlarla ne yazık ki tedavide istenilen düzeyde başarı sağlanabilmiş değildir. Mevcut tedavi yaklaşımlarıyla hastalık semptomlarının giderilmesinde geçmişe kıyasla önemli gelişmeler elde edilmesine karşın, günümüzde çoğu olguda söz konusu tedavilere rağmen yanıt alınamamaktadır (Skolnick, 2002). Bahsi geçen sorunlardan hareketle gerek depresyon nörobiyolojisinin daha iyi anlaşılabilmesi gerekse etkili yeni tedavi stratejilerinin geliştirilebilmesi için hayvan modelleri ile yapılan deneysel çalışmalar hastalık nörobiyolojisi ve davranış düzeyinde

incelemelere olanak tanınması bakımından kritik bir önem taşımaktadır (Czeh ve ark., 2016). Nitekim; deneysel depresyon modelleri ile klinikte görülen depresyona özgü bazı semptomlar veya patofizyolojik değişimlerin belli yönleri, belli seviyelerde ve belli kısıtlılıklarda hayvanlarda oluşturulabilmektedir (Abelaira ve ark., 2013; Czeh ve ark., 2016; Deussing, 2006; Duman, 2010).

Strese maruziyetin; depresyon gelişmesinde rol oynayan önemli bir çevresel risk faktörü olduğu bilinmektedir (Duman, 2010). Bu noktadan hareketle deneysel depresyon modellerinin büyük bölümünü, çevresel stres etkenlerinin kullanılmasıyla oluşturulan akut veya kronik stres modelleri oluşturmaktadır (Deussing, 2006). Çalışmamızda kullanılan KÖHS modeli en iyi geçerlilik ve güvenilirlik profiline sahip deneysel depresyon modellerinden biri olarak kabul edilmektedir (Czeh ve ark., 2016). Model ile deney hayvanları çeşitli çevresel stresörlere öngörülemeyen bir düzende kronik olarak maruz bırakılmaktadır (Willner, 1997). Bu dizaynın insanların karşılaştığı günlük yaşam stresini diğer modellere göre daha iyi karşıladığı kabul edilmektedir (Czeh ve ark., 2016). Literatürde sıklıkla 4 ila 12 hafta arasında değişen aralıklarla uygulandığı görülen KÖHS modeli bu çalışmada 6 hafta süreyle uygulandı (Deng ve ark., 2015a; 2015b; Liu ve ark., 2015; Lu ve ark., 2014; Pan ve ark., 2014; Zhang ve ark., 2015).

KÖHS modelinde klinik açıdan hastalığın önemli belirtilerinden biri olarak kabul edilen anhedoninin deney hayvanlarında oluşturulması mümkün olmakta; bu yönüyle modelin iyi görünüş geçerlilik profiline sahip olduğu kabul edilmektedir (Czeh ve ark., 2016). KÖHS modelinde anhedoni-benzeri davranışların tespiti için sükroz tercih testi yaygın olarak kullanılmaktadır (Willner, 2005; Willner, 1997). Literatürde zamana karşı incelenen tekrarlı test tasarımı ile yaygın kullanılan sükroz tercih testi; çalışmamızda da KÖHS modeli oluşturulmadan önce ve model sırasında iki haftalık aralarla uygulandı (Wiborg, 2013). Bu tasarım ile sıçanlarda anhedoninin stres uygulamasının hangi döneminde geliştiği tespit edilebilmekte ve dolayısıyla tedavi uygulamalarına anhedoni geliştikten sonra başlanması mümkün olmaktadır (Wiborg, 2013). Bu çerçevede ele alındığında çalışmamızda bazal sükroz tercihleri tespit edilen sıçanlar KÖHS modelinin 2. haftası tamamlandığında ikinci kez teste alınarak;

uygulanan stresin sıçanlarda anhedoniye yol açıp açmadığının tespit edilmesi amaçlandı. Buna göre çalışmamızda KÖHS modelinin 2. haftasında sıçanlarda anhedoni geliştiği gösterildi. Söz konusu bulgudan hareketle ‘anhedonik’ olarak kabul edilen sıçanlara, KÖHS modelinin son yarısında (4-6. haftalar) 21 gün süreyle kronik tedavi uygulamaları yapıldı.

KÖHS modelinin depresyon nörobiyolojisinde rol oynayan temel patofizyolojik değişimlerden, aralarında artmış proinflamatuvar sitokinler ve inflamasyon göstergeleri olmak üzere nörotrofik faktör düzeylerinin azalması, HPA eksen aktivitesinin artması, antioksidan homeostazın bozulması ve nörotransmitter metabolizması değişiklikleri gibi mekanizmaları tetiklediği bilinmekte, bu yönüyle iyi yapısal geçerlilik profiline sahip olduğu kabul edilmektedir (Czeh ve ark., 2016; Yan ve ark., 2010). Çalışmamızda da 6 hafta süreyle uygulanan KÖHS modeli artmış proinflamatuvar sitokin düzeyleri ile ilişkili bulundu. KÖHS modeli ile deney hayvanlarında oluşan anhedoninin kronik antidepresan tedavi ile düzelmesi; modelin öngörüsül geçerlilik profilini diğer modellerin önüne çıkaran bir faktör olarak değerlendirilmektedir (Czeh ve ark., 2016). Çalışmamızda da pozitif kontrol grubuna kronik uygulanan TSA imipramin (10 mg/kg) tedavisinin sıçanlarda anhedoniye geri çevirdiği gösterildi. Çalışmamızda etkili bulunan imipramin dozu (10 mg/kg) geçmiş tarihli çalışmalarda KÖHS modelinde antidepresan etkisi raporlanan doz aralığından (10-20 mg/kg) yola çıkılarak seçildi ve antidepresan-benzeri etki yönünden bu çalışmada elde edilen bulguların literatür ile uyumlu olduğu görüldü (Biala ve ark., 2017; Mao ve ark., 2014; Ossowska ve ark., 2004; Zhao ve ark., 2015).

Çalışmamızda KÖHS modeli ile gelişen depresyon-benzeri davranışların değerlendirilmesinde sükröz tercih testi yanında zorunlu yüzme testi kullanıldı. Zorunlu yüzme testi en yaygın kullanılan akut tarama testlerinin başında gelmektedir (Deussing, 2006). Porsolt testi olarak da anılan zorunlu yüzme testi bazı modifikasyonlarla günümüzde antidepresan aktivitenin değerlendirilmesinde sıklıkla tercih edilmektedir (Porsolt ve ark., 1977). Test günümüzde gerek depresyonun geliştiğinin gerekse tedavinin etkinliğinin değerlendirilmesinde modele ek olarak uygulanmaktadır (Abelaira ve ark., 2013; Czeh ve ark., 2016; Deussing, 2006; Duman,

2010). Çalışmamıza da bu çerçevede dahil edilen zorunlu yüzme testinde elde edilen bulgular doğrultusunda; kronik strese 6 hafta süreyle maruz bırakılan sıçanlarda literatür ile uyumlu olarak çaresizlik-benzeri davranışların geliştiği, diğer taraftan pozitif kontrol grubunda imipramin uygulamasının ise antidepresan-benzeri etki meydana getirdiği gösterildi (Alcocer-Gomez ve ark., 2017; Zhao ve ark., 2015).

Çalışmamızda KÖHS modeli süresince haftalık vücut ağırlığı takibi yapıldı. Konu ile ilgili literatür incelendiğinde KÖHS modelinin deney hayvanlarında vücut ağırlığı azalması ile ilişkili bulunduğu görülmektedir (Wiborg, 2013). Bu alanda yapılan çalışmaların aksine çalışmamızda 6 haftalık KÖHS prosedürünün sıçanların vücut ağırlığında azalma meydana getirmediği görüldü. Bu çalışmada KÖHS literatürü ile uyumlu bulunmayan vücut ağırlığı bulgularına ilişkin irdelemenin günümüzden yaklaşık 20 yıl önce Willner ve arkadaşlarının gözden geçirme çalışmasında değinildiği görülmektedir (Willner ve ark., 1996). Deney hayvanlarında KÖHS modeli ile oluşan vücut ağırlığı kaybı ve hedonik aktivitedeki azalma arasındaki olası ilişkinin irdelendiği çalışmada o tarihteki mevcut literatür incelenmiştir. Bu incelemeye göre; model ile deney hayvanlarında her zaman ağırlık kaybının oluşmayabileceği gösterilmiş ve dolayısıyla vücut ağırlığı kaybının hedonik aktivitedeki azalmanın bir yan göstergesi olarak görülemeyeceği ifade edilmiştir (Willner ve ark., 1996). Bahsi geçen irdeleme ile çalışmamızda genelin aksine gösterilen bulgulara bir açıklama getirilebilir.

Agmatin vücutta yaygın olarak bulunan ve beyinde nörotransmitter, nöromodülatör işlevleri olabileceği düşünülen amin yapısında endojen bir maddedir (Reis ve Regunathan, 2000). Endojen agmatin vücutta aminoasit L-arjinin'den ADK enzimi tarafından sentezlenir ve kompleks bir farmakolojik etki profiline sahip olduğu düşünülmektedir (Molderings ve Haenisch, 2012). Agmatin NO sinyal yolağının endojen modülatörü olarak kabul edilmektedir. iNOS ve nNOS enzimlerini yarışmalı olarak inhibe ettiği, eNOS'u ise stimüle ettiği gösterilmiştir (Auguet ve ark., 1995; Galea ve ark., 1996; Mun ve ark., 2010). Agmatinin imidazolin reseptörlerinin endojen ligandı olarak tüm alt tiplerine ve α_2 -adrenerjik reseptörlere bağlandığı, glutamaterjik NMDA reseptörleri, nikotinik asetilkolin reseptörleri ve 5-HT₃ reseptörleri gibi katyon

kanalı reseptörleri bloke edebildiği bilinmektedir (Piletz ve ark., 2013). Geçtiğimiz tarihli çalışmalarda ekzojen agmatin uygulamasının MSS patolojilerinde yararlı etkilerinin olduğunu gösterilmesi, endojen agmatinin bu patolojilerde olası modülatör rolünü düşündürmüştür. Bu bağlamda agmatinin etkileri duygudurum bozuklukları, epilepsi, morfin bağımlılığı, sinir hasarı, nöropatik ağrı ve bilişsel bozukluklar gibi alanlarda çalışılmış ve söz konusu patolojilerde olumlu etkileri rapor edilmiştir (Freitas ve ark., 2016b; Neis ve ark., 2017). Agmatinin yukarıda bahsi geçen farklı etkileri yanında özellikle stres, anksiyete ve depresyon üzerine etkileri deneysel çalışmalarla araştırılmış ve etkinliği iyi raporlanmış durumdadır (Freitas ve ark., 2016b).

Çalışmamızda agmatinin potansiyel bir antidepresan tedavi hedefi olabileceği düşüncesiyle depresyonda inflamasyon hipotezi açısından güncel nörobiyolojik mekanizmalar göz önüne alınarak etki mekanizmasını irdelemek amaçlandı. Buna göre agmatinin (40 mg/kg) KÖHS ile oluşan depresyon-benzeri davranışları sükroz tercih ve zorunlu yüzme testlerinde geri çevirdiği gösterildi. Agmatinin antidepresan-benzeri etkilerinin incelendiği geçmiş tarihli çalışmalar incelendiğinde; zorunlu yüzme testinde bu çalışmada da kullanılan 40 mg/kg dozunda etkili bulunduğu görülmektedir (Aricioglu ve Altunbas, 2003; Li ve ark., 2003; Zomkowski ve ark., 2002). Birkaç yıl öncesine kadar deneysel çalışmalarla gösterilen agmatinin antidepresan-benzeri etkileri zorunlu yüzme, kuyruktan asma gibi akut tarama testleri çerçevesinde kısıtlı kalmıştır. 2013 yılında Taksande ve arkadaşlarının fareler üzerinde yaptıkları çalışmalarında agmatinin antidepresan-benzeri etkileri ilk kez KÖHS modelinde ele alınmıştır (Taksande ve ark., 2013). KÖHS modeli; farelere 28 gün, agmatin tedavisi ise 15 gün süreyle uygulanmıştır. İlgili çalışmada kronik agmatin (5 ve 10 mg/kg) uygulamasının farelerde KÖHS ile meydana gelen depresyon-benzeri davranışları sükroz tercih ve zorunlu yüzme testlerinde geri çevirdiği rapor edilmiştir (Taksande ve ark., 2013). KÖHS modelinin kullanıldığı güncel tarihli bir başka çalışmada model oluşumunu da kapsayacak şekilde agmatin (40 mg/kg) uygulamasının farelerde depresyon-benzeri davranışları engelleyebildiği sükroz tercih ve zorunlu yüzme testleriyle raporlanmıştır. Dolayısıyla sözü edilen çalışmada temel olarak agmatinin oluşmuş olan depresyon üzerindeki etkinliği değil depresyon gelişimine etkisi

incelenmiştir (Gawali ve ark., 2017). Bu çerçevede, KÖHS modelinde agmatinin antidepresan-benzeri etkilerinin incelendiği çalışmalarla bulgularımızın uyumlu olduğu görülmektedir.

Çalışmamızda endojen NOS inhibitörü agmatinin antidepresan etki potansiyeli iki farklı NOS inhibitörü (iNOS inhibitörü aminoguanidin ve nNOS inhibitörü 3-Br-7-NI) ile karşılaştırmalı olarak incelendi. Çalışmamızda kullanılan iNOS ve nNOS inhibitörlerinin sükröz tercih ve zorunlu yüzme testlerinde antidepresan-benzeri etki meydana getirdiği görüldü. Yapılan önceki çalışmalarda seçici veya seçici olmayan çeşitli NOS inhibitörlerinin deney hayvanlarında antidepresan-benzeri etkiler meydana getirdiği gösterilmiştir (Wegener ve Volke, 2010). Antidepresan etki potansiyellerine dikkat çekilen bu inhibitörler arasında çalışmamızda kullanılan aminoguanidin ve 3-Br-7-NI de bulunmaktadır (Gilhotra ve Dhingra, 2009; Montezuma ve ark., 2012; Tomaz ve ark., 2014; Wegener ve Volke, 2010; Yazir ve ark., 2012). Bu noktada diğer seçici NOS inhibitörlerinde olduğu gibi çalışmamızda da kullanılan iNOS (aminoguanidin) ve nNOS (3-Br-7-NI) inhibitörleri seçici inhibitörler olarak anılmalarına karşın, kastedilenin esasında görece seçicilik olduğu, dolayısıyla görülen etkilerin tek bir NOS izoformuna atfedilemeyebileceği göz önünde bulundurulmalıdır.

Çalışmamızda kullanılan iNOS inhibitörü aminoguanidinin bu modelde kronik olarak uygulandığı bir çalışmaya literatürde rastlanamamıştır. Dolayısıyla çalışmamızda kullanılan aminoguanidin dozu (50 mg/kg) literatürde akut antidepresan etkilerinin gösterildiği sistemik doz aralığı (50-100 mg/kg) göz önünde bulundurularak seçildi (Gadek-Michalska ve ark., 2005; Gilhotra ve Dhingra, 2009; Harvey ve ark., 2005; Montezuma ve ark., 2012). Aminoguanidinin sistemik yolla ve akut (50 mg/kg; i.p.) olarak uygulanması ile akut kısıtlama stresine bağlı gelişen anksiyete-benzeri davranışları önlediğinin gösterilmesi bu çerçevede örnek olarak gösterilebilir (Gilhotra ve Dhingra, 2009). Çalışmamızda olduğu gibi KÖHS modelinin kullanıldığı tek bir çalışmada intrahipokampal aminoguanidin uygulamasının depresyon-benzeri davranışların gelişmesini önlediği gösterilmiştir (Wang ve ark., 2008). KÖHS modelinin 3 hafta süreyle, aminoguanidinin ise intrahipokampal yolla ve stres

prosedürüne eş zamanlı olarak uygulandığı sözü edilen çalışmanın bu modelde aminoguanidinin etkilerine ilişkin tek kaynak olduğu görülmektedir (Wang ve ark., 2008). Peng ve arkadaşlarının bir çalışmasında ise aminoguanidinden daha seçici bir iNOS inhibitörü olduğu bilinen 1400 W maddesi 4 haftalık KÖHS modelinde antidepresan etkileri yönünden incelenmiş ve 3 hafta süreyle sistemik 1400 W uygulamasının KÖHS ile oluşan depresyon-benzeri davranışları geri çevirdiği gösterilmiştir (Peng ve ark., 2012). Diğer taraftan aminoguanidinin bu modelde sistemik yolla ve kronik olarak uygulandığı ve modele bağlı depresyon-benzeri davranışların incelendiği bir çalışmanın literatürde bulunmadığı görülmektedir. İlk kez çalışmamızda sistemik yolla ve kronik olarak uygulanan aminoguanidin tedavisinin KÖHS ile oluşan depresyon-benzeri davranışları geri çevirdiği gösterildi.

Aminoguanidin ve çeşitli iNOS inhibitörlerinde olduğu gibi 7-nitroindazol gibi görece seçici nNOS inhibitörlerinin de antidepresan potansiyellerine geçmişte dikkat çekilmiştir (Joca ve Guimaraes, 2006; Mutlu ve ark., 2009; Wegener ve Volke, 2010; Yıldız ve ark., 2000; Zhou ve ark., 2007). 7-nitroindazolün KÖHS modelindeki etkileri farklı çalışmalarda incelenmesine karşın çalışmamızda kullanılan ve daha seçici olduğu kabul edilen bromlanmış formu (3-Br-7-NI) ile ilgili oldukça sınırlı bilgi bulunmaktadır. 3-Br-7-NI'nın antidepresan etkileri; Yazır ve arkadaşlarının çalışmalarında, 5 haftalık KÖHS modelinde incelenmiş ve çalışmamızda da kullanılan 20 mg/kg (i.p.) dozunda sükröz tercih ve zorunlu yüzme testlerinde etkili bulunmuştur (Yazır ve ark., 2012). Sözü edilen çalışmada 3-Br-7-NI'nın KÖHS prosedürüne eş zamanlı olarak uygulanmasından hareketle, depresyon-benzeri davranışların 3-Br-7-NI tedavisiyle önlenebileceği sonucuna varılırken, bu davranışların tedavi ile geri çevrilip çevrilemeyeceği sorusu yanıtlanamamıştır. Çalışmamızda ise stres maruziyeti ile anhedoninin geliştiğinin saptanmasından sonra başlanan ve 3 hafta süreyle uygulanan 3-Br-7-NI tedavisinin KÖHS ile oluşan depresyon-benzeri davranışları geri çevirdiği ilk kez gösterildi.

Özellikle son yıllarda dikkat çekilen depresyon ve inflamasyon ilişkisinden hareketle çalışmamızda KÖHS depresyon modeli ve uygulanan tedavilerin etkileri inflamatuvar mekanizmalar çerçevesinde irdelendi. Depresyon prevalansının birçok

otoimmün ve/veya kronik inflamatuvar hastalık varlığında normal popülasyona kıyasla arttığı, çeşitli proinflamatuvar sitokinlerin tedavi/uygulamalarının insan/hayvanlarda depresyon benzeri tablo meydana getirdiği, diğer taraftan bazı antiinflamatuvar yaklaşımların antidepresan etkiler oluşturduğu çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir (Faridhosseini ve ark., 2014; Haroon ve ark., 2014; Iwata ve ark., 2013; Koo ve Duman, 2008; Raison ve ark., 2006; Sahin ve ark., 2016b; Tying ve ark., 2006). Bu kapsamda inflamatuvar sitokinlerden özellikle IL-1 β düzeylerindeki değişikliklerin özellikle depresyon ve stresle ilişkili patolojilerde önemli bir faktör olabileceği düşünülmektedir (Iwata ve ark., 2013; Kaufmann ve ark., 2017; Koo ve Duman, 2008). Buradan hareketle son dönemde beyinde IL-1 β aracılı steril inflamasyon yanıtlarını başlatan bazı özelleşmiş intraselüler sinyal yolları üzerinde durulmaktadır (Iwata ve ark., 2013; Kaufmann ve ark., 2017). Bu kapsamda doğal immün sistem kalıp tanıma reseptör ailesinin bir üyesi olan NLRP inflamazomunun depresyon-nöroinflamasyon ilişkisine yeni bir boyut kazandırabileceği düşünülmektedir (Iwata ve ark., 2013). Normal koşullarda hücre sitozolünde inaktif yapıda bulunan NLRP; stres veya hasarlanma gibi tehlike uyarıları varlığında aktivasyona uğrayarak yapıya adaptör proteini ASC ve pro-kaspaz-1'in bağlanması gerçekleşir. Bu aktif multiprotein kompleks yapı inflamazom olarak adlandırılmaktadır (Schroder ve Tschopp, 2010). İnflamazom formasyonu ile kaspaz-1 aktivasyonu ve kaspaz-1 aracılı pro-IL-1 β ve pro-IL-18 öncül formlarından olgun IL-1 β ve IL-18 üretimi gerçekleşmektedir (Guarda ve So, 2010). Bu alanda son birkaç yılda yapılan çalışmalar beyinde özellikle mikroglia hücrelerinde yerleşim gösteren NLRP3 inflamazomu üzerine odaklanmıştır (Miller ve Raison, 2016). Diğer taraftan daha fazla nöronlarda eksprese olduğu bilinen NLRP1 inflamazomu ve depresyon nörobiyolojisindeki olası rolü hakkında literatürde bir bilgi bulunmamaktadır (Kigerl ve ark., 2014). Bu noktadan hareketle çalışmamızda MSS'de inflamazom formasyonu oluşturarak steril inflamasyon yanıtlarının başlatılmasında fonksiyon gösteren NLRP3 ve NLRP1 proteinleri ile ASC ve kaspaz-1 inflamazom bileşenlerinin gen ve protein ekspresyon düzeyleri araştırıldı.

Çalışmamızda depresyon modeli ve uygulanan tedavilerin inflamazom sinyal yolağı ve inflamatuvar yanıtlar üzerindeki etkileri prefrontal korteks ve hipokampus

bölgelerinde incelendi. Bölge seçimi; depresyon ve kullanılan modelde en fazla etkilendiği bilinen beyin bölgeleri göz önünde bulundurularak oluşturuldu (Deng ve ark., 2015a; 2015b; Liu ve ark., 2015; Otte ve ark., 2016; Palazidou, 2012; Pan ve ark., 2014). Genel çerçevede değerlendirildiğinde bu çalışmada KÖHS modelinin her iki beyin bölgesinde de inflamazom bileşenleri (NLRP1, NLRP3, kaspaz-1, ASC) ve eşlik eden IL-1 β düzeylerinde artışa yol açtığı görüldü.

2014 yılından bu yana yapılan deneysel ve küçük çaplı klinik çalışmalarda depresyonda NLRP3 inflamazom aktivasyonu rapor edilmektedir (Alcocer-Gomez ve ark., 2014; Alcocer-Gomez ve ark., 2016; Baune, 2015; Iwata ve ark., 2013; Li ve ark., 2016; Lu ve ark., 2014; Pan ve ark., 2014; Sahin ve ark., 2016a; Xue ve ark., 2015; Zhang ve ark., 2015; Zhang ve ark., 2014). Literatürde deneysel çalışmalarda dikkat çekilen NLRP3 inflamazom aktivasyonu; KÖHS, bakteriyel LPS uygulaması, akut/sub-kronik/kronik kısıtlama stresi modelleri, öğrenilmiş çaresizlik gibi deneysel depresyon modellerinde gösterilmiştir (Alcocer-Gomez ve ark., 2016; Iwata ve ark., 2016a; Pan ve ark., 2014; Sahin ve ark., 2016a; Zhang ve ark., 2016). Son yıllarda söz konusu modellere overoktemi ile indüklenen depresyon-benzeri davranışlar, prenatal stres gibi modellerin de eklendiği görülmektedir (Slusarczyk ve ark., 2016; Wang ve ark., 2016). Deneysel çalışmaların yanında Alcocer-Gomez ve arkadaşlarının majör depresyon hastalarında gerçekleştirdikleri küçük çaplı klinik çalışmalarında NLRP3 inflamazom aktivasyonu ilk kez hasta bireylerde rapor edilmiştir (Alcocer-Gomez ve ark., 2014). İlgili literatür incelendiğinde NLRP3 inflamazom aktivasyonunun genel olarak çalışmamızda da olduğu gibi NLRP3, ASC, kaspaz-1 bileşenleri ve beraberinde IL-1 β ekspresyonu ile değerlendirildiği görülmektedir (Kaufmann ve ark., 2017). Ekspresyon analizleri yönünden irdelendiğinde; çalışmaların büyük çoğunluğunda NLRP3 inflamazom aktivasyonu protein ekspresyon değişimleri ile tayin edilmiştir. Örneğin; Deng ve arkadaşlarının fareler üzerinde yaptıkları çalışmalarında 6 haftalık KÖHS prosedürü prefrontal korteks NLRP3, kaspaz-1, ASC protein düzeylerinde artış meydana getirirken, buna paralel olarak IL-1 β düzeyleri de yüksek bulunmuştur (Deng ve ark., 2015b). Benzer şekilde Liu ve arkadaşlarının çalışmasında KÖHS modeli oluşturulan sıçanlarda hipokampus NLRP3, kaspaz-1 ve ASC protein düzeylerinin arttığı ve bu artışa yüksek IL-1 β seviyelerinin eşlik ettiği rapor edilmiştir (Liu ve ark.,

2015). Benzer bulgular KÖHS modeli ile sıçanlar üzerinde gerçekleştirilen bir başka çalışmada prefrontal korteks bölgesinde de gösterilmiştir (Pan ve ark., 2014). Bahsi geçen çalışmalarda gösterilen ve artmış IL-1 β düzeyleri ile sonuçlanan ekspresyon değişimleri NLRP3 inflamazom aktivasyonunun göstergesi olarak kabul edilmiştir. Literatür ile uyumlu olarak; çalışmamızda da 6 haftalık KÖHS prosedürünün prefrontal korteks NLRP3, kaspaz-1, ASC ve IL-1 β protein düzeylerinde artışa yol açtığı gösterilerek, kronik stresin NLRP3 inflamazom aktivasyonuna neden olduğu sonucuna varıldı.

Çalışmamızda protein ekspresyon düzeylerine ek olarak inflamazom bileşenleri ve proinflamatuvar sitokinlerin gen ekspresyon düzeylerindeki değişimler de araştırıldı. Gen ekspresyon incelemeleri hipokampus ve prefrontal korteks olmak üzere iki beyin bölgesinde yapıldı. Kronik stres maruziyetinin inflamazom bileşenleri ve sitokin düzeyleri üzerine etkisi; araştırılan iki beyin bölgesinde genel olarak artış ile sonuçlanan uyumlu bir değişim grafiği izlemesine karşın; NLRP3 gen düzeylerinin stres ile bölge bazında farklı şekilde etkilendiği görüldü. Çalışmamızda KÖHS prosedürü ile prefrontal korteks NLRP3 gen düzeylerinde artış meydana gelmezken, hipokampus düzeyleri anlamlı ölçüde yüksek bulundu.

Depresyonda NLRP3 inflamazom aktivasyonunun incelendiği literatür çalışmalarının görece az bir bölümünde NLRP3 düzeylerinin gen ekspresyon analizleri ile değerlendirildiği görülmektedir (Alcocer-Gomez ve ark., 2014; Pan ve ark., 2014; Sahin ve ark., 2016a; Xu ve ark., 2016; Zhang ve ark., 2014; Zhang ve ark., 2016). Sözü edilen çalışmaların ise sadece birkaçında prefrontal korteks beyin bölgesi incelenmiştir (Alcocer-Gomez ve ark., 2016; Pan ve ark., 2014; Sahin ve ark., 2016a). Örneğin Alcocer-Gomez ve arkadaşlarının çalışmalarında 30 gün süreyle kronik kısıtlama stres modeli kullanılan farelerde prefrontal korteks NLRP3 gen düzeylerinin arttığı rapor edilmiştir (Alcocer-Gomez ve ark., 2016). Benzer şekilde ekibimiz tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada 7 gün süreyle oluşturulan sıçan sub-kronik stres modelinde prefrontal korteks NLRP3 gen düzeylerinin arttığı gösterilmiştir (Sahin ve ark., 2016a). Bu çalışmalarda kullanılan modellerin çalışmamız ile gösterdiği farklılıklar dikkate alındığında; prefrontal korteks NLRP3 gen düzeylerinde

rapor edilen artışın, kullanılan model ile ilişkili olabileceği göz önünde bulundurulmalıdır. Çalışmamızda olduğu gibi KÖHS modeli üzerinde gerçekleştirilen tek bir çalışmada prefrontal korteks NLRP3 gen düzeyleri incelenmiş ve artış rapor edilmiştir (Pan ve ark., 2014). Bu ve önceki çalışmanın NLRP3 gen düzeyi bulgularındaki farklılıklar; kullanılan KÖHS modelinin önceki çalışmada 12 hafta, bizim çalışmamızda ise 6 hafta olması ve kullanılan stresörlerdeki farklılıklar ile açıklanabilir. Dolayısıyla mevcut durumda prefrontal korteks ve NLRP3 gen düzeylerine ilişkin bulgulara farklılığının hangi faktörlere bağlı olduğu ancak bu modelde yapılan çalışmaların sayıca artması ve detaylandırılmasıyla mümkün olabilecektir.

Günümüzde kronik stres ile NLRP1 inflamazom aktivasyonu arasındaki olası ilişkinin incelendiği bir çalışma henüz bulunmamaktadır. İlk kez bu çalışma ile KÖHS depresyon modelinde NLRP3 yanında NLRP1 aktivasyonu incelendi ve NLRP1 ekspresyon düzeylerinin arttığı gösterildi. MSS’de temel olarak nöronal yerleşim gösterdiği bilinen NLRP1 inflamazomu aktivasyonuna, nörodejenerasyonun eşlik ettiği travmatik beyin hasarı, Alzheimer ve Parkinson hastalığı gibi patolojilerde dikkat çekilmiştir (Freeman ve Ting, 2016). Yakın tarihte yapılan bir çalışmada farelerde kronik glukokortikoid uygulamasına bağlı gelişen nörodejenerasyon tablosunda NLRP1 inflamazom aktivasyonunun rol oynayabileceği öne sürülmüştür (Hu ve ark., 2016). Bahsi geçen çalışmada NLRP1 inflamazom aktivasyonu çalışmamızda olduğu gibi NLRP1, kaspaz-1, ASC ve ayrıca çalışmamızdan farklı olarak kaspaz-5 inflamazom bileşenleri ile değerlendirilmiştir. Araştırmacıların bu ve izleyen çalışmalarında Alzheimer hastalığı çerçevesinde ele alınan kronik glukokortikoid uygulamasının; deney hayvanlarında depresyon modeli oluşturulmasında da kullanıldığı bilinmektedir (Freitas ve ark., 2016a; Olescowicz ve ark., 2017; Zhang ve ark., 2017; Zhang ve ark., 2017). Bu noktadan hareketle kronik glukokortikoid uygulaması ile rapor edilen NLRP1 inflamazom aktivasyonuna ilişkin bulgular; depresyon alanındaki çalışmalara projeksiyonu bakımından dikkat çekicidir. Çalışmamız ile NLRP1 inflamazomu ilk kez bir depresyon modelinde ele alınarak kronik stres maruziyeti ile oluşan depresyon-benzeri davranışlara NLRP1 inflamazom aktivasyonunun da eşlik edebileceği fikri ilk kez gündeme getirilmektedir.

Proinflamatuvar sitokinlerden IL-1 β ve IL-18 üretimi ve salınımı inflamazom aktivasyonuna bağımlı olarak gerçekleşmektedir (Kigerl ve ark., 2014). Çalışmamızda inflamazom aktivasyonunun değerlendirilmesinde NLRP inflamazom bileşenlerinin yanında sözü edilen iki sitokin düzeylerinde meydana gelen değişimler de incelendi. Bunlara ek olarak üretimi inflamazom aktivasyonundan bağımsız olarak gerçekleşen ve nöroinflamasyon süreçlerine katkısı bakımından önemli bir proinflamatuvar sitokin olduğu kabul edilen IL-6 düzeyleri de değerlendirmeye alındı. Buna göre; 6 haftalık kronik stres maruziyetinin sıçanlarda inflamazom bileşenlerine ek olarak hipokampus ve prefrontal kortekste IL-1 β ve IL-6 mRNA düzeylerinde artışa neden olduğu, IL-18 düzeylerinin ise yalnızca hipokampüste arttığı görüldü. Stres ile artan IL-1 β mRNA düzeylerinin, protein düzeylerine de yansıdığı tespit edildi.

IL-1 β beyinde mikrogliya, astrosit, nöron ve endotel hücrelerinde üretilen güçlü bir proinflamatuvar sitokin olup; strese karşı geliştirilen inflamatuvar yanıtlarda ilk basamakta yer alarak, depresyona eşlik eden nöroinflamasyon süreçlerinde önemli rol oynadığı düşünülmektedir (Kaufmann ve ark., 2017). Deneysel çalışmalarda IL-1 β uygulamasının veya endojen düzeylerindeki artışın deney hayvanlarında depresyon-benzeri davranışlarla ilişkili bulunduğu, diğer taraftan IL-1 reseptör antagonistlerinin stres ile oluşan davranış değişikliklerini önlediği gösterilmiştir (Goshen ve ark., 2008; Iwata ve ark., 2013; Koo ve Duman, 2008). Bu bulguları destekler nitelikte klinik çalışmalarda da depresyon hastalarının serum ve BOS'larında IL-1 β düzeylerinin arttığı rapor edilmiştir (Kaufmann ve ark., 2017). IL-1 β 'nın üretimi inaktif prekürsörü olan pro-IL-1 β üzerinden gerçekleşir. Pro-IL-1 β 'nın biyolojik olarak aktif ve olgun formu IL-1 β 'ya dönüşümü kaspaz-1 aktivasyonuna bağımlıdır. Pro-kaspaz-1 proenziminden kaspaz-1 oluşumu ise NLRP inflamazom aktivasyonu varlığında mümkündür (Iwata ve ark., 2013). Dolayısıyla NLRP inflamazom aktivasyonu değerlendirmesinin yapılabilmesi için eşlik eden IL-1 β üretimi ve salınımının bulunması gerekmektedir. Çalışmamızda stres ile artan NLRP inflamazom bileşenlerine IL-1 β düzeylerindeki artışın da eşlik ettiğinin görülmesi üzerine kronik stres ile inflamazom aktivasyonunun meydana geldiği sonucuna varılmıştır.

IL-1 β 'da olduğu gibi; IL-18 proinflatuvar sitokininin inaktif pro-IL-18'den üretimi inflamazom aktivasyonuna bağımlı olarak kaspaz-1 üzerinden gerçekleşmektedir (Davis ve ark., 2011). IL-18'in de MSS'de nöron, mikrogliya ve astrositlerde bulunduğu; HPA eksen aktivitesi ve nöroinflamasyon süreçlerinde aktif rol üstlenerek davranış ve duygudurumu etkileyebileceği gösterilmiştir (Alboni ve ark., 2010; Conti ve ark., 1999; Kaufmann ve ark., 2017). Çalışmamızda gen ekspresyonu yönünden değerlendirilen IL-18 düzeylerinin stres maruziyeti ile hipokampus bölgesinde arttığı görüldü. Depresyonda inflamazom aktivasyonunun ele alındığı literatür gözden geçirildiğinde, çalışmaların neredeyse tamamında inflamazom bileşenlerine ek olarak IL-1 β ekspresyonunun incelendiğı görülmeye karşın; IL-18 düzeylerindeki değişimin az sayıda çalışma ile ele alındığı görülmektedir (Alcocer-Gomez ve ark., 2017; Cao ve ark., 2017; Li ve ark., 2016; Wang ve ark., 2016; Xu ve ark., 2016; Zhu ve ark., 2017). Cao ve arkadaşlarının çalışmasında çalışmamızda da olduğu gibi 6 hafta süreyle uygulanan KÖHS modelinde hipokampal IL-18 mRNA düzeylerinin arttığı gösterilmiştir (Cao ve ark., 2017). Hipokampal IL-18 düzeylerinin incelendiğı ve artışın rapor edildiğı diğerk çalışmalarda overektomi veya LPS uygulaması ile oluşturulan depresyon modellerinin kullanıldığı görülmektedir (Wang ve ark., 2016; Xu ve ark., 2016; Zhu ve ark., 2017). Dolayısıyla çalışmamızda hipokampal IL-18 düzeylerine yönelik elde edilen bulguların literatür ile uyumlu olduğu görülmektedir. Diğerk taraftan depresyonda inflamazom bileşenlerine ek olarak IL-18 düzeylerinin prefrontal kortekste incelendiğı tek bir çalışma bulunmaktadır. Ekibimiz tarafından gerçekleştirilen çalışmada stresle oluşan inflamazom aktivasyonuna prefrontal kortekste IL-18 düzeylerinde artışın eşlik ettiğı gösterilmiştir (Sahin ve ark., 2016a). Bu çalışmada ise prefrontal kortekste IL-18 düzeylerinin önemli ölçüde değişmemesi, uygulanan stres protokollerinin süre ve içerik bakımından önceki çalışmadan farklı olmasıyla açıklanabilir. Bu bilgiler ışığında; kronik stres ve depresyonda prefrontal kortekste IL-18 düzeylerinin incelenmesine ihtiyaç duyulduğu anlaşılmaktadır.

Çalışmamızda TSA ilaçlar grubundan imipramin tedavisinin KÖHS ile oluşan NLRP inflamazom aktivasyonunu ve ilişkili proinflatuvar sitokin yanıtlarını bölge ve değerlendirilen parametre bazında farklı düzeylerde baskıladığı gösterildi.

İmipramin; KÖHS ile artan prefrontal korteks NLRP1, kaspaz-1 ve IL-1 β protein ekspresyon düzeylerini baskımlarken, NLRP3 ekspresyonu üzerine diğler tedavi grupları kadar etkili bulunmadı. Gen düzeyleri üzerindeki etkisi incelendiğinde imipramin tedavisinin; inflamazom bileşenleri ve proinflatuvar sitokin düzeylerini prefrontal korteks bölgesine kıyasla hipokampüste daha güçlü düzeyde baskıladığı gösterildi. İmipramin gibi klinikte sıklıkla kullanılan bir diğler antidepresan fluoksetinin deneysel çalışmalarda NLRP3 inflamazomu aktivasyonunu hipokampus ve prefrontal korteks bölgelerinde baskıladığı rapor edilmiştir (Deng ve ark., 2015a; 2015b; Liu ve ark., 2015; Lu ve ark., 2014; Pan ve ark., 2014; Xue ve ark., 2015). Diğler taraftan imipraminin inflamazom aktivasyonu üzerine etkisinin incelendiğı deneysel bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bir çalışmada imipramin gibi TSA ilaç grubundan amitriptilin ile tedavi edilen depresyon hastalarında NLRP3 inflamazom aktivasyonunun azaldığı gösterilmiştir (Alcocer-Gomez ve ark., 2014). Aynı ekibin 2017 tarihli izleyen klinik çalışmalarında ise bu kez tedavide sıklıkla kullanılan antidepresan ilaçların NLRP3 inflamazom aktivasyonu üzerine etkileri karşılaştırmalı olarak incelenmiştir (Alcocer-Gomez ve ark., 2017). Söz konusu çalışmada aralarında imipraminin de bulunduğı SSRI, SNRI, NARI ve atipik antidepresan ilaç üyelerinin inflamazom aktivasyonunu farklı düzeylerde baskılayabildiğı rapor edilmiştir (Alcocer-Gomez ve ark., 2017). Bu kapsamda çalışmamızda imipramin ile ilişkili bulguların bu alandaki literatürle uyumlu olduğı görölmektedir.

İlk kez bu çalışmada agmatin ve NOS inhibitörlerinin antidepresan etkileri ile NLRP inflamazom yolağı ilişkisi incelenmiştir. Önceki çalışmalarda agmatinin inflamasyonun eşlik ettiğı akut akciğler hasarı, pulmoner fibrozis, karaciğler yetmezliğı gibi patolojilerde antiinflatuvar etkileri rapor edilmiştir (El-Agamy ve ark., 2014a; 2014b; Li ve ark., 2014). Bunun yanı sıra in vitro hücre kültürü çalışmalarında agmatinin LPS ile uyarılan glia ve makrofaj hücrelerinde inflamatuvar medyatör salınımını azalttığı gösterilmiştir (Regunathan ve Piletz, 2003). Özellikle son yıllarda ise agmatinin antidepresan etki potansiyelinde inflamatuvar yanıtların baskılanmasının rolü olabileceğine ilişkin giderek güçlenen görüşler söz konusudur (Neis ve ark., 2014; Sahin ve ark., 2016a; Taksande ve ark., 2015). Bu kapsamda gerçekleştirilen az sayıdaki çalışma ile agmatinin etkileri bakteriyel LPS veya proinflatuvar sitokin

uygulamasý ile oluşturulan inflamatuvar depresyon ve stres etkenli depresyon modellerinde ele alınmıştır. Yapılan çalışmalarda agmatinin LPS uygulamasý ile artan proinflamatuvar sitokin yanıtını azalttığı, sitokin uygulamasý ile gelişen depresyon-benzeri davranışları geri çevirebildiği, kronik stres maruziyeti ile artan kortikosteron düzeylerini baskıladığı ve kortikosteron uygulamasý ile oluşan depresyon-benzeri davranışları düzelttiği de gösterilmiştir (Freitas ve ark., 2016a; Gawali ve ark., 2016; Neis ve ark., 2014; Sahin ve ark., 2016a; Taksande ve ark., 2015; Taksande ve ark., 2013). Bu bilgiler ışığında ilk kez ekibimiz tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada agmatinin NLRP3 inflamazomu ve ilişkili proinflamatuvar sitokin yanıtları üzerindeki etkisi incelenmiştir (Sahin ve ark., 2016a). İlgili çalışmada sıçanlara 7 gün süreyle günde 4 saat olmak üzere sub-kronik kısıtlama stresini uygulanmış ve agmatin (40 mg/kg; i.p.) son stres seansından 30 dakika önce uygulanmıştır. Akut agmatinin stres ile artan NLRP3 inflamazom bileşenlerinin gen ekspresyon düzeylerini azalttığı ve ayrıca proinflamatuvar sitokinler aracılığıyla gelişen inflamatuvar yanıtları baskılayabildiği gösterilmiştir (Sahin ve ark., 2016a). Sözü edilen çalışma bir depresyon modeli olmayıp agmatinin akut etkileri değerlendirilmiş ve agmatinin inflamazom aktivasyonunu baskılayabileceğine ilişkin bulgulardan hareketle bu çalışma tasarlanmıştır. Dolayısıyla bu çalışmada iyi valide edilmiş, geçerliliği ve güvenirliliği kanıtlanmış ve bu yönüyle son yıllarda en çok tercih edilen KHS modelinde agmatinin kronik uygulanması ile oluşan etkileri incelenmiştir.

Bu çalışmada agmatin tedavisi ile prefrontal kortekste KHS ile meydana gelen artmış inflamazom aktivasyonunun ve IL-1 β protein düzeylerinin baskılandığı saptandı. Agmatinin alışmamızda stres ile artan NLRP3 protein düzeyleri üzerindeki etkisinin NLRP1 ekspresyonu üzerindeki etkisine göre daha güçlü olması ve bu etkinin yalnızca agmatin tedavisi ile oluşması dikkate değer bulundu. Gen düzeyleri açısından değerlendirildiğinde agmatin tedavisi ile NLRP inflamazom bileşenleri ve proinflamatuvar sitokin düzeylerinin her iki beyin bölgesinde de farklı oranlarda baskılandığı görüldü. Buradan hareketle agmatinin antidepresan etki potansiyelinde kısmen NLRP3 ve NLRP1 inflamazom aktivasyonunun baskılanmasının rolü olabileceği sonucuna varıldı.

Bu çalışmada NO sinyal yolağı modülasyonunun stres-inflamazom-inflamasyon mekanizmaları üzerinden depresyon nörobiyolojisindeki yeri, antidepresan etki potansiyeli taşıyan endojen NOS inhibitörü agmatin, iNOS inhibitörü aminoguanidin ve nNOS inhibitörü 3-Br-7-NI kullanılarak karşılaştırmalı olarak incelendi. Buna göre aminoguanidin ve 3-Br-7-NI tedavilerinin NLRP inflamazom aktivasyonunu ve sitokin yanıtlarını değerlendirilen bölge ve parametre bazında farklı düzeylerde baskıladığı ilk kez gösterildi. L-arjinin/NOS/NO yolağının stresle ilişkili patolojilerin nörobiyolojisinde önemli rol oynadığı düşünülmektedir (Chen ve ark., 2015; Dhir ve Kulkarni, 2011; Kudlow ve ark., 2016). Atipik yapıda bir nörotransmitter/nöromodülatör olan NO; normal şartlarda MSS'de nörotransmisyonun düzenlenmesi, nöroproteksiyonun sağlanması, kognisyon gibi önemli fizyolojik süreçlerin sürdürülmesinde kritik fonksiyonlar üstlenmektedir (Dhir ve Kulkarni, 2011). Ancak L-arjinin/NOS/NO yolağında meydana gelen aşırı aktivasyon sonucu oluşan artmış NO düzeyleri nitrozatif ve oksidatif stres yanıtları ile karakterize nöroinflamasyon ve nörotoksiste mekanizmalarına katkıda bulunan bir patolojik faktör konumuna gelmektedir (Chen ve ark., 2015; Dhir ve Kulkarni, 2011; Kudlow ve ark., 2016). Seçici veya seçici olmayan çeşitli NOS enzimi inhibitörlerinin antidepresan ve anksiyolitik benzeri etkiler meydana getirdiği, diğer taraftan paroksetin gibi klinikte yaygın kullanılan bazı antidepresan ilaçların NOS inhibisyonu etkilerinin gösterilmesi; depresyonda nitriderjik sistem modülasyonunun potansiyel terapötik önemine işaret etmektedir (Wegener ve Volke, 2010).

NO sinyal yolağı modülasyonunun depresyon veya kronik stres patolojilerinde inflamazom aktivasyonu ve steril inflamasyon yanıtları üzerindeki etkisinin irdelendiği bir çalışma bulunmamaktadır. Kaufmann ve arkadaşlarının 2017 tarihli gözden geçirme çalışmalarında da bu hususa dikkat çekilmiş; depresyonla ilişkisi bakımından NO sinyal yolağının inflamazom kompleksi üzerindeki olası rollerinin araştırılması önemli bir gelecek hedefi olarak belirlenmiştir (Kaufmann ve ark., 2017). Çalışmamızda kullanılan NOS inhibitörlerinin kronik stres ile artan inflamazom aktivasyonunu ve sitokin yanıtlarını baskıladıkları görüldü. Protein ekspresyon değişimleri incelendiğinde NOS inhibitörlerinin prefrontal korteks NLRP1 düzeylerini agmatin tedavisine göre daha güçlü, NLRP3 ekspresyonunu ise daha zayıf düzeyde

baskıladıkları görüldü. Kaspaz-1 ve IL-1 β ekspresyonlarının ise tüm tedavilerle benzer şekilde güçlü bir biçimde azaldığı saptandı. Söz konusu bulgulardan hareketle çalışmamızda kullanılan NOS inhibitörleri özellikle NLRP1 inflamazomunun baskılanması ile ilişkili bulunarak proinflamatuvar IL-1 β yanıtlarını azalttığı sonucuna varıldı. Bakteriyel LPS uygulaması ile oluşturulan inflamatuvar depresyon modelinde NO sinyal yolağı modülatörlerinin IL-1 β düzeyleri üzerine etkisi incelenmiş ve aminoguanidin, L-NAME ve sildenafilin LPS ile artan IL-1 β düzeylerini azalttığı ve buna davranıştaki düzelmelerin eşlik ettiği gösterilmiştir (Tomaz ve ark., 2014).

Çalışmamızda gen ekspresyon bulgularının protein düzeylerine büyük oranda paralellik gösterdiği görüldü. Buna göre prefrontal kortekste NLRP1 gen düzeylerinin NOS inhibitörleri ile baskılandığı ve en güçlü etkinin nNOS inhibitörü ile olduğu saptandı. MSS'de nöronal yerleşim gösteren NLRP1 inflamazomunun NOS inhibitörleri ve özellikle nNOS inhibitörü (3-Br-7-NI) ile agmatinden daha güçlü bir şekilde baskılanması dikkate değer bulundu. Hipokampüste ise kronik stres ile artan NLRP3 düzeyleri en fazla agmatin ve daha az olmakla birlikte her iki NOS inhibitörü ile baskılandığı görüldü. Günümüze kadar NLRP inflamazom yolağının depresyondaki rolünü araştıran çalışmaların NLRP3 üzerine odaklandığı görülmektedir. Çalışmamızda nNOS inhibisyonun diğer tedavilerle karşılaştırıldığında daha çok nöronlarda eksprese edilen NLRP1 düzeyleri üzerinde daha etkili bulunması NLRP1 inflamazomunun da beklenmedik bir biçimde depresyonda önemli rolü olabileceği görüşünü gündeme getirdi.

Çalışmamızda inflamazom sinyal yolağı ve proinflamatuvar sitokin yanıtları yanında NOS izoenzimlerinin gen ekspresyon düzeyleri de incelendi. 6 hafta süreyle uygulanan KÖHS prosedürünün prefrontal korteks ve hipokampüste iNOS ve eNOS düzeylerinde artışa neden olduğu görüldü. Stresin iNOS düzeylerini artırabildiği önceki çalışmalarda gösterilmiş güncel bir çalışmada aynı bulguya ek olarak hipokampal NLRP3 inflamazom aktivasyonuna oksidatif-nitrozatif stres parametreleri, inflamatuvar sitokinlerdeki artışın da eşlik ettiği gösterilmiştir (Liu ve ark., 2015; Olivenza ve ark., 2000; Peng ve ark., 2012; Zlatkovic ve Filipovic, 2013).

Çalışmamızda da benzer şekilde iNOS düzeylerinin stres varlığında arttığı ve bu artışın NOS inhibitörleri başta olmak üzere tüm tedaviler ile baskılandığı görüldü.

Çalışmamızda kronik stres maruziyeti ile nNOS düzeylerinde artma eğilimi olmakla beraber anlamlı bir değişiklik saptanmadı. Günümüzde kısıtlı sayıda çalışma ile depresyon veya kronik stres tablosunda nNOS düzeylerinin incelendiği görülmektedir (Oliveira ve ark., 2008; Zhou ve ark., 2007). Bu çalışma ile gösterilen bulguların aksine Zhou ve arkadaşlarının çalışmasında KÖHS modeli oluşturulan farelerde hipokampus nNOS düzeylerinin yükseldiği, buna karşın iNOS ve eNOS düzeylerinin değişmediği saptanmıştır. Postmortem depresyon çalışmalarında ise farklı bulgular söz konusudur. Bir çalışmada depresyon ve bipolar hastalarında artmış hipokampal nNOS aktivitesi rapor edilirken, bir başka çalışmada ise locus coeruleus nNOS aktivitesi depresif bireylerde anlamlı ölçüde düşük bulunmuştur (Karolewicz ve ark., 2004; Oliveira ve ark., 2008). Bu alandaki kısıtlı literatür bilgisi göz önünde bulundurulduğunda; kronik stres ve depresyon tablosunda nNOS düzeylerinin beyin bölgesi bazında incelendiği çalışmalara ihtiyaç duyulduğu anlaşılmaktadır.

KÖHS modelinin 6 hafta uygulandığı bu çalışmada iNOS düzeylerine paralel olarak eNOS düzeylerinde de artış görüldü. İnsan beyninde eNOS enziminin endotel hücreleri dışında astroglia hücreleri ve nöronlarda da eksprese olduğu gösterilmiştir (Lüth ve ark., 2001). Bazı çalışmalarda glial eNOS ekspresyonundaki anormal değişimler ile Alzheimer hastalığının ilişkilendirildiği görülmektedir (de la Monte ve Bloch, 1997; Lüth ve ark., 2001). Benzer şekilde çalışmamızda da kronik strese bağlı gelişen GFAP immünopozitif astroglial aktivasyon bulguları eNOS düzeylerindeki artış ile birlikte değerlendirilebilir. Ancak depresyon veya stres patolojilerinde eNOS düzeylerinin ne yönde etkilendiği ve bu değişimin önemine ilişkin literatürde oldukça kısıtlı bilgi bulunduğu göz önünde bulundurulmalıdır. Yoshino ve arkadaşlarının 2017 yılı tarihli çalışmalarında aralarında paroksetinin de bulunduğu klinikte kullanılan bazı antidepresan ilaçların akut veya sub-kronik uygulamalarının sıçan beyninde eNOS gen düzeyleri üzerine etkisi araştırılmıştır (Yoshino ve ark., 2017). İlgili çalışmada kullanılan antidepresan ilaçların akut uygulanması durumunda eNOS düzeylerinin arttığı, sub-kronik uygulama ile ise eNOS düzeylerinin azaldığı gösterilmiştir

(Yoshino ve ark., 2017). Bir başka çalışmada ise kronik stres modeli oluşturulan sıçanların hipokampus beyin bölgelerinde eNOS protein ekspresyonları değerlendirilmiş ve kronik stres ile eNOS düzeylerinin azaldığı, diğer taraftan antidepresan venlafaksin kronik uygulaması ile eNOS düzeylerinin arttığı gösterilmiştir (Huang ve ark., 2014). Çalışmamızda kronik uygulanan NOS inhibitörleri stres ile artan eNOS düzeylerini azaltırken, agmatinin eNOS düzeyleri üzerinde etkileri araştırılan beyin bölgeleri bazında farklı bulundu. Buna göre; agmatinin prefrontal korteks eNOS düzeylerini artırırken, hipokampus düzeylerini azalttığı saptandı. Geçmiş tarihli çalışmalarda agmatininin üç NOS izoenzimini de inhibe ettiği kabul edilirken; izleyen yıllarda yapılan çalışmalarda agmatinin eNOS enzimini indüklediğine ilişkin bulgular öne sürülmüştür (Galea ve ark., 1996; Morrissey ve Klahr, 1997; Mun ve ark., 2010). Çalışmamızda agmatinin stres ile artan eNOS düzeyleri üzerindeki etkisine ilişkin bölge bazında edinilen karşıt bulguların protein ekspresyon analizleri ile desteklenmesi gerekmektedir.

Astrositler nöronlara enerji ve metabolik desteğin sağlanması, sinaptik büyüme ve sinyal iletimi, nöronlara nörotransmitter sunulması ve geri alınması, KBB yapısına katılmaları ve kan akımının düzenlenmesi gibi MSS’de nöroprotektif süreçlere katkı sağlamaktadır (Kim ve ark., 2017). Hasar veya inflamasyon gibi patofizyolojik bir durum varlığında ise astrositler reaktif tiplerine dönüşerek MSS’yi tehlikelere karşı savunmada diğer glia hücreleriyle (mikroglia, oligodendrosit vb.) birlikte aktif rol oynamaktadırlar. Reaktif astrositlerin tanımlanmasında kullanılan en yaygın yöntem ise hücre iskelet proteini olan GFAP ekspresyonunun değerlendirilmesidir (Brenner, 2014). Nöropsikiyatrik hastalıklarla ilişkisi yönünden; astrogliazis ve astrositopati olmak üzere iki farklı reaktif astrosit tablosunun önemine dikkat çekilmektedir (Pekny ve ark., 2016). Astrogliazis; temel olarak GFAP ekspresyonunda artış ve hipertrofi ile karakterize reaktif astrosit olarak tanımlanırken; astrositopatide GFAP ekspresyonunun azaldığı atrofiye bir astrosit tablosu görülmektedir. Travma, inme, beyin hasarı ve nörodejeneratif hastalıklarda GFAP ekspresyonunda artış ile karakterize astrogliazis tablosu rapor edilmektedir (Hol ve Pekny, 2015). Diğer taraftan özellikle stres ve depresyonda astrositopatiye işaret eden azalmış GFAP ekspresyonunun eşlik ettiğine dikkat çekilmiş; gerek postmortem depresyon

çalışmalarında gerekse kronik stres modellerinde GFAP düzeylerinde azalma rapor edilmiştir (Banasr ve ark., 2010; Kim ve ark., 2017; Liu ve ark., 2011; Rajkowska ve Miguel-Hidalgo, 2007; Rajkowska ve Stockmeier, 2013; Yang ve ark., 2014; Ye ve ark., 2011). Bu konudaki yaygın ve tutarlı raporlara karşın; azalmış GFAP düzeylerinin depresyonda görülen duygudurum bozukluklarına katkısı günümüzde halen tam olarak bilinmemektedir. Literatürün aksine çalışmamızda kronik stres maruziyeti ile hipokampal GFAP immünopozitif hücre sayısında artış meydana geldiği ve bu artışın tedaviler ile azaldığı saptandı. Çalışmamızda GFAP düzeylerinin astrogliosis ve nörojenerasyon tablosunu anımsatan bir şekilde artması, oluşturduğumuz model ile gelişen olası nöronal hasar süreçlerini ve nöronal yerleşimli NLRP1 inflamazomunun bu süreçlerdeki olası rolünü akla getirirse de bu varsayımın sınanması gerekmektedir. Diğer taraftan stres ve GFAP ekspresyonu bakımından literatüre ters düşen bulgularımızın tekrar edilebilirliğinin ve dolayısıyla güvenilirliğinin belirlenmesi büyük önem arz etmektedir.

Çalışmamızda birtakım kısıtlılıklar da mevcuttur. Bunlardan ilki; periferdeki inflamasyon yanıtlarının incelemelere dahil edilememiş olmasıdır. Dolayısıyla kronik stres maruziyetinin periferdeki sitokin yanıtlarını ne yönde etkilediği gösterilememiştir. Periferdeki inflamatuvar sinyallerinin sitokinler aracılığıyla beyne iletilebildiği, diğer taraftan MSS'de oluşan nöroinflamasyon yanıtlarının periferik yapıları etkileyebildiği bilinmektedir. Bu noktadan hareketle bu çalışmada öne sürülen inflamasyon bulgularının MSS ile sınırlı olup olmadığı veya periferdeki sitokin yanıtlarına ne ölçüde yansıdığına ilişkin sorular cevaplanamamıştır. MSS'de inflamazom formasyonu meydana getiren diğer reseptör proteinleri (NLRP2, AIM2, NLRC4 gibi) çalışmamıza dahil edilememiş ve dolayısıyla elde edilen bulgular NLRP1 ve NLRP3 inflamazomları ile sınırlı olarak irdelenebilmiştir. NLRP1 gibi sözü edilen inflamazomların da depresyondaki olası rolleri hakkında literatürde bir bilgi bulunmadığı görülmekte; dolayısıyla bu konuda yapılacak araştırmalar depresyonda inflamazom aktivasyon mekanizmalarına kazandırabileceği boyut bakımından önem arz etmektedir. Bir diğer husus ise çalışmamızda astroglia yanında mikrogliya aktivasyonunun değerlendirilememiş olmasıdır. Mikrogliyal aktivasyonun Iba-1 ve CD11b belirteçleri ile immünohistokimyasal yöntemle incelenmesi planlanmasına

karşın, antikor temini ve yöntemin oturtulmasında karşılaşılan güçlükler nedeniyle bütçe ve zaman problemi aşılamamıştır.

Çalışmamızda stresin NLRP3 düzeyleri üzerindeki etkisinin gen ve protein değişimleri bakımından ters korelasyon gösterdiği tespit edildi. KÖHS grubunda NLRP3 mRNA düzeyi azalma eğilimi göstermesine karşın; protein düzeyi yüksek bulundu. Bu gibi mRNA (düşük) ve protein (yüksek) ters korelasyon gösteren verilere ilişkin literatürde bazı açıklamalar getirildiği görülmektedir (Greenbaum ve ark., 2003). Bunlar; olasılıkla analiz yapıldığı zaman aralığında mRNA'nın protein translasyonuna harcanması, proteinin in vivo yarılanma ömrünün uzaması, post-transkripsiyonel veya post-translasyonel mekanizmaların olası rolü (miRNA vb.) veya yöntemden kaynaklanan bazı hatalarla ilişkili olabileceği düşünülmektedir (Greenbaum ve ark., 2003). Diğer taraftan araştırılan herhangi bir proteinin ekspresyonu ve fonksiyonları arasında nedensel bir ilişkinin kurulabilmesi için mRNA düzeyindeki incelemelerin tek başına yeterli olmadığı, mRNA analizlerinin daha ziyade protein ekspresyon verilerinin desteklenmesinde kullanılması önerilmektedir. Bu çalışmada da karşılaşıldığı üzere ters korelasyon görülen durumlarda mRNA ve protein bulgularının bağımsız birer bilgi kaynağı olarak ele alınması ve nedensel ilişkinin protein bulguları üzerinden kurulması şeklinde önermeler mevcuttur (Greenbaum ve ark., 2003). Bu bilgiler ışığında bu çalışmada NLRP3 protein ekspresyon verileri öncelikli dikkate alınarak aktivasyon irdelemesi yapıldı.

Sonuç olarak ilk kez bu çalışma ile;

(i) Kronik stres maruziyeti ile gelişen depresyon tablosu ve eşlik eden nöroinflamasyon yanıtlarının oluşmasında NLRP3 yanında NLRP1 inflamazom aktivasyonunun da rolü olabileceği,

(ii) Agmatinin antidepresan etki potansiyelinin inflamazom aktivasyon mekanizmaları ve özellikle NLRP3 inflamazomunun baskılanmasıyla ilişkili olabileceği,

(iii) iNOS ve nNOS inhibitörlerinin sistemik ve kronik olarak uygulanmasının kronik stres maruziyeti ile gelişen depresyon tablosunu geri çevirebildiği ve bu

yönüyle literatürde öne sürülen antidepresan potansiyellerinin bu çalışma ile detaylandırıldığı,

(iv) iNOS ve nNOS inhibitörlerinin antidepresan etki potansiyelinin inflamazom aktivasyon mekanizmaları ve özellikle NLRP1 inflamazomunun baskılanmasıyla ilişkili olabileceği,

(v) NO sinyal yolağı modülasyonunun depresyonda inflamazom aktivasyonu ile ilişkili görüldüğü ve bu açıdan terapötik değeri olabileceği sonuçlarına ulaşıldı.

Bu sonuçlardan hareketle; çalışmamızda agmatin ve NOS inhibitörleri üzerinden ele alınan nitriderjik sistem ve inflamazom yolağı ilişkisinin depresyonda yeni tedavi ve mekanizma yaklaşımlarına projeksiyon sağlayabilmesi ümit edilmekte ve bu yönüyle çalışmanın literatüre katkıda bulunduğu düşünülmektedir.

8. KAYNAKLAR

Abe K, Abe Y, Saito H. Agmatine suppresses nitric oxide production in microglia. *Brain Res.* 2000;872(1-2): 141-148.

Abelaira HM, Reus GZ, Quevedo J. Animal models as tools to study the pathophysiology of depression. *Rev Bras Psiquiatr.* 2013;35 (Suppl 2): 112-120.

Abulafia DP, de Rivero Vaccari JP, Lozano JD, Lotocki G, Keane RW, Dietrich WD. Inhibition of the inflammasome complex reduces the inflammatory response after thromboembolic stroke in mice. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2009;29(3): 534-544.

Adamczak S, Dale G, de Rivero Vaccari JP, Bullock MR, Dietrich WD, Keane RW. Inflammasome proteins in cerebrospinal fluid of brain-injured patients as biomarkers of functional outcome: clinical article. *J Neurosurg.* 2012;117(6): 1119-25.

Adamczak SE, de Rivero Vaccari JP, Dale G, Brand FJ, 3rd, Nonner D, Bullock MR, Dahl GP, Dietrich WD, Keane RW. Pyroptotic neuronal cell death mediated by the AIM2 inflammasome. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2014;34(4): 621-629.

Al Masri AA, El Eter E. Agmatine induces gastric protection against ischemic injury by reducing vascular permeability in rats. *World J Gastroenterol.* 2012;18(18): 2188-2196.

Alboni S, Cervia D, Sugama S, Conti B. Interleukin 18 in the CNS. *J Neuroinflammation.* 2010;7: 9.

Alcocer-Gomez E, Casas-Barquero N, Williams MR, Romero-Guillena SL, Canadas-Lozano D, Bullon P, Sanchez-Alcazar JA, Navarro-Pando JM, Cordero MD. Antidepressants induce autophagy dependent-NLRP3-inflammasome inhibition in major depressive disorder. *Pharmacol Res.* 2017;121: 114-121.

Alcocer-Gomez E, de Miguel M, Casas-Barquero N, Nunez-Vasco J, Sanchez-Alcazar JA, Fernandez-Rodriguez A, Cordero MD. NLRP3 inflammasome is

activated in mononuclear blood cells from patients with major depressive disorder. *Brain Behav Immun.* 2014;36: 111-117.

Alcocer-Gomez E, Ulecia-Moron C, Marin-Aguilar F, Rybkina T, Casas-Barquero N, Ruiz-Cabello J, Ryffel B, Apetoh L, Ghiringhelli F, Bullon P, Sanchez-Alcazar JA, Carrion AM, Cordero MD. Stress-induced depressive behaviors require a functional NLRP3 inflammasome. *Mol Neurobiol.* 2016;53(7): 4874-4882.

Aricioglu F, Kan B, Yillar O, Korcegez E, Berkman K. Effect of agmatine on electrically and chemically induced seizures in mice. *Ann N Y Acad Sci.* 2003a;1009: 141-146.

Aricioglu F, Korcegez E, Bozkurt A, Ozyalcin S. Effect of agmatine on acute and mononeuropathic pain. *Ann N Y Acad Sci.* 2003b;1009: 106-115.

Aricioglu F, Means A, Regunathan S. Effect of agmatine on the development of morphine dependence in rats: potential role of cAMP system. *Eur J Pharmacol.* 2004a;504(3): 191-197.

Aricioglu F, Paul IA, Regunathan S. Agmatine reduces only peripheral-related behavioral signs, not the central signs, of morphine withdrawal in nNOS deficient transgenic mice. *Neurosci Lett.* 2004b;354(2): 153-157.

Aricioglu F, Regunathan S, Piletz JE. Is agmatine an endogenous factor against stress? *Ann N Y Acad Sci.* 2003c;1009: 127-132.

Aricioglu F, Altunbas H. Is agmatine an endogenous anxiolytic/antidepressant agent? *Ann N Y Acad Sci.* 2003;1009: 136-140.

Aricioglu-Kartal F, Uzbay IT. Inhibitory effect of agmatine on naloxone-precipitated abstinence syndrome in morphine dependent rats. *Life Sci.* 1997;61(18): 1775-1781.

Auguet M, Viossat I, Marin JG, Chabrier PE. Selective inhibition of inducible nitric oxide synthase by agmatine. *Jpn J Pharmacol.* 1995;69(3): 285-287.

Ayensu WK, Pucilowski O, Mason GA, Overstreet DH, Rezvani AH, Janowsky DS. Effects of chronic mild stress on serum complement activity, saccharin preference, and corticosterone levels in Flinders lines of rats. *Physiology and Behavior*. 1995;57(1): 165-169.

Ban TA. From melancholia to depression. In: A history of diagnosis and treatment. International Network for the History of Neuropsychopharmacology. 2014, p: 2-20.

Banasr M, Chowdhury GM, Terwilliger R, Newton SS, Duman RS, Behar KL, Sanacora G. Glial pathology in an animal model of depression: reversal of stress-induced cellular, metabolic and behavioral deficits by the glutamate-modulating drug riluzole. *Mol Psychiatry*. 2010;15(5): 501-511.

Banks WA, Kastin AJ, Broadwell RD. Passage of cytokines across the blood-brain barrier. *Neuroimmunomodulation*. 1995;2(4): 241-248.

Barr AM, Markou A. Psychostimulant withdrawal as an inducing condition in animal models of depression. *Neurosci Biobehav Rev*. 2005;29(4-5): 675-706.

Barrientos RM, Sprunger DB, Campeau S, Higgins EA, Watkins LR, Rudy JW, Maier SF. Brain-derived neurotrophic factor mRNA downregulation produced by social isolation is blocked by intrahippocampal interleukin-1 receptor antagonist. *Neurosci*. 2003;121(4): 847-853.

Bauer C, Duewell P, Mayer C, Lehr HA, Fitzgerald KA, Dauer M, Tschopp J, Endres S, Latz E, Schnurr M. Colitis induced in mice with dextran sulfate sodium (DSS) is mediated by the NLRP3 inflammasome. *Gut*. 2010;59(9): 1192-1199.

Baune BT. Inflammation and neurodegenerative disorders: is there still hope for therapeutic intervention? *Curr Opin Psychiatry*. 2015;28(2): 148-154.

Ben Menachem-Zidon O, Goshen I, Kreisel T, Ben Menahem Y, Reinhartz E, Ben Hur T, Yirmiya R. Intrahippocampal transplantation of transgenic neural precursor cells overexpressing interleukin-1 receptor antagonist blocks chronic isolation-

induced impairment in memory and neurogenesis. *Neuropsychopharmacol.* 2008;33(9): 2251-2262.

Benamouzig R, Mahe S, Luengo C, Rautureau J, Tome D. Fasting and postprandial polyamine concentrations in the human digestive lumen. *Am J Clin Nutr.* 1997;65(3): 766-770.

Berman RM, Cappiello A, Anand A, Oren DA, Heninger GR, Charney DS, Krystal JH. Antidepressant effects of ketamine in depressed patients. *Biol Psychiatry.* 2000;47(4): 351-354.

Bernstein HG, Derst C, Stich C, Pruss H, Peters D, Krauss M, Bogerts B, Veh RW, Laube G. The agmatine-degrading enzyme agmatinase: a key to agmatine signaling in rat and human brain? *Amino Acids.* 2011;40(2): 453-465.

Bernstein HG, Stich C, Jager K, Dobrowolny H, Wick M, Steiner J, Veh R, Bogerts B, Laube G. Agmatinase, an inactivator of the putative endogenous antidepressant agmatine, is strongly upregulated in hippocampal interneurons of subjects with mood disorders. *Neuropharmacol.* 2012;62(1): 237-246.

Biala G, Pekala K, Boguszevska-Czubara A, Michalak A, Kruk-Slomka M, Grot K, Budzyska B. Behavioral and biochemical impact of chronic unpredictable mild stress on the acquisition of nicotine conditioned place preference in rats. *Mol Neurobiol.* 2017; doi: 10.1007/s12035-017-0585-4.

Bjorkqvist K. Social defeat as a stressor in humans. *Physiol Behav.* 2001;73(3): 435-442.

Blanchard RJ, McKittrick CR, Blanchard DC. Animal models of social stress: effects on behavior and brain neurochemical systems. *Physiol Behav.* 2001;73(3): 261-271.

Block SG, Nemeroff CB. Emerging antidepressants to treat major depressive disorder. *Asian J Psychiatr.* 2014;12: 7-16.

Blum-Degen D, Muller T, Kuhn W, Gerlach M, Przuntek H, Riederer P. Interleukin-1 beta and interleukin-6 are elevated in the cerebrospinal fluid of Alzheimer's and de novo Parkinson's disease patients. *Neurosci Lett*. 1995;202(1-2): 17-20.

Bodin P, Burnstock G. ATP-stimulated release of ATP by human endothelial cells. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1996;27(6): 872-875.

Borland LM, Michael AC. Voltammetric study of the control of striatal dopamine release by glutamate. *J Neurochem*. 2004;91(1): 220-229.

Borsini A, Zunszain PA, Thuret S, Pariante CM. The role of inflammatory cytokines as key modulators of neurogenesis. *Trends Neurosci*. 2015;38(3): 145-157.

Brenner M. Role of GFAP in CNS injuries. *Neurosci Lett*. 2014;565: 7-13.

Bromet E, Andrade LH, Hwang I, Sampson NA, Alonso J, de Girolamo G, de Graaf R, Demyttenaere K, Hu C, Iwata N, Karam AN, Kaur J, Kostyuchenko S, Lepine JP, Levinson D, Matschinger H, Mora ME, Browne MO, Posada-Villa J, Viana MC, Williams DR, Kessler RC. Cross-national epidemiology of DSM-IV major depressive episode. *BMC Med*. 2011;9: 90.

Budni J, Gadotti VM, Kaster MP, Santos AR, Rodrigues AL. Role of different types of potassium channels in the antidepressant-like effect of agmatine in the mouse forced swimming test. *Eur J Pharmacol*. 2007;575(1-3): 87-93.

Bufalino C, Hepgul N, Aguglia E, Pariante CM. The role of immune genes in the association between depression and inflammation: a review of recent clinical studies. *Brain Behav Immun*. 2013;31: 31-47.

Burnstock G. Autonomic neurotransmission: 60 years since sir Henry Dale. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2009;49: 1-30.

Cabella C, Gardini G, Corpillo D, Testore G, Bedino S, Solinas SP, Cravanzola C, Vargiu C, Grillo MA, Colombatto S. Transport and metabolism of agmatine in rat hepatocyte cultures. *Eur J Biochem*. 2001;268(4): 940-947.

Cai S, Huang S, Hao W. New hypothesis and treatment targets of depression: an integrated view of key findings. *Neurosci Bull.* 2015;31(1): 61-74.

Cao C, Su M, Zhou F. Mangiferin inhibits hippocampal NLRP3 inflammasome and exerts antidepressant effects in a chronic mild stress mice model. *Behav Pharmacol.* 2017;28(5): 356-364.

Capuron L, Neumeister G, Musselman DL, Lawson DH, Nemeroff CB, Fuchs D, Miller AH. Interferon-alpha-induced changes in tryptophan metabolism: relationship to depression and paroxetine treatment. *Biol Psychiatry.* 2003;54(9): 906-914.

Cassel SL, Eisenbarth SC, Iyer SS, Sadler JJ, Colegio OR, Tophy LA, Carter AB, Rothman PB, Flavell RA, Sutterwala FS. The Nalp3 inflammasome is essential for the development of silicosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105(26): 9035-9040.

Castrén E, Võikar V, Rantamäki T. Role of neurotrophic factors in depression. *Curr Opin Pharmacol.* 2007;7(1): 18-21.

Chandler S, Miller KM, Clements JM, Lury J, Corkill D, Anthony DC, Adams SE, Gearing AJ. Matrix metalloproteinases, tumor necrosis factor and multiple sclerosis: an overview. *J Neuroimmunol.* 1997;72(2): 155-161.

Chen HJ, Spiers JG, Sernia C, Lavidis NA. Response of the nitroergic system to activation of the neuroendocrine stress axis. *Front Neurosci.* 2015;9: 3.

Cheng Y, Pardo M, Armini Rde S, Martinez A, Mouhsine H, Zagury JF, Jope RS, Beurel E. Stress-induced neuroinflammation is mediated by GSK3-dependent TLR4 signaling that promotes susceptibility to depression-like behavior. *Brain Behav Immun.* 2016;53: 207-222.

Chesney E, Goodwin GM, Fazel S. Risks of all-cause and suicide mortality in mental disorders: a meta-review. *World Psychiatry.* 2014;13(2): 153-160.

Choi AJ, Ryter SW. Inflammasomes: molecular regulation and implications for metabolic and cognitive diseases. *Mol Cells.* 2014;37(6): 441-448.

Conti B, Park LC, Calingasan NY, Kim Y, Kim H, Bae Y, Gibson GE, Joh TH. Cultures of astrocytes and microglia express interleukin 18. *Brain Res Mol Brain Res*. 1999;67(1): 46-52.

Courteix C, Privat AM, Pelissier T, Hernandez A, Eschalier A, Fialip J. Agmatine induces antihyperalgesic effects in diabetic rats and a superadditive interaction with R(-)-3-(2-carboxypiperazine-4-yl)-propyl-1-phosphonic acid, a N-methyl-D-aspartate-receptor antagonist. *J Pharmacol Exp Ther*. 2007;322(3): 1237-1245.

Cuijpers P, Vogelzangs N, Twisk J, Kleiboer A, Li J, Penninx BW. Comprehensive meta-analysis of excess mortality in depression in the general community versus patients with specific illnesses. *Am J Psychiatry*. 2014;171(4): 453-462.

Czeh B, Fuchs E, Wiborg O, Simon M. Animal models of major depression and their clinical implications. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2016;64: 293-310.

Dang R, Zhou X, Tang M, Xu P, Gong X, Liu Y, Jiao H, Jiang P. Fish oil supplementation attenuates neuroinflammation and alleviates depressive-like behavior in rats submitted to repeated lipopolysaccharide. *Eur J Nutr*. 2017; doi: 10.1007/s00394-016-1373-z.

Dantzer R, O'Connor JC, Freund GG, Johnson RW, Kelley KW. From inflammation to sickness and depression: when the immune system subjugates the brain. *Nat Rev Neurosci*. 2008;9(1): 46-56.

Dantzer R, Walker AK. Is there a role for glutamate-mediated excitotoxicity in inflammation-induced depression? *J Neural Transm (Vienna)*. 2014;121(8): 925-932.

Davis BK, Wen H, Ting JP. The inflammasome NLRs in immunity, inflammation, and associated diseases. *Annu Rev Immunol*. 2011;29: 707-735.

de la Monte SM, Bloch KD. Aberrant expression of the constitutive endothelial nitric oxide synthase gene in Alzheimer disease. *Mol Chem Neuropathology*. 1997;30(1): 139-159.

de Rivero Vaccari JP, Bastien D, Yurcisin G, Pineau I, Dietrich WD, De Koninck Y, Keane RW, Lacroix S. P2X4 receptors influence inflammasome activation after spinal cord injury. *J Neurosci*. 2012a;32(9): 3058-3066.

de Rivero Vaccari JP, Dietrich WD, Keane RW. Activation and regulation of cellular inflammasomes: gaps in our knowledge for central nervous system injury. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2014;34(3): 369-375.

de Rivero Vaccari JP, Lotocki G, Marcillo AE, Dietrich WD, Keane RW. A molecular platform in neurons regulates inflammation after spinal cord injury. *J Neurosci*. 2008;28(13): 3404-3414.

de Rivero Vaccari JP, Minkiewicz J, Wang X, De Rivero Vaccari JC, German R, Marcillo AE, Dietrich WD, Keane RW. Astroglial activation involves retinoic acid-inducible gene-like signaling in the innate immune response after spinal cord injury. *Glia*. 2012b;60(3): 414-421.

Demady DR, Jianmongkol S, Vuletic JL, Bender AT, Osawa Y. Agmatine enhances the NADPH oxidase activity of neuronal NO synthase and leads to oxidative inactivation of the enzyme. *Mol Pharmacol*. 2001;59(1): 24-29.

Demehri S, Homayoun H, Honar H, Riazi K, Vafaie K, Roushanzamir F, Dehpour AR. Agmatine exerts anticonvulsant effect in mice: modulation by alpha 2-adrenoceptors and nitric oxide. *Neuropharmacol*. 2003;45(4): 534-542.

Deng XY, Li HY, Chen JJ, Li RP, Qu R, Fu Q, Ma SP. Thymol produces an antidepressant-like effect in a chronic unpredictable mild stress model of depression in mice. *Behav Brain Res*. 2015a;291: 12-19.

Deng XY, Xue JS, Li HY, Ma ZQ, Fu Q, Qu R, Ma SP. Geraniol produces antidepressant-like effects in a chronic unpredictable mild stress mice model. *Physiol Behav*. 2015b;152(Pt A): 264-271.

Deussing JM. Animal models of depression. *Drug Discov Today Dis Models*. 2006;3(4): 375-383.

Dhir A, Kulkarni SK. Nitric oxide and major depression. *Nitric Oxide*. 2011;24(3): 125-131.

Di Virgilio F. The therapeutic potential of modifying inflammasomes and NOD-like receptors. *Pharmacol Rev*. 2013;65(3): 872-905.

Dias Elpo Zomkowski A, Oscar Rosa A, Lin J, Santos AR, Calixto JB, Lucia Severo Rodrigues A. Evidence for serotonin receptor subtypes involvement in agmatine antidepressant like-effect in the mouse forced swimming test. *Brain Res*. 2004;1023(2): 253-263.

D'Mello C, Le T, Swain MG. Cerebral microglia recruit monocytes into the brain in response to tumor necrosis factor α signaling during peripheral organ inflammation. *J Neurosci*. 2009;29(7): 2089-2102.

Dostert C, Petrilli V, Van Bruggen R, Steele C, Mossman BT, Tschopp J. Innate immune activation through Nalp3 inflammasome sensing of asbestos and silica. *Science*. 2008;320(5876): 674-677.

Dowlati Y, Herrmann N, Swardfager W, Liu H, Sham L, Reim EK, Lanctot KL. A meta-analysis of cytokines in major depression. *Biol Psychiatry*. 2010;67(5): 446-457.

Du RH, Tan J, Sun XY, Lu M, Ding JH, Hu G. Fluoxetine Inhibits NLRP3 Inflammasome Activation: Implication in Depression. *Int J Neuropsychopharmacol*. 2016, 19: 9.

Duewell P, Kono H, Rayner KJ, Sirois CM, Vladimer G, Bauernfeind FG, Abela GS, Franchi L, Nunez G, Schnurr M, Espevik T, Lien E, Fitzgerald KA, Rock KL, Moore KJ, Wright SD, Hornung V, Latz E. NLRP3 inflammasomes are required for atherogenesis and activated by cholesterol crystals. *Nature*. 2010;464(7293): 1357-1361.

Duman CH. Models of Depression. *Vitam Horm*. 2010;82: 1-21.

El-Agamy DS, Makled MN, Gamil NM. Protective effects of agmatine against D-galactosamine and lipopolysaccharide-induced fulminant hepatic failure in mice. *Inflammopharmacology*. 2014a;22(3): 187-194.

El-Agamy DS, Sharawy MH, Ammar EM. Agmatine attenuates silica-induced pulmonary fibrosis. *Hum Exp Toxicol*. 2014b;33(6): 650-660.

Ellul P, Boyer L, Groc L, Leboyer M, Fond G. Interleukin-1 beta-targeted treatment strategies in inflammatory depression: toward personalized care. *Acta Psychiatr Scand*. 2016;134(6): 469-484.

Ernsberger P, Meeley MP, Mann JJ, Reis DJ. Clonidine binds to imidazole binding sites as well as alpha 2-adrenoceptors in the ventrolateral medulla. *Eur J Pharmacol*. 1987;134(1): 1-13.

Evans DL, Charney DS, Lewis L, Golden RN, Gorman JM, Krishnan KR, Nemeroff CB, Bremner JD, Carney RM, Coyne JC, Delong MR, Frasure-Smith N, Glassman AH, Gold PW, Grant I, Gwyther L, Ironson G, Johnson RL, Kanner AM, Katon WJ, Kaufmann PG, Keefe FJ, Ketter T, Laughren TP, Leserman J, Lyketsos CG, McDonald WM, McEwen BS, Miller AH, Musselman D, O'Connor C, Petitto JM, Pollock BG, Robinson RG, Roose SP, Rowland J, Sheline Y, Sheps DS, Simon G, Spiegel D, Stunkard A, Sunderland T, Tibbits P, Jr., Valvo WJ. Mood disorders in the medically ill: scientific review and recommendations. *Biol Psychiatry*. 2005;58(3): 175-189.

Eyre HA, Air T, Pradhan A, Johnston J, Lavretsky H, Stuart MJ, Baune BT. A meta-analysis of chemokines in major depression. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2016;68: 1-8.

Fairbanks CA, Schreiber KL, Brewer KL, Yu CG, Stone LS, Kitto KF, Nguyen HO, Grocholski BM, Shoeman DW, Kehl LJ, Regunathan S, Reis DJ, Yeziarski RP, Wilcox GL. Agmatine reverses pain induced by inflammation, neuropathy, and spinal cord injury. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97(19): 10584-10589.

Faridhosseini F, Sadeghi R, Farid L, Pourgholami M. Celecoxib: a new augmentation strategy for depressive mood episodes. A systematic review and meta-analysis of randomized placebo-controlled trials. *Hum Psychopharmacol*. 2014;29(3): 216-223.

Farsang C, Kapocsi J. Imidazoline receptors: from discovery to antihypertensive therapy (facts and doubts). *Brain Res Bull*. 1999;49(5): 317-331.

Feighner, JP, Robins E, Guze SB, Woodruff RA, Winokur G, Munoz, R. Diagnostic criteria for use in psychiatric research. *Arch Gen Psychiatry*. 1972;26(1): 57–63.

Felger JC, Li L, Marvar PJ, Woolwine BJ, Harrison DG, Raison CL, Miller AH. Tyrosine metabolism during interferon-alpha administration: association with fatigue and CSF dopamine concentrations. *Brain Behav Immun*. 2013;31: 153-160.

Feng Y, LeBlanc MH, Regunathan S. Agmatine reduces extracellular glutamate during pentylenetetrazole-induced seizures in rat brain: a potential mechanism for the anticonvulsive effects. *Neurosci Lett*. 2005;390(3): 129-133.

Feng Y, Piletz JE, Leblanc MH. Agmatine suppresses nitric oxide production and attenuates hypoxic-ischemic brain injury in neonatal rats. *Pediatr Res*. 2002;52(4): 606-611.

Finkel MS, Laghrissi-Thode F, Pollock BG, Rong J. Paroxetine is a novel nitric oxide synthase inhibitor. *Psychopharmacol Bull*. 1996;32(4): 653-658.

Fleshner M, Frank M, Maier SF. Danger signals and inflammasomes: stress-evoked sterile inflammation in mood disorders. *Neuropsychopharmacol*. 2017;42(1): 36-45.

Freeman LC, Ting JP. The pathogenic role of the inflammasome in neurodegenerative diseases. *J Neurochem*. 2016;136(Suppl 1): 29-38.

Freitas AE, Bettio LE, Neis VB, Santos DB, Ribeiro CM, Rosa PB, Farina M, Rodrigues AL. Agmatine abolishes restraint stress-induced depressive-like behavior and hippocampal antioxidant imbalance in mice. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2014;50: 143-150.

Freitas AE, Egea J, Buendia I, Gomez-Rangel V, Parada E, Navarro E, Casas AI, Wojnicz A, Ortiz JA, Cuadrado A, Ruiz-Nuno A, Rodrigues AL, Lopez MG. Agmatine, by improving neuroplasticity markers and inducing nrf2, prevents corticosterone-induced depressive-like behavior in mice. *Mol Neurobiol*. 2016a;53(5): 3030-3045.

Freitas AE, Neis VB, Rodrigues AL. Agmatine, a potential novel therapeutic strategy for depression. *Eur Neuropsychopharmacol*. 2016b;26(12): 1885-1899.

Fujigaki H, Saito K, Fujigaki S, Takemura M, Sudo K, Ishiguro H, Seishima M. The signal transducer and activator of transcription 1alpha and interferon regulatory factor 1 are not essential for the induction of indoleamine 2,3-dioxygenase by lipopolysaccharide: involvement of p38 mitogen-activated protein kinase and nuclear factor-kappaB pathways, and synergistic effect of several proinflammatory cytokines. *J Biochem*. 2006;139(4): 655-662.

Gadek-Michalska A, Spycka J, Bugajski J. Psychosocial stress affects the involvement of prostaglandins and nitric oxide in the lipopolysaccharide-induced hypothalamic-pituitary-adrenal response. *J Physiol Pharmacol*. 2005;56(2): 287-298.

Galea E, Regunathan S, Eliopoulos V, Feinstein DL, Reis DJ. Inhibition of mammalian nitric oxide synthases by agmatine, an endogenous polyamine formed by decarboxylation of arginine. *Biochem J*. 1996;316 (Pt 1): 247-249.

Galgano F, Caruso M, Condelli N, Favati F. Focused review: agmatine in fermented foods. *Front Microbiol*. 2012;3: 199.

Gao Y, Gumusel B, Koves G, Prasad A, Hao Q, Hyman A, Lipton H. Agmatine: a novel endogenous vasodilator substance. *Life Sci*. 1995;57(8): 183-186.

Gawali NB, Bulani VD, Chowdhury AA, Deshpande PS, Nagmoti DM, Juvekar AR. Agmatine ameliorates lipopolysaccharide induced depressive-like behaviour in mice by targeting the underlying inflammatory and oxido-nitrosative mediators. *Pharmacol Biochem Behav*. 2016;149: 1-8.

Gawali NB, Bulani VD, Gursahani MS, Deshpande PS, Kothavade PS, Juvekar AR. Agmatine attenuates chronic unpredictable mild stress-induced anxiety, depression-like behaviours and cognitive impairment by modulating nitrergic signalling pathway. *Brain Res.* 2017;1663: 66-77.

Geschwind DH, Flint J. Genetics and genomics of psychiatric disease. *Science.* 2015;349(6255): 1489-1494.

Gilad GM, Wollam Y, Iaina A, Rabey JM, Chernihovsky T, Gilad VH. Metabolism of agmatine into urea but not into nitric oxide in rat brain. *Neuroreport.* 1996;7(11): 1730-1732.

Gilad GM, Gilad VH. Accelerated functional recovery and neuroprotection by agmatine after spinal cord ischemia in rats. *Neurosci Lett.* 2000;296(2-3): 97-100.

Gilad VH, Rabey JM, Kimiagar Y, Gilad GM. The polyamine stress response: tissue-, endocrine-, and developmental-dependent regulation. *Biochem Pharmacol.* 2001;61(2): 207-213.

Gilhotra N, Dhingra D. Involvement of NO-cGMP pathway in anti-anxiety effect of aminoguanidine in stressed mice. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2009;33(8): 1502-1507.

Glavin GB, Carlisle MA, Smyth DD. Agmatine, an endogenous imidazoline receptor agonist, increases gastric secretion and worsens experimental gastric mucosal injury in rats. *J Pharmacol Exp Ther.* 1995;274(2): 741-744.

Gonzalez C, Regunathan S, Reis DJ, Estrada C. Agmatine, an endogenous modulator of noradrenergic neurotransmission in the rat tail artery. *Br J Pharmacol.* 1996;119(4): 677-684.

Goodkind M, Eickhoff SB, Oathes DJ, Jiang Y, Chang A, Jones-Hagata LB, Ortega BN, Zaiko YV, Roach EL, Korgaonkar MS, Grieve SM, Galatzer-Levy I, Fox PT, Etkin A. Identification of a common neurobiological substrate for mental illness. *JAMA Psychiatry.* 2015;72(4): 305-315.

Gorbatyuk OS, Milner TA, Wang G, Regunathan S, Reis DJ. Localization of agmatine in vasopressin and oxytocin neurons of the rat hypothalamic paraventricular and supraoptic nuclei. *Exp Neurol*. 2001;171(2): 235-245.

Goshen I, Kreisel T, Ben-Menachem-Zidon O, Licht T, Weidenfeld J, Ben-Hur T, Yirmiya R. Brain interleukin-1 mediates chronic stress-induced depression in mice via adrenocortical activation and hippocampal neurogenesis suppression. *Mol Psychiatry*. 2008;13(7): 717-728.

Greenbaum D, Colangelo C, Williams K, Gerstein M. Comparing protein abundance and mRNA expression levels on a genomic scale. *Genome Biol*. 2003;4(9): 117.

Grillo MA, Colombatto S. Metabolism and function in animal tissues of agmatine, a biogenic amine formed from arginine. *Amino Acids*. 2004;26(1): 3-8.

Guarda G, So A. Regulation of inflammasome activity. *Immunology*. 2010;130(3): 329-336.

Haapakoski R, Ebmeier KP, Alenius H, Kivimaki M. Innate and adaptive immunity in the development of depression: An update on current knowledge and technological advances. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2016;66: 63-72.

Haenisch B, Bonisch H, Cichon S, Allam JP, Novak N, Molderings GJ. Effects of exogenous agmatine in human leukemia HMC-1 and HL-60 cells on proliferation, polyamine metabolism and cell cycle. *Leuk Res*. 2011;35(9): 1248-1253.

Haenisch B, von Kugelgen I, Bonisch H, Gothert M, Sauerbruch T, Schepke M, Marklein G, Hofling K, Schroder D, Molderings GJ. Regulatory mechanisms underlying agmatine homeostasis in humans. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2008;295(5): 1104-1110.

Halaris A, Zhu H, Feng Y, Piletz JE. Plasma agmatine and platelet imidazoline receptors in depression. *Ann N Y Acad Sci*. 1999;881: 445-451.

Halaris A, Piletz JE. Imidazoline receptors: possible involvement in the pathophysiology and treatment of depression. *Hum Psychopharmacol*. 2001;16(1): 65-69.

Halle A, Hornung V, Petzold GC, Stewart CR, Monks BG, Reinheckel T, Fitzgerald KA, Latz E, Moore KJ, Golenbock DT. The NALP3 inflammasome is involved in the innate immune response to amyloid-beta. *Nat Immunol*. 2008;9(8): 857-865.

Hamilton JP, Etkin A, Furman DJ, Lemus MG, Johnson RF, Gotlib IH. Functional neuroimaging of major depressive disorder: a meta-analysis and new integration of base line activation and neural response data. *Am J Psychiatry*. 2012;169(7): 693-703.

Hardingham GE, Fukunaga Y, Bading H. Extrasynaptic NMDARs oppose synaptic NMDARs by triggering CREB shut-off and cell death pathways. *Nat Neurosci*. 2002;5(5): 405-414.

Haroon E, Fleischer CC, Felger JC, Chen X, Woolwine BJ, Patel T, Hu XP, Miller AH. Conceptual convergence: increased inflammation is associated with increased basal ganglia glutamate in patients with major depression. *Mol Psychiatry*. 2016;21(10): 1351-1357.

Haroon E, Woolwine BJ, Chen X, Pace TW, Parekh S, Spivey JR, Hu XP, Miller AH. IFN-alpha-induced cortical and subcortical glutamate changes assessed by magnetic resonance spectroscopy. *Neuropsychopharmacol*. 2014;39(7): 1777-1785.

Harvey BH, Bothma T, Nel A, Wegener G, Stein DJ. Involvement of the NMDA receptor, NO-cyclic GMP and nuclear factor K-beta in an animal model of repeated trauma. *Hum Psychopharmacol*. 2005;20(5): 367-373.

Haulica I, Bild W, Iliescu R, Georgescu R, Frunza F. Preliminary research on possible relationship of NO with agmatine at the vascular level. *Rom J Physiol*. 1999;36(1-2): 67-79.

Heim C, Binder EB. Current research trends in early life stress and depression: review of human studies on sensitive periods, gene-environment interactions, and epigenetics. *Exp Neurol*. 2012;233(1): 102-111.

Heim C, Nemeroff CB. The role of childhood trauma in the neurobiology of mood and anxiety disorders: preclinical and clinical studies. *Biol Psychiatry*. 2001;49(12): 1023-1039.

Heisler LK, Chu HM, Brennan TJ, Danao JA, Bajwa P, Parsons LH, Tecott LH. Elevated anxiety and antidepressant-like responses in serotonin 5-HT_{1A} receptor mutant mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95(25): 15049-15054.

Hendriksen H, Korte SM, Olivier B, Oosting RS. The olfactory bulbectomy model in mice and rat: one story or two tails? *Eur J Pharmacol*. 2015;753: 105-113.

Heneka MT, Kummer MP, Stutz A, Delekate A, Schwartz S, Vieira-Saecker A, Griep A, Axt D, Remus A, Tzeng TC, Gelpi E, Halle A, Korte M, Latz E, Golenbock DT. NLRP3 is activated in Alzheimer's disease and contributes to pathology in APP/PS1 mice. *Nature*. 2013;493(7434): 674-678.

Hol EM, Pekny M. Glial fibrillary acidic protein (GFAP) and the astrocyte intermediate filament system in diseases of the central nervous system. *Curr Opin Cell Biol*. 2015;32: 121-130.

Horowitz MA, Zunszain PA. Neuroimmune and neuroendocrine abnormalities in depression: two sides of the same coin. *Ann N Y Acad Sci*. 2015;1351: 68-79.

Horwitz AV, Wakefield JC, Lorenzo-Luaces L. History of depression. In: DeRubeis RJ, Strunk DR, eds. *The Oxford Handbook of Mood Disorders*. Oxford University Press, New York; 2016, p:1-24.

Hovens JG, Giltay EJ, Wiersma JE, Spinhoven P, Penninx BW, Zitman FG. Impact of childhood life events and trauma on the course of depressive and anxiety disorders. *Acta Psychiatr Scand*. 2012;126(3): 198-207.

Hu W, Zhang Y, Wu W, Yin Y, Huang D, Wang Y, Li W, Li W. Chronic glucocorticoids exposure enhances neurodegeneration in the frontal cortex and hippocampus via NLRP-1 inflammasome activation in male mice. *Brain Behav Immun*. 2016;52: 58-70.

Huang X, Mao YS, Li C, Wang H, Ji JL. Venlafaxine inhibits apoptosis of hippocampal neurons by up-regulating brain-derived neurotrophic factor in a rat depression model. *Int J Clin Exp Pathol*. 2014;7(8): 4577-4586.

Huhman KL. Social conflict models: can they inform us about human psychopathology? *Horm Behav*. 2006;50(4): 640-646.

Hyman S. Depression needs large human-genetics studies. *Nature*. 2014;515(7526): 189.

Iwata M, Ishida H, Kaneko K, Shirayama Y. Learned helplessness activates hippocampal microglia in rats: A potential target for the antidepressant imipramine. *Pharmacol Biochem Behav*. 2016a;150-151: 138-146.

Iwata M, Ota KT, Li XY, Sakaue F, Li N, Dutheil S, Banasr M, Duric V, Yamanashi T, Kaneko K, Rasmussen K, Glasebrook A, Koester A, Song D, Jones KA, Zorn S, Smagin G, Duman RS. Psychological stress activates the inflammasome via release of adenosine triphosphate and stimulation of the purinergic type 2X7 receptor. *Biol Psychiatry*. 2016b;80(1): 12-22.

Iwata M, Ota KT, Duman RS. The inflammasome: pathways linking psychological stress, depression, and systemic illnesses. *Brain Behav Immun*. 2013;31: 105-114.

Iyo AH, Zhu MY, Ordway GA, Regunathan S. Expression of arginine decarboxylase in brain regions and neuronal cells. *J Neurochem*. 2006;96(4): 1042-1050.

Jackson SW. A history of melancholia and depression. In: *History of Psychiatry and Medical Psychology*. Springer US; 2008, p:443-460.

Jeon SW, Kim YK. Neuroinflammation and cytokine abnormality in major depression: cause or consequence in that illness? *World J Psychiatry*. 2016;6(3): 283-293.

Jia KK, Zheng YJ, Zhang YX, Liu JH, Jiao RQ, Pan Y, Kong LD. Banxia-houpu decoction restores glucose intolerance in CUMS rats through improvement of insulin signaling and suppression of NLRP3 inflammasome activation in liver and brain. *J Ethnopharmacol*. 2017;209: 219-229.

Joca SR, Guimaraes FS. Inhibition of neuronal nitric oxide synthase in the rat hippocampus induces antidepressant-like effects. *Psychopharmacol (Berl)*. 2006;185(3): 298-305.

Joshi MS, Ferguson TB, Jr., Johnson FK, Johnson RA, Parthasarathy S, Lancaster JR, Jr. Receptor-mediated activation of nitric oxide synthesis by arginine in endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(24): 9982-9987.

Karolewicz B, Szebeni K, Stockmeier CA, Konick L, Overholser JC, Jurjus G, Roth BL, Ordway GA. Low nNOS protein in the locus coeruleus in major depression. *J Neurochem*. 2004;91(5): 1057-1066.

Kaster MP, Moretti M, Cunha MP, Rodrigues AL. Novel approaches for the management of depressive disorders. *Eur J Pharmacol*. 2016;771: 236-240.

Kato H, Takahashi K, Fujita T. RIG-I-like receptors: cytoplasmic sensors for non-self RNA. *Immunol Rev*. 2011;243(1): 91-98.

Kato TA, Kanba S. Are microglia minding us? Digging up the unconscious mind-brain relationship from a neuropsychanalytic approach. *Front Hum Neurosci*. 2013;7: 13.

Katz RJ, Roth KA, Carroll BJ. Acute and chronic stress effects on open field activity in the rat: implications for a model of depression. *Neurosci Biobehav Rev*. 1981a;5(2): 247-51.

Katz RJ, Roth KA, Schmaltz K. Amphetamine and tranylcypromine in an animal model of depression: pharmacological specificity of the reversal effect. *Neurosci Biobehav Rev.* 1981b;5(2): 259-64.

Katz RJ, Hersh S. Amitriptyline and scopolamine in an animal model of depression. *Neurosci Biobehav Rev.* 1981;5(2): 265-271.

Katz RJ. Animal model of depression: Pharmacological sensitivity of a hedonic deficit. *Pharmacol Biochem Behav.* 1982;16(6): 965-968.

Kaufmann FN, Costa AP, Ghisleni G, Diaz AP, Rodrigues AL, Peluffo H, Kaster MP. Nlrp3 inflammasome-driven pathways in depression: clinical and preclinical findings. *Brain Behav Immun.* 2017;64: 367-383.

Kelly JP, Wrynn AS, Leonard BE. The olfactory bulbectomized rat as a model of depression: an update. *Pharmacol Ther.* 1997;74(3): 299-316.

Kersse K, Bertrand MJ, Lamkanfi M, Vandenabeele P. NOD-like receptors and the innate immune system: coping with danger, damage and death. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2011;22(5-6): 257-276.

Kessler RC. The costs of depression. *Psychiatr Clin North Am.* 2012;35(1): 1-14.

Kessler RC. The effects of stressful life events on depression. *Annu Rev Psychol.* 1997;48: 191-214.

Kigerl KA, de Rivero Vaccari JP, Dietrich WD, Popovich PG, Keane RW. Pattern recognition receptors and central nervous system repair. *Exp Neurol.* 2014;258: 5-16.

Kim R, Healey KL, Sepulveda-Orengo MT, Reissner KJ. Astroglial correlates of neuropsychiatric disease: from astrocytopathy to astrogliosis. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2017; doi: 10.1016/j.pnpbp.2017.10.002.

Kitagami T, Yamada K, Miura H, Hashimoto R, Nabeshima T, Ohta T. Mechanism of systemically injected interferon-alpha impeding monoamine biosynthesis in rats:

role of nitric oxide as a signal crossing the blood-brain barrier. *Brain Res.* 2003;978 (1-2): 104-114.

Kolesnikov Y, Jain S, Pasternak GW. Modulation of opioid analgesia by agmatine. *Eur J Pharmacol.* 1996;296(1): 17-22.

Koo JW, Russo SJ, Ferguson D, Nestler EJ, Duman RS. Nuclear factor-kappaB is a critical mediator of stress-impaired neurogenesis and depressive behavior. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107(6): 2669-2674.

Koo JW, Duman RS. IL-1beta is an essential mediator of the antineurogenic and anhedonic effects of stress. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105(2): 751-756.

Kotagale NR, Paliwal NP, Aglawe MM, Umekar MJ, Taksande BG. Possible involvement of neuropeptide Y Y1 receptors in antidepressant like effect of agmatine in rats. *Peptides.* 2013a;47: 7-11.

Kotagale NR, Tripathi SJ, Aglawe MM, Chopde CT, Umekar MJ, Taksande BG. Evidences for the agmatine involvement in antidepressant like effect of bupropion in mouse forced swim test. *Pharmacol Biochem Behav.* 2013b;107: 42-47.

Krass M, Wegener G, Vasar E, Volke V. Antidepressant-like effect of agmatine is not mediated by serotonin. *Behav Brain Res.* 2008;188(2): 324-328.

Krishnan V, Nestler EJ. Animal models of depression: molecular perspectives. *Curr Top Behav Neurosci.* 2011;7: 121-147.

Kronfol Z, Remick DG. Cytokines and the brain: implications for clinical psychiatry. *Am J Psychiatry.* 2000;157(5): 683-694.

Krystal JH, Sanacora G, Duman RS. Rapid-acting glutamatergic antidepressants: the path to ketamine and beyond. *Biol Psychiatry.* 2013;73(12): 1133-1141.

Kubota T, Koike R. Cryopyrin-associated periodic syndromes: background and therapeutics. *Mod Rheumatol.* 2010;20(3): 213-221.

Kudlow P, Cha DS, Carvalho AF, McIntyre RS. Nitric oxide and major depressive disorder: pathophysiology and treatment implications. *Curr Mol Med*. 2016;16(2): 206-215.

Kuhn R. Treatment of depressive states with an iminodibenzyl derivative (G 22355). *Schweiz Med Wochenschr*. 1957;87(35-36): 1135-1140.

Lamkanfi M, Dixit VM. Inflammasomes and their roles in health and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2012;28: 137-161.

Lane T, Flam B, Lockey R, Kolliputi N. TXNIP shuttling: missing link between oxidative stress and inflammasome activation. *Front Physiol*. 2013;4: 50.

Lei Y, Chen CJ, Yan XX, Li Z, Deng XH. Early-life lipopolysaccharide exposure potentiates forebrain expression of NLRP3 inflammasome proteins and anxiety-like behavior in adolescent rats. *Brain Res*. 2017;1671: 43-54.

Lemaitre B, Nicolas E, Michaut L, Reichhart JM, Hoffmann JA. The dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell*. 1996;86(6): 973-983.

Leonard BE. The olfactory bulbectomized rat as a model of depression. *Pol J Pharmacol Pharm*. 1984;36(5): 561-569.

Lepine JP, Briley M. The increasing burden of depression. *Neuropsychiatr Dis Treat*. 2011;7(Suppl 1): 3-7.

Li G, Regunathan S, Barrow CJ, Eshraghi J, Cooper R, Reis DJ. Agmatine: an endogenous clonidine-displacing substance in the brain. *Science*. 1994;263(5149): 966-969.

Li G, Regunathan S, Reis DJ. Agmatine is synthesized by a mitochondrial arginine decarboxylase in rat brain. *Ann N Y Acad Sci*. 1995;763: 325-329.

Li J, Li X, Pei G, Qin BY. Correlation between inhibitions of morphine withdrawal and nitric-oxide synthase by agmatine. *Zhongguo Yao Li Xue Bao*. 1999;20(4): 375-380.

Li R, Wang X, Qin T, Qu R, Ma S. Apigenin ameliorates chronic mild stress-induced depressive behavior by inhibiting interleukin-1 β production and NLRP3 inflammasome activation in the rat brain. *Behav Brain Res*. 2016;296: 318-325.

Li X, Liu Z, Jin H, Fan X, Yang X, Tang W, Yan J. Agmatine protects against zymosan-induced acute lung injury in mice by inhibiting NF-kappaB-mediated inflammatory response. *Biomed Res Int*. 2014;2014: 583736.

Li YF, Chen HX, Liu Y, Zhang YZ, Liu YQ, Li J. Agmatine increases proliferation of cultured hippocampal progenitor cells and hippocampal neurogenesis in chronically stressed mice. *Acta Pharmacol Sin*. 2006;27(11): 1395-1400.

Li YF, Gong ZH, Cao JB, Wang HL, Luo ZP, Li J. Antidepressant-like effect of agmatine and its possible mechanism. *Eur J Pharmacol*. 2003;469(1-3): 81-88.

Liebenberg N, Joca S, Wegener G. Nitric oxide involvement in the antidepressant-like effect of ketamine in the Flinders sensitive line rat model of depression. *Acta Neuropsychiatr*. 2015;27(2): 90-96.

Liu B, Xu C, Wu X, Liu F, Du Y, Sun J, Tao J, Dong J. Icariin exerts an antidepressant effect in an unpredictable chronic mild stress model of depression in rats and is associated with the regulation of hippocampal neuroinflammation. *Neurosci*. 2015;294: 193-205.

Liu HD, Li W, Chen ZR, Hu YC, Zhang DD, Shen W, Zhou ML, Zhu L, Hang CH. Expression of the NLRP3 inflammasome in cerebral cortex after traumatic brain injury in a rat model. *Neurochem Res*. 2013;38(10): 2072-2083.

Liu L, Chan C. Activation of NLRP3 inflammasome in primary rat astrocytes by palmitate enhances Alzheimer's disease-like changes in primary neurons. *Alzheimers Dement*. 2012;8(4): 302.

Liu L, Chan C. IPAF inflammasome is involved in interleukin-1 β production from astrocytes, induced by palmitate; implications for Alzheimer's Disease. *Neurobiol Aging*. 2014;35(2): 309-321.

Liu Q, Li B, Zhu HY, Wang YQ, Yu J, Wu GC. Glia atrophy in the hippocampus of chronic unpredictable stress-induced depression model rats is reversed by electroacupuncture treatment. *J Affect Disord*. 2011;128(3): 309-313.

Liu YM, Shen JD, Xu LP, Li HB, Li YC, Yi LT. Ferulic acid inhibits neuro-inflammation in mice exposed to chronic unpredictable mild stress. *Int Immunopharmacol*. 2017;45: 128-134.

Loring RH. Agmatine acts as an antagonist of neuronal nicotinic receptors. *Br J Pharmacol*. 1990;99(1): 207-211.

Lortie MJ, Novotny WF, Peterson OW, Vallon V, Malvey K, Mendonca M, Satriano J, Insel P, Thomson SC, Blantz RC. Agmatine, a bioactive metabolite of arginine. Production, degradation, and functional effects in the kidney of the rat. *J Clin Invest*. 1996;97(2): 413-420.

Lu M, Yang JZ, Geng F, Ding JH, Hu G. Iptakalim confers an antidepressant effect in a chronic mild stress model of depression through regulating neuro-inflammation and neurogenesis. *Int J Neuropsychopharmacol*. 2014;17(9): 1501-1510.

Lüth H-J, Holzer M, Gärtner U, Staufienbiel M, Arendt T. Expression of endothelial and inducible NOS-isoforms is increased in Alzheimer's disease, in APP23 transgenic mice and after experimental brain lesion in rat: evidence for an induction by amyloid pathology. *Brain Res*. 2001;913(1): 57-67.

Madrigal JL, Moro MA, Lizasoain I, Lorenzo P, Castrillo A, Bosca L, Leza JC. Inducible nitric oxide synthase expression in brain cortex after acute restraint stress is regulated by nuclear factor κ B-mediated mechanisms. *J Neurochem*. 2001;76(2): 532-538.

Maes M, Leonard BE, Myint AM, Kubera M, Verkerk R. The new '5-HT' hypothesis of depression: cell-mediated immune activation induces indoleamine 2,3-dioxygenase, which leads to lower plasma tryptophan and an increased synthesis of detrimental tryptophan catabolites (TRYCATs), both of which contribute to the onset of depression. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2011;35(3): 702-721.

Maier SF, Watkins LR. Cytokines for psychologists: implications of bidirectional immune-to-brain communication for understanding behavior, mood, and cognition. *Psychol Rev*. 1998;105(1): 83-107.

Mao Q-Q, Huang Z, Zhong X-M, Xian Y-F, Ip S-P. Piperine reverses chronic unpredictable mild stress-induced behavioral and biochemical alterations in rats. *Cell Mol Neurobiol*. 2014;34(3): 403-408.

Martinon F, Burns K, Tschopp J. The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta. *Mol Cell*. 2002;10(2): 417-426.

Martinon F, Petrilli V, Mayor A, Tardivel A, Tschopp J. Gout-associated uric acid crystals activate the NALP3 inflammasome. *Nature*. 2006;440(7081): 237-241.

Masters SL, Dunne A, Subramanian SL, Hull RL, Tannahill GM, Sharp FA, Becker C, Franchi L, Yoshihara E, Chen Z, Mullooly N, Mielke LA, Harris J, Coll RC, Mills KH, Mok KH, Newsholme P, Nunez G, Yodoi J, Kahn SE, Lavelle EC, O'Neill LA. Activation of the NLRP3 inflammasome by islet amyloid polypeptide provides a mechanism for enhanced IL-1beta in type 2 diabetes. *Nat Immunol*. 2010;11(10): 897-904.

Mathews DC, Henter ID, Zarate CA. Targeting the glutamatergic system to treat major depressive disorder: rationale and progress to date. *Drugs*. 2012;72(10): 1313-1333.

McKinney WT, Jr., Bunney WE, Jr. Animal model of depression. I. review of evidence: implications for research. *Arch Gen Psychiatry*. 1969;21(2): 240-248.

Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CA, Jr. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature*. 1997;388(6640): 394-397.

Mendlewicz J, Kriwin P, Oswald P, Souery D, Alboni S, Brunello N. Shortened onset of action of antidepressants in major depression using acetylsalicylic acid augmentation: a pilot open-label study. *Int Clin Psychopharmacol*. 2006;21(4): 227-231.

Merrill JE, Murphy SP. Inflammatory events at the blood brain barrier: regulation of adhesion molecules, cytokines, and chemokines by reactive nitrogen and oxygen species. *Brain Behav Immun*. 1997;11(4): 245-263.

Meylan EM, Breuillaud L, Seredenina T, Magistretti PJ, Halfon O, Luthi-Carter R, Cardinaux JR. Involvement of the agmatineric system in the depressive-like phenotype of the *Crtc1* knockout mouse model of depression. *Transl Psychiatry*. 2016;6(7): 852.

Millan MJ, Goodwin GM, Meyer-Lindenberg A, Ove Ögren S. Learning from the past and looking to the future: emerging perspectives for improving the treatment of psychiatric disorders. *Eur Neuropsychopharmacol*. 2015;25(5): 599-656.

Miller AH, Maletic V, Raison CL. Inflammation and its discontents: the role of cytokines in the pathophysiology of major depression. *Biol Psychiatry*. 2009;65(9): 732-741.

Miller AH, Raison CL. The role of inflammation in depression: from evolutionary imperative to modern treatment target. *Nat Rev Immunol*. 2016;16(1): 22-34.

Miller AH. Norman Cousins Lecture. Mechanisms of cytokine-induced behavioral changes: psychoneuroimmunology at the translational interface. *Brain Behav Immun*. 2009;23(2): 149-158.

Minkiewicz J, de Rivero Vaccari JP, Keane RW. Human astrocytes express a novel NLRP2 inflammasome. *Glia*. 2013;61(7): 1113-1121.

Molderings GJ, Bonisch H, Gothert M, Bruss M. Agmatine and putrescine uptake in the human glioma cell line SK-MG-1. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 2001;363(6): 671-679.

Molderings GJ, Bruss M, Bonisch H, Gothert M. Identification and pharmacological characterization of a specific agmatine transport system in human tumor cell lines. *Ann N Y Acad Sci.* 2003a;1009: 75-81.

Molderings GJ, Burian M, Homann J, Nilius M, Gothert M. Potential relevance of agmatine as a virulence factor of *Helicobacter pylori*. *Dig Dis Sci.* 1999a;44(12): 2397-2404.

Molderings GJ, Heinen A, Menzel S, Lubbecke F, Homann J, Gothert M. Gastrointestinal uptake of agmatine: distribution in tissues and organs and pathophysiologic relevance. *Ann N Y Acad Sci.* 2003b;1009: 44-51.

Molderings GJ, Heinen A, Menzel S, Gothert M. Exposure of rat isolated stomach and rats in vivo to [(14)C]agmatine: accumulation in the stomach wall and distribution in various tissues. *Fundam Clin Pharmacol.* 2002;16(3): 219-225.

Molderings GJ, Kribben B, Heinen A, Schroder D, Bruss M, Gothert M. Intestinal tumor and agmatine (decarboxylated arginine): low content in colon carcinoma tissue specimens and inhibitory effect on tumor cell proliferation in vitro. *Cancer.* 2004;101(4): 858-868.

Molderings GJ, Menzel S, Gothert M. Imidazoline derivatives and agmatine induce histamine release from the rat stomach. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 1999b;360(6): 711-714.

Molderings GJ, Schmidt K, Bonisch H, Gothert M. Inhibition of 5-HT₃ receptor function by imidazolines in mouse neuroblastoma cells: potential involvement of sigma 2 binding sites. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 1996;354(3): 245-252.

Molderings GJ, Haenisch B. Agmatine (decarboxylated L-arginine): physiological role and therapeutic potential. *Pharmacol Ther.* 2012;133(3): 351-365.

Momeni M, Ghorban K, Dadmanesh M, Khodadadi H, Bidaki R, Kazemi Arababadi M, Kennedy D. ASC provides a potential link between depression and inflammatory disorders: a clinical study of depressed Iranian medical students. *Nord J Psychiatry.* 2016;70(4): 280-284.

Montes JM, Ferrando L, Saiz-Ruiz J. Remission in major depression with two antidepressant mechanisms: results from a naturalistic study. *J Affect Disord.* 2004;79(1-3): 229-234.

Montezuma K, Biojone C, Lisboa SF, Cunha FQ, Guimaraes FS, Joca SR. Inhibition of iNOS induces antidepressant-like effects in mice: pharmacological and genetic evidence. *Neuropharmacol.* 2012;62(1): 485-491.

Moron JA, Zakharova I, Ferrer JV, Merrill GA, Hope B, Lafer EM, Lin ZC, Wang JB, Javitch JA, Galli A, Shippenberg TS. Mitogen-activated protein kinase regulates dopamine transporter surface expression and dopamine transport capacity. *J Neurosci.* 2003;23(24): 8480-8488.

Morrissey JJ, Klahr S. Agmatine activation of nitric oxide synthase in endothelial cells. *Proc Assoc Am Physicians.* 1997;109(1): 51-57.

Muller MB, Zimmermann S, Sillaber I, Hagemeyer TP, Deussing JM, Timpl P, Kormann MS, Droste SK, Kuhn R, Reul JM, Holsboer F, Wurst W. Limbic corticotropin-releasing hormone receptor 1 mediates anxiety-related behavior and hormonal adaptation to stress. *Nat Neurosci.* 2003;6(10): 1100-1107.

Muller N, Schwarz MJ, Dehning S, Douhe A, Cerovecky A, Goldstein-Muller B, Spellmann I, Hetzel G, Maino K, Kleindienst N, Moller HJ, Arolt V, Riedel M. The cyclooxygenase-2 inhibitor celecoxib has therapeutic effects in major depression: results of a double-blind, randomized, placebo controlled, add-on pilot study to reboxetine. *Mol Psychiatry.* 2006;11(7): 680-684.

Muller N, Schwarz MJ. The immune-mediated alteration of serotonin and glutamate: towards an integrated view of depression. *Mol Psychiatry*. 2007;12(11): 988-1000.

Mun CH, Lee WT, Park KA, Lee JE. Regulation of endothelial nitric oxide synthase by agmatine after transient global cerebral ischemia in rat brain. *Anat Cell Biol*. 2010;43(3): 230-240.

Mutlu O, Ulak G, Laugeray A, Belzung C. Effects of neuronal and inducible NOS inhibitor 1-[2-(trifluoromethyl) phenyl] imidazole (TRIM) in unpredictable chronic mild stress procedure in mice. *Pharmacol Biochem Behav*. 2009;92(1): 82-87.

Nakagawa Y, Chiba K. Role of microglial m1/m2 polarization in relapse and remission of psychiatric disorders and diseases. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2014;7(12): 1028-1048.

Naughton M, Clarke G, O'Leary OF, Cryan JF, Dinan TG. A review of ketamine in affective disorders: current evidence of clinical efficacy, limitations of use and pre-clinical evidence on proposed mechanisms of action. *J Affect Disord*. 2014;156: 24-35.

Neis VB, Bettio LE, Moretti M, Rosa PB, Ribeiro CM, Freitas AE, Goncalves FM, Leal RB, Rodrigues AL. Acute agmatine administration, similar to ketamine, reverses depressive-like behavior induced by chronic unpredictable stress in mice. *Pharmacol Biochem Behav*. 2016a;150-151: 108-114.

Neis VB, Manosso LM, Moretti M, Freitas AE, Daufenbach J, Rodrigues AL. Depressive-like behavior induced by tumor necrosis factor-alpha is abolished by agmatine administration. *Behav Brain Res*. 2014;261: 336-344.

Neis VB, Moretti M, Bettio LE, Ribeiro CM, Rosa PB, Goncalves FM, Lopes MW, Leal RB, Rodrigues AL. Agmatine produces antidepressant-like effects by activating AMPA receptors and mTOR signaling. *Eur Neuropsychopharmacol*. 2016b;26(6): 959-971.

Neis VB, Rosa PB, Olescowicz G, Rodrigues ALS. Therapeutic potential of agmatine for CNS disorders. *Neurochem Int.* 2017;108: 318-331.

Neurauter G, Schrocksnadel K, Scholl-Burgi S, Sperner-Unterweger B, Schubert C, Ledochowski M, Fuchs D. Chronic immune stimulation correlates with reduced phenylalanine turnover. *Curr Drug Metab.* 2008;9(7): 622-627.

North RA, Surprenant A. Pharmacology of cloned P2X receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2000;40: 563-580.

O'Connor JC, Lawson MA, Andre C, Moreau M, Lestage J, Castanon N, Kelley KW, Dantzer R. Lipopolysaccharide-induced depressive-like behavior is mediated by indoleamine 2,3-dioxygenase activation in mice. *Mol Psychiatry.* 2009;14(5): 511-522.

Olescowicz G, Neis VB, Fraga DB, Rosa PB, Azevedo DP, Melleu FF, Brocardo PS, Gil-Mohapel J, Rodrigues ALS. Antidepressant and pro-neurogenic effects of agmatine in a mouse model of stress induced by chronic exposure to corticosterone. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2017; doi: 10.1016/j.pnpbp.2017.08.017.

Oliveira RM, Guimaraes FS, Deakin JF. Expression of neuronal nitric oxide synthase in the hippocampal formation in affective disorders. *Braz J Med Biol Res.* 2008;41(4): 333-341.

Olivenza R, Moro MA, Lizasoain I, Lorenzo P, Fernandez AP, Rodrigo J, Bosca L, Leza JC. Chronic stress induces the expression of inducible nitric oxide synthase in rat brain cortex. *J Neurochem.* 2000;74(2): 785-791.

Onal A, Delen Y, Ulker S, Soykan N. Agmatine attenuates neuropathic pain in rats: possible mediation of nitric oxide and noradrenergic activity in the brainstem and cerebellum. *Life Sci.* 2003;73(4): 413-428.

Ormel J, Oldehinkel AJ, Nolen WA, Vollebergh W. Psychosocial disability before, during, and after a major depressive episode: a 3-wave population-based study of state, scar, and trait effects. *Arch Gen Psychiatry*. 2004;61(4): 387-392.

Ossowska G, Danilczuk Z, Klenk-Majewska B, Czajkowski L, Zebrowska-Lupina I. Antidepressants in chronic unpredictable mild stress (CUMS)-induced deficit of fighting behavior. *Pol J Pharmacol*. 2004;56(3): 305-311.

Otake K, Ruggiero DA, Regunathan S, Wang H, Milner TA, Reis DJ. Regional localization of agmatine in the rat brain: an immunocytochemical study. *Brain Res*. 1998;787(1): 1-14.

Otte C, Gold SM, Penninx BW, Pariante CM, Etkin A, Fava M, Mohr DC, Schatzberg AF. Major depressive disorder. *Nat Rev Dis Primers*. 2016;2: 16065.

Pace TW, Miller AH. Cytokines and glucocorticoid receptor signaling: relevance to major depression. *Ann N Y Acad Sci*. 2009;1179: 86-105.

Palazidou E. The neurobiology of depression. *Br Med Bull*. 2012;101: 127-145.

Palsson E, Fejgin K, Wass C, Klamer D. Agmatine attenuates the disruptive effects of phencyclidine on prepulse inhibition. *Eur J Pharmacol*. 2008;590(1-3): 212-216.

Pan Y, Chen XY, Zhang QY, Kong LD. Microglial NLRP3 inflammasome activation mediates IL-1 β -related inflammation in prefrontal cortex of depressive rats. *Brain Behav Immun*. 2014;41: 90-100.

Pariante CM, Miller AH. Glucocorticoid receptors in major depression: relevance to pathophysiology and treatment. *Biol Psychiatry*. 2001;49(5): 391-404.

Pariante CM. Risk factors for development of depression and psychosis. Glucocorticoid receptors and pituitary implications for treatment with antidepressant and glucocorticoids. *Ann N Y Acad Sci*. 2009;1179: 144-152.

Pekny M, Pekna M, Messing A, Steinhauser C, Lee JM, Parpura V, Hol EM, Sofroniew MV, Verkhratsky A. Astrocytes: a central element in neurological diseases. *Acta Neuropathol.* 2016;131(3): 323-345.

Peng YL, Liu YN, Liu L, Wang X, Jiang CL, Wang YX. Inducible nitric oxide synthase is involved in the modulation of depressive behaviors induced by unpredictable chronic mild stress. *J Neuroinflammation.* 2012;9: 75.

Piletz JE, Aricioglu F, Cheng JT, Fairbanks CA, Gilad VH, Haenisch B, Halaris A, Hong S, Lee JE, Li J, Liu P, Molderings GJ, Rodrigues AL, Satriano J, Seong GJ, Wilcox G, Wu N, Gilad GM. Agmatine: clinical applications after 100 years in translation. *Drug Discov Today.* 2013;18(17-18): 880-893.

Piletz JE, Chikkala DN, Ernsberger P. Comparison of the properties of agmatine and endogenous clonidine-displacing substance at imidazoline and alpha-2 adrenergic receptors. *J Pharmacol Exp Ther.* 1995;272(2): 581-587.

Piletz JE, May PJ, Wang G, Zhu H. Agmatine crosses the blood-brain barrier. *Ann N Y Acad Sci.* 2003;1009: 64-74.

Pinthong D, Wright IK, Hanmer C, Millns P, Mason R, Kendall DA, Wilson VG. Agmatine recognizes alpha 2-adrenoceptor binding sites but neither activates nor inhibits alpha 2-adrenoceptors. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 1995;351(1): 10-16.

Pontillo A, Catamo E, Arosio B, Mari D, Crovella S. NALP1/NLRP1 genetic variants are associated with Alzheimer disease. *Alzheimer Dis Assoc Disord.* 2012;26(3): 277-281.

Porsolt RD, Le Pichon M, Jalfre M. Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. *Nature.* 1977;266(5604): 730-732.

Pryce CR, Azzinnari D, Spinelli S, Seifritz E, Tegethoff M, Meinschmidt G. Helplessness: a systematic translational review of theory and evidence for its relevance to understanding and treating depression. *Pharmacol Ther.* 2011;132(3): 242-267.

Pudell C, Vicente BA, Delattre AM, Carabelli B, Mori MA, Suchecki D, Machado RB, Zanata SM, Visentainer JV, de Oliveira Santos Junior O, Lima MM, Ferraz AC. Fish oil improves anxiety-like, depressive-like and cognitive behaviors in olfactory bulbectomised rats. *Eur J Neurosci.* 2014;39(2): 266-274.

Quan N, Banks WA. Brain-immune communication pathways. *Brain Behav Immun.* 2007;21(6): 727-735.

Raasch W, Regunathan S, Li G, Reis DJ. Agmatine, the bacterial amine, is widely distributed in mammalian tissues. *Life Sci.* 1995;56(26): 2319-2330.

Raasch W, Schafer U, Chun J, Dominiak P. Biological significance of agmatine, an endogenous ligand at imidazoline binding sites. *Br J Pharmacol.* 2001;133(6): 755-780.

Raasch W, Schafer U, Qadri F, Dominiak P. Agmatine, an endogenous ligand at imidazoline binding sites, does not antagonize the clonidine-mediated blood pressure reaction. *Br J Pharmacol.* 2002;135(3): 663-672.

Raison CL, Borisov AS, Majer M, Drake DF, Pagnoni G, Woolwine BJ, Vogt GJ, Massung B, Miller AH. Activation of central nervous system inflammatory pathways by interferon-alpha: relationship to monoamines and depression. *Biol Psychiatry.* 2009;65(4): 296-303.

Raison CL, Capuron L, Miller AH. Cytokines sing the blues: inflammation and the pathogenesis of depression. *Trends Immunol.* 2006;27(1): 24-31.

Rajkowska G, Miguel-Hidalgo JJ. Gliogenesis and glial pathology in depression. *CNS Neurol Disord Drug Targets.* 2007;6(3): 219-233.

Rajkowska G, Stockmeier CA. Astrocyte pathology in major depressive disorder: insights from human postmortem brain tissue. *Curr Drug Targets.* 2013;14(11): 1225-1236.

Ramani D, De Bandt JP, Cynober L. Aliphatic polyamines in physiology and diseases. Clin Nutr. 2014;33(1): 14-22.

Rathinam VA, Jiang Z, Waggoner SN, Sharma S, Cole LE, Waggoner L, Vanaja SK, Monks BG, Ganesan S, Latz E, Hornung V, Vogel SN, Szomolanyi-Tsuda E, Fitzgerald KA. The AIM2 inflammasome is essential for host defense against cytosolic bacteria and DNA viruses. Nat Immunol. 2010;11(5): 395-402.

Ratsimandresy RA, Dorfleutner A, Stehlik C. An update on pyrin domain-containing pattern recognition receptors: from immunity to pathology. Front Immunol. 2013;4: 440.

Regunathan S, Feinstein DL, Raasch W, Reis DJ. Agmatine (decarboxylated arginine) is synthesized and stored in astrocytes. Neuroreport. 1995;6(14): 1897-900.

Regunathan S, Youngson C, Raasch W, Wang H, Reis DJ. Imidazoline receptors and agmatine in blood vessels: a novel system inhibiting vascular smooth muscle proliferation. J Pharmacol Exp Ther. 1996;276(3): 1272-1282.

Regunathan S, Piletz JE. Regulation of inducible nitric oxide synthase and agmatine synthesis in macrophages and astrocytes. Ann N Y Acad Sci. 2003;1009: 20-29.

Regunathan S, Reis DJ. Imidazoline receptors and their endogenous ligands. Annu Rev Pharmacol Toxicol. 1996;36: 511-544.

Regunathan S. Agmatine: biological role and therapeutic potentials in morphine analgesia and dependence. AAPS J. 2006;8(3): 479-484.

Reis DJ, Yang XC, Milner TA. Agmatine containing axon terminals in rat hippocampus form synapses on pyramidal cells. Neurosci Lett. 1998;250(3): 185-188.

Reis DJ, Regunathan S. Agmatine: a novel neurotransmitter? Adv Pharmacol. 1998;42: 645-649.

Reis DJ, Regunathan S. Agmatine: an endogenous ligand at imidazoline receptors is a novel neurotransmitter. Ann N Y Acad Sci. 1999;881: 65-80.

Reis DJ, Regunathan S. Is agmatine a novel neurotransmitter in brain? *Trends Pharmacol Sci.* 2000;21(5): 187-193.

Reus GZ, Fries GR, Stertz L, Badawy M, Passos IC, Barichello T, Kapczinski F, Quevedo J. The role of inflammation and microglial activation in the pathophysiology of psychiatric disorders. *Neurosci.* 2015;300: 141-154.

Reus GZ, Stringari RB, Ribeiro KF, Cipriano AL, Panizzutti BS, Stertz L, Lersch C, Kapczinski F, Quevedo J. Maternal deprivation induces depressive-like behaviour and alters neurotrophin levels in the rat brain. *Neurochem Res.* 2011;36(3): 460-466.

Rinwa P, Kumar A. *Panax quinquefolium* involves nitric oxide pathway in olfactory bulbectomy rat model. *Physiol Behav.* 2014;129(0): 142-151.

Ruedi-Bettschen D, Zhang W, Russig H, Ferger B, Weston A, Pedersen EM, Feldon J, Pryce CR. Early deprivation leads to altered behavioural, autonomic and endocrine responses to environmental challenge in adult Fischer rats. *Eur J Neurosci.* 2006;24(10): 2879-2893.

Rushaidhi M, Collie ND, Zhang H, Liu P. Agmatine selectively improves behavioural function in aged male Sprague-Dawley rats. *Neurosci.* 2012;218: 206-215.

Rygula R, Abumaria N, Flugge G, Fuchs E, Ruther E, Havemann-Reinecke U. Anhedonia and motivational deficits in rats: impact of chronic social stress. *Behav Brain Res.* 2005;162(1): 127-134.

Sahin C, Albayrak O, Akdeniz TF, Akbulut Z, Yanikkaya Demirel G, Aricioglu F. Agmatine reverses sub-chronic stress-induced nod-like receptor protein 3 (NLRP3) activation and cytokine response in rats. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 2016a;119(4): 367-375.

Sahin C, Dursun S, Cetin M, Aricioglu F. The neuroinflammation perspective of depression: reuniting the outstanding mechanisms of the pathophysiology. *Bull Clin Psychopharmacol.* 2016b;26(2): 196-206.

Sahin C, Aricioglu F. Future directions of cytokine hypothesis in depression: ‘NLRP3 inflammasome’. *Bull Clin Psychopharmacol*. 2013;23(3): 280-288.

Sanchez MM, Alagbe O, Felger JC, Zhang J, Graff AE, Grand AP, Maestripieri D, Miller AH. Activated p38 MAPK is associated with decreased CSF 5-HIAA and increased maternal rejection during infancy in rhesus monkeys. *Mol Psychiatry*. 2007;12(10): 895-897.

Santos AR, Gadotti VM, Oliveira GL, Tibola D, Paszcuk AF, Neto A, Spindola HM, Souza MM, Rodrigues AL, Calixto JB. Mechanisms involved in the antinociception caused by agmatine in mice. *Neuropharmacol*. 2005;48(7): 1021-1034.

Sastre M, Regunathan S, Galea E, Reis DJ. Agmatinase activity in rat brain: a metabolic pathway for the degradation of agmatine. *J Neurochem*. 1996;67(4): 1761-1765.

Sastre M, Regunathan S, Reis DJ. Uptake of agmatine into rat brain synaptosomes: possible role of cation channels. *J Neurochem*. 1997;69(6): 2421-2426.

Satriano J, Schwartz D, Ishizuka S, Lortie MJ, Thomson SC, Gabbai F, Kelly CJ, Blantz RC. Suppression of inducible nitric oxide generation by agmatine aldehyde: beneficial effects in sepsis. *J Cell Physiol*. 2001;188(3): 313-320.

Satriano J. Agmatine: at the crossroads of the arginine pathways. *Ann N Y Acad Sci*. 2003;1009: 34-43.

Satriano J. Arginine pathways and the inflammatory response: interregulation of nitric oxide and polyamines: review article. *Amino Acids*. 2004;26(4): 321-329.

Schiepers OJ, Wichers MC, Maes M. Cytokines and major depression. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2005;29(2): 201-217.

Schildkraut JJ. The catecholamine hypothesis of affective disorders: a review of supporting evidence. *Am J Psychiatry*. 1965;122(5): 509-522.

Schroder K, Tschopp J. The inflammasomes. *Cell*. 2010;140(6): 821-832.

Schwarcz R, Pellicciari R. Manipulation of brain kynurenines: glial targets, neuronal effects, and clinical opportunities. *J Pharmacol Exp Ther*. 2002;303(1): 1-10.

Schwartz D, Peterson OW, Mendonca M, Satriano J, Lortie M, Blantz RC. Agmatine affects glomerular filtration via a nitric oxide synthase-dependent mechanism. *Am J Physiol*. 1997;272(5 Pt 2): 597-601.

Seedat S, Scott KM, Angermeyer MC, Berglund P, Bromet EJ, Brugh TS, Demyttenaere K, de Girolamo G, Haro JM, Jin R, Karam EG, Kovess-Masfety V, Levinson D, Medina Mora ME, Ono Y, Ormel J, Pennell BE, Posada-Villa J, Sampson NA, Williams D, Kessler RC. Cross-national associations between gender and mental disorders in the World Health Organization World Mental Health Surveys. *Arch Gen Psychiatry*. 2009;66(7): 785-795.

Seligman ME, Maier SF, Geer JH. Alleviation of learned helplessness in the dog. *J Abnorm Psychol*. 1968;73(3): 256-262.

Sener A, Lebrun P, Blachier F, Malaisse WJ. Stimulus-secretion coupling of arginine-induced insulin release. Insulinotropic action of agmatine. *Biochem Pharmacol*. 1989;38(2): 327-330.

Seo S, Liu P, Leitch B. Spatial learning-induced accumulation of agmatine and glutamate at hippocampal CA1 synaptic terminals. *Neurosci*. 2011;192: 28-36.

Shi F, Yang Y, Kouadir M, Fu Y, Yang L, Zhou X, Yin X, Zhao D. Inhibition of phagocytosis and lysosomal acidification suppresses neurotoxic prion peptide-induced NALP3 inflammasome activation in BV2 microglia. *J Neuroimmunol*. 2013;260(1-2): 121-125.

Shopsin B. The clinical antidepressant effect of exogenous agmatine is not reversed by parachlorophenylalanine: a pilot study. *Acta Neuropsychiatr*. 2013;25(2): 113-118.

Silverman WR, de Rivero Vaccari JP, Locovei S, Qiu F, Carlsson SK, Scemes E, Keane RW, Dahl G. The pannexin 1 channel activates the inflammasome in neurons and astrocytes. *J Biol Chem*. 2009;284(27): 18143-18151.

Skolnick P. Beyond monoamine-based therapies: clues to new approaches. *J Clin Psychiatry*. 2002;63(Suppl 2): 19-23.

Slusarczyk J, Trojan E, Wydra K, Glombik K, Chamera K, Kucharczyk M, Budziszewska B, Kubera M, Lason W, Filip M, Basta-Kaim A. Beneficial impact of intracerebroventricular fractalkine administration on behavioral and biochemical changes induced by prenatal stress in adult rats: Possible role of NLRP3 inflammasome pathway. *Biochem Pharmacol*. 2016;113: 45-56.

Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem*. 1985;150(1): 76-85.

Smith RS. The macrophage theory of depression. *Med Hypotheses*. 1991;35(4): 298-306.

Song C, Leonard BE. The olfactory bulbectomised rat as a model of depression. *Neurosci Biobehav Rev*. 2005;29(4–5): 627-647.

Spijker J, de Graaf R, Bijl RV, Beekman AT, Ormel J, Nolen WA. Duration of major depressive episodes in the general population: results from The Netherlands Mental Health Survey and Incidence Study (NEMESIS). *Br J Psychiatry*. 2002;181: 208-213.

Stetler C, Miller GE. Depression and hypothalamic-pituitary-adrenal activation: a quantitative summary of four decades of research. *Psychosom Med*. 2011;73(2): 114-26.

Stone TW. Kynurenines in the CNS: from endogenous obscurity to therapeutic importance. *Prog Neurobiol*. 2001;64(2): 185-218.

Strawbridge R, Arnone D, Danese A, Papadopoulos A, Herane Vives A, Cleare AJ. Inflammation and clinical response to treatment in depression: a meta-analysis. *Eur Neuropsychopharmacol*. 2015;25(10): 1532-1543.

Su RB, Wei XL, Zheng JQ, Liu Y, Lu XQ, Li J. Anticonvulsive effect of agmatine in mice. *Pharmacol Biochem Behav*. 2004;77(2): 345-349.

Su WJ, Zhang Y, Chen Y, Gong H, Lian YJ, Peng W, Liu YZ, Wang YX, You ZL, Feng SJ, Zong Y, Lu GC, Jiang CL. NLRP3 gene knockout blocks NF-kappaB and MAPK signaling pathway in CUMS-induced depression mouse model. *Behav Brain Res*. 2017;322(Pt A): 1-8.

Sun MK, Regunathan S, Reis DJ. Cardiovascular responses to agmatine, a clonidine-displacing substance, in anesthetized rat. *Clin Exp Hypertens*. 1995;17(1-2): 115-128.

Szabo A, Bene K, Gogolak P, Rethi B, Lanyi A, Jankovich I, Dezso B, Rajnavolgyi E. RLR-mediated production of interferon-beta by a human dendritic cell subset and its role in virus-specific immunity. *J Leukoc Biol*. 2012;92(1): 159-169.

Tabor CW, Tabor H. Polyamines. *Annu Rev Biochem*. 1984;53: 749-790.

Taguchi T, Mitcham JL, Dower SK, Sims JE, Testa JR. Chromosomal localization of TIL, a gene encoding a protein related to the *Drosophila* transmembrane receptor Toll, to human chromosome 4p14. *Genomics*. 1996;32(3): 486-488.

Taksande BG, Chopde CT, Umekar MJ, Kotagale NR. Agmatine attenuates lipopolysaccharide induced anorexia and sickness behavior in rats. *Pharmacol Biochem Behav*. 2015;132: 108-114.

Taksande BG, Faldu DS, Dixit MP, Sakaria JN, Aglawe MM, Umekar MJ, Kotagale NR. Agmatine attenuates chronic unpredictable mild stress induced behavioral alteration in mice. *Eur J Pharmacol*. 2013;720(1-3): 115-120.

Taksande BG, Kotagale NR, Tripathi SJ, Ugale RR, Chopde CT. Antidepressant like effect of selective serotonin reuptake inhibitors involve modulation of imidazoline receptors by agmatine. *Neuropharmacol.* 2009;57(4): 415-424.

Tan MS, Tan L, Jiang T, Zhu XC, Wang HF, Jia CD, Yu JT. Amyloid-beta induces NLRP1-dependent neuronal pyroptosis in models of Alzheimer's disease. *Cell Death Dis.* 2014;5: 1382.

Ting JP, Lovering RC, Alnemri ES, Bertin J, Boss JM, Davis BK, Flavell RA, Girardin SE, Godzik A, Harton JA, Hoffman HM, Hugot JP, Inohara N, Mackenzie A, Maltais LJ, Nunez G, Ogura Y, Otten LA, Philpott D, Reed JC, Reith W, Schreiber S, Steimle V, Ward PA. The NLR gene family: a standard nomenclature. *Immunity.* 2008;28(3): 285-287.

Tomaz VS, Cordeiro RC, Costa AM, de Lucena DF, Nobre Junior HV, de Sousa FC, Vasconcelos SM, Vale ML, Quevedo J, Macedo D. Antidepressant-like effect of nitric oxide synthase inhibitors and sildenafil against lipopolysaccharide-induced depressive-like behavior in mice. *Neurosci.* 2014;268: 236-246.

Tyring S, Gottlieb A, Papp K, Gordon K, Leonardi C, Wang A, Lalla D, Woolley M, Jahreis A, Zitnik R, Cella D, Krishnan R. Etanercept and clinical outcomes, fatigue, and depression in psoriasis: double-blind placebo-controlled randomised phase III trial. *Lancet.* 2006;367(9504): 29-35.

Utkan T, Gocmez SS, Regunathan S, Aricioglu F. Agmatine, a metabolite of L-arginine, reverses scopolamine-induced learning and memory impairment in rats. *Pharmacol Biochem Behav.* 2012;102(4): 578-584.

Utkan T, Ulak G, Yildiran HG, Yardimoglu M, Gacar MN. Investigation on the mechanism involved in the effects of agmatine on ethanol-induced gastric mucosal injury in rats. *Life Sci.* 2000;66(18): 1705-1711.

Uzbay TI. The pharmacological importance of agmatine in the brain. *Neurosci Biobehav Rev.* 2012;36(1): 502-519.

Valkanova V, Ebmeier KP, Allan CL. CRP, IL-6 and depression: a systematic review and meta-analysis of longitudinal studies. *J Affect Disord.* 2013;150(3): 736-744.

Vehmas AK, Kawas CH, Stewart WF, Troncoso JC. Immune reactive cells in senile plaques and cognitive decline in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging.* 2003;24(2): 321-331.

Vos T, Haby MM, Barendregt JJ, Kruijshaar M, Corry J, Andrews G. The burden of major depression avoidable by longer-term treatment strategies. *Arch Gen Psychiatry.* 2004;61(11): 1097-1103.

Wang D, An SC, Zhang X. Prevention of chronic stress-induced depression-like behavior by inducible nitric oxide inhibitor. *Neurosci Lett.* 2008;433(1): 59-64.

Wang JF, Su RB, Wu N, Xu B, Lu XQ, Liu Y, Li J. Inhibitory effect of agmatine on proliferation of tumor cells by modulation of polyamine metabolism. *Acta Pharmacol Sin.* 2005;26(5): 616-622.

Wang WP, Iyo AH, Miguel-Hidalgo J, Regunathan S, Zhu MY. Agmatine protects against cell damage induced by NMDA and glutamate in cultured hippocampal neurons. *Brain Res.* 2006;1084(1): 210-216.

Wang Y, Xu Y, Sheng H, Ni X, Lu J. Exercise amelioration of depression-like behavior in OVX mice is associated with suppression of NLRP3 inflammasome activation in hippocampus. *Behav Brain Res.* 2016;307: 18-24.

Watkins LR, Maier SF, Goehler LE. Cytokine-to-brain communication: a review and analysis of alternative mechanisms. *Life Sci.* 1995;57(11): 1011-1026.

Wegener G, Volke V. Nitric oxide synthase inhibitors as antidepressants. *Pharmaceuticals (Basel).* 2010;3(1): 273-299.

Weitzel G, Pfeiffer B, Stock W. Insulin-like partial effects of agmatine derivatives in adipocytes. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem.* 1980;361(1): 51-60.

Wells KB, Burnam MA, Rogers W, Hays R, Camp P. The course of depression in adult outpatients. Results from the medical outcomes study. *Arch Gen Psychiatry*. 1992;49(10): 788-794.

Wen H, Gris D, Lei Y, Jha S, Zhang L, Huang MT, Brickey WJ, Ting JP. Fatty acid-induced NLRP3-ASC inflammasome activation interferes with insulin signaling. *Nat Immunol*. 2011;12(5): 408-415.

Wiborg O. Chronic mild stress for modeling anhedonia. *Cell Tissue Res*. 2013;354(1): 155-169.

Willner P, Moreau JL, Nielsen CK, Papp M, Sluzewska A. Decreased hedonic responsiveness following chronic mild stress is not secondary to loss of body weight. *Physiol Behav*. 1996;60(1): 129-134.

Willner P, Muscat R, Papp M. Chronic mild stress-induced anhedonia: a realistic animal model of depression. *Neurosci Biobehav Rev*. 1992;16(4): 525-534.

Willner P, Towell A, Sampson D, Sophokleous S, Muscat R. Reduction of sucrose preference by chronic unpredictable mild stress, and its restoration by a tricyclic antidepressant. *Psychopharmacol (Berl)*. 1987;93(3): 358-364.

Willner P. Chronic mild stress (CMS) revisited: Consistency and behavioural-neurobiological concordance in the effects of CMS. *Neuropsychobiol*. 2005;52(2): 90-110.

Willner P. The validity of animal models of depression. *Psychopharmacol*. 1984;83: 1-16.

Willner P. Validity, reliability and utility of the chronic mild stress model of depression: a 10-year review and evaluation. *Psychopharmacol (Berl)*. 1997;134(4): 319-329.

Wolf C, Bruss M, Hanisch B, Gothert M, von Kugelgen I, Molderings GJ. Molecular basis for the antiproliferative effect of agmatine in tumor cells of colonic, hepatic, and neuronal origin. *Mol Pharmacol*. 2007;71(1): 276-283.

Wu CW, Chen YC, Yu L, Chen HI, Jen CJ, Huang AM, Tsai HJ, Chang YT, Kuo YM. Treadmill exercise counteracts the suppressive effects of peripheral lipopolysaccharide on hippocampal neurogenesis and learning and memory. *J Neurochem*. 2007;103(6): 2471-2481.

Wu HQ, Rassoulpour A, Schwarcz R. Kynurenic acid leads, dopamine follows: a new case of volume transmission in the brain? *J Neural Transm (Vienna)*. 2007;114(1): 33-41.

Xu F, Gainetdinov RR, Wetsel WC, Jones SR, Bohn LM, Miller GW, Wang YM, Caron MG. Mice lacking the norepinephrine transporter are supersensitive to psychostimulants. *Nat Neurosci*. 2000;3(5): 465-471.

Xu Y, Sheng H, Bao Q, Wang Y, Lu J, Ni X. NLRP3 inflammasome activation mediates estrogen deficiency-induced depression- and anxiety-like behavior and hippocampal inflammation in mice. *Brain Behav Immun*. 2016;56: 175-186.

Xue J, Li H, Deng X, Ma Z, Fu Q, Ma S. L-Menthone confers antidepressant-like effects in an unpredictable chronic mild stress mouse model via NLRP3 inflammasome-mediated inflammatory cytokines and central neurotransmitters. *Pharmacol Biochem Behav*. 2015;134: 42-48.

Yan HC, Cao X, Das M, Zhu XH, Gao TM. Behavioral animal models of depression. *Neurosci Bull*. 2010;26(4): 327-337.

Yang CR, Zhang ZG, Bai YY, Zhou HF, Zhou L, Ruan CS, Li F, Li CQ, Zheng HY, Shen LJ, Zhou XF. Foraging activity is reduced in a mouse model of depression. *Neurotox Res*. 2014;25(3): 235-247.

Yang MZ, Mun CH, Choi YJ, Baik JH, Park KA, Lee WT, Lee JE. Agmatine inhibits matrix metalloproteinase-9 via endothelial nitric oxide synthase in cerebral endothelial cells. *Neurol Res.* 2007;29(7): 749-754.

Yang XC, Reis DJ. Agmatine selectively blocks the N-methyl-D-aspartate subclass of glutamate receptor channels in rat hippocampal neurons. *J Pharmacol Exp Ther.* 1999;288(2): 544-549.

Yazdi AS, Guarda G, Riteau N, Drexler SK, Tardivel A, Couillin I, Tschopp J. Nanoparticles activate the NLR pyrin domain containing 3 (Nlrp3) inflammasome and cause pulmonary inflammation through release of IL-1alpha and IL-1beta. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107(45): 19449-19454.

Yazir Y, Utkan T, Aricioglu F. Inhibition of neuronal nitric oxide synthase and soluble guanylate cyclase prevents depression-like behaviour in rats exposed to chronic unpredictable mild stress. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 2012;111(3): 154-160.

Ye Y, Wang G, Wang H, Wang X. Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) infusion restored astrocytic plasticity in the hippocampus of a rat model of depression. *Neurosci Lett.* 2011;503(1): 15-19.

Yildiz F, Erden BF, Ulak G, Utkan T, Gacar N. Antidepressant-like effect of 7-nitroindazole in the forced swimming test in rats. *Psychopharmacol (Berl).* 2000;149(1): 41-44.

Yirmiya R, Pollak Y, Barak O, Avitsur R, Ovadia H, Bette M, Weihe E, Weidenfeld J. Effects of antidepressant drugs on the behavioral and physiological responses to lipopolysaccharide (LPS) in rodents. *Neuropsychopharmacol.* 2001;24(5): 531-544.

Yoshino Y, Ochi S, Yamazaki K, Nakata S, Iga JI, Ueno SI. Endothelial nitric oxide synthase in rat brain is downregulated by sub-chronic antidepressant treatment. *Psychopharmacol (Berl).* 2017;234(11): 1663-1669.

Yu JR, Leslie KS. Cryopyrin-associated periodic syndrome: an update on diagnosis and treatment response. *Curr Allergy Asthma Rep.* 2011;11(1): 12-20.

Yue N, Huang H, Zhu X, Han Q, Wang Y, Li B, Liu Q, Wu G, Zhang Y, Yu J. Activation of P2X7 receptor and NLRP3 inflammasome assembly in hippocampal glial cells mediates chronic stress-induced depressive-like behaviors. *J Neuroinflammation*. 2017;14(1): 102.

Zarate CA, Jr., Singh JB, Carlson PJ, Brutsche NE, Ameli R, Luckenbaugh DA, Charney DS, Manji HK. A randomized trial of an N-methyl-D-aspartate antagonist in treatment-resistant major depression. *Arch Gen Psychiatry*. 2006;63(8): 856-864.

Zeidan MP, Zomkowski AD, Rosa AO, Rodrigues AL, Gabilan NH. Evidence for imidazoline receptors involvement in the agmatine antidepressant-like effect in the forced swimming test. *Eur J Pharmacol*. 2007;565(1-3): 125-131.

Zhang B, Zhang Y, Wu W, Xu T, Yin Y, Zhang J, Huang D, Li W. Chronic glucocorticoid exposure activates BK-NLRP1 signal involving in hippocampal neuron damage. *J Neuroinflammation*. 2017;14(1): 139.

Zhang Y, Hu W, Zhang B, Yin Y, Zhang J, Huang D, Huang R, Li W, Li W. Ginsenoside Rg1 protects against neuronal degeneration induced by chronic dexamethasone treatment by inhibiting NLRP-1 inflammasomes in mice. *Int J Mol Med*. 2017;40(4): 1134-1142.

Zhang Y, Liu L, Liu YZ, Shen XL, Wu TY, Zhang T, Wang W, Wang YX, Jiang CL. NLRP3 inflammasome mediates chronic mild stress-induced depression in mice via neuroinflammation. *Int J Neuropsychopharmacol*. 2015;18: 8.

Zhang Y, Liu L, Peng YL, Liu YZ, Wu TY, Shen XL, Zhou JR, Sun DY, Huang AJ, Wang X, Wang YX, Jiang CL. Involvement of inflammasome activation in lipopolysaccharide-induced mice depressive-like behaviors. *CNS Neurosci Ther*. 2014;20(2): 119-124.

Zhang ZT, Du XM, Ma XJ, Zong Y, Chen JK, Yu CL, Liu YG, Chen YC, Zhao LJ, Lu GC. Activation of the NLRP3 inflammasome in lipopolysaccharide-induced

mouse fatigue and its relevance to chronic fatigue syndrome. *J Neuroinflammation*. 2016;13(1): 71.

Zhao J, Jung YH, Jang CG, Chun KH, Kwon SW, Lee J. Metabolomic identification of biochemical changes induced by fluoxetine and imipramine in a chronic mild stress mouse model of depression. *Sci Rep*. 2015;5: 8890.

Zhou QG, Hu Y, Hua Y, Hu M, Luo CX, Han X, Zhu XJ, Wang B, Xu JS, Zhu DY. Neuronal nitric oxide synthase contributes to chronic stress-induced depression by suppressing hippocampal neurogenesis. *J Neurochem*. 2007;103(5): 1843-1854.

Zhou R, Tardivel A, Thorens B, Choi I, Tschopp J. Thioredoxin-interacting protein links oxidative stress to inflammasome activation. *Nat Immunol*. 2010;11(2): 136-140.

Zhu CB, Blakely RD, Hewlett WA. The proinflammatory cytokines interleukin-1 β and tumor necrosis factor- α activate serotonin transporters. *Neuropsychopharmacol*. 2006;31(10): 2121-2131.

Zhu CB, Lindler KM, Owens AW, Daws LC, Blakely RD, Hewlett WA. Interleukin-1 receptor activation by systemic lipopolysaccharide induces behavioral despair linked to MAPK regulation of CNS serotonin transporters. *Neuropsychopharmacol*. 2010;35(13): 2510-2520.

Zhu MY, Wang WP, Cai ZW, Regunathan S, Ordway G. Exogenous agmatine has neuroprotective effects against restraint-induced structural changes in the rat brain. *Eur J Neurosci*. 2008;27(6): 1320-1332.

Zhu W, Cao FS, Feng J, Chen HW, Wan JR, Lu Q, Wang J. NLRP3 inflammasome activation contributes to long-term behavioral alterations in mice injected with lipopolysaccharide. *Neurosci*. 2017;343: 77-84.

Zlatkovic J, Filipovic D. Chronic social isolation induces NF- κ B activation and upregulation of iNOS protein expression in rat prefrontal cortex. *Neurochem Int*. 2013;63(3): 172-179.

Zomkowski AD, Hammes L, Lin J, Calixto JB, Santos AR, Rodrigues AL. Agmatine produces antidepressant-like effects in two models of depression in mice. *Neuroreport*. 2002;13(4): 387-391.

Zomkowski AD, Santos AR, Rodrigues AL. Evidence for the involvement of the opioid system in the agmatine antidepressant-like effect in the forced swimming test. *Neurosci Lett*. 2005;381(3): 279-283.

Zunszain PA, Anacker C, Cattaneo A, Carvalho LA, Pariante CM. Glucocorticoids, cytokines and brain abnormalities in depression. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2011;35(3): 722-729.

Zunszain PA, Hepgul N, Pariante CM. Inflammation and depression. *Curr Top Behav Neurosci*. 2013;14: 135-151.

9. ÖZGEÇMİŞ

Adı	Ceren	Soyadı	ÖZKARTAL
Doğum Yeri	Adapazarı	Doğum Tarihi	18.07.1988
Uyruğu	T.C.	Tel	05074297060
E-mail	ceren.sahin@marmara.edu.tr		

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Doktora/Uzmanlık	Marmara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Farmakoloji (ECZ) Doktora Programı	-
Yüksek Lisans	-	-
2. Lisans	Anadolu Üniversitesi İşletme Fakültesi (Açık öğretim)	2012
Lisans	Anadolu Üniversitesi Eczacılık Fakültesi	2011
Lise	Sakarya Anadolu Lisesi	2007

İş Deneyimi

Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
Araştırma Görevlisi	Marmara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalı	2012-
Ziyaretçi Araştırmacı	Manchester Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Psikofarmakoloji Departmanı (İngiltere)	2014 (3 ay)

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*
İngilizce	Çok iyi	İyi	Çok iyi

Yabancı Dil Sınav Notu #								
YDS	ÜDS	IELTS	TOEFL IBT	TOEFL PBT	TOEFL CBT	FCE	CAE	CPE
	86.250		94					

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
ALES Puanı	95.359	94.488	73.075

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
Office programları, Endnote, Graphpad Prism	İyi

Ek-1 Bilimsel Faaliyetler

1. YAYINLAR

SCI ve SCI-E Kapsamındaki Dergilerde Yayınlanmış Makaleler/Derlemeler

1. Erdag E, **Sahin C**, Kucukali CI, Bireller S, Kucukerden M, Kurtuncu M, Turkoglu R, Cakmakoglu B, Tuzun E, Aricioglu F. Effects of in vivo and in vitro administration of neuro-Behcet's disease IgG. *Neurol Sci.* **2017**; 38(5):833-843.
2. **Sahin C**, Doostdar N, Neill JC. Towards the development of improved tests for negative symptoms of schizophrenia in a validated animal model. *Behav Brain Res.* **2016**; 312:93-101.
3. **Sahin C**, Albayrak O, Akdeniz TF, Akbulut Z, Yanikkaya Demirel G, Aricioglu F. Agmatine reverses sub-chronic stress-induced Nod-like Receptor Protein 3 (NLRP3) activation and cytokine response in rat. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* **2016** 119(4):367-375.
4. **Sahin C**, Dursun S, Cetin M, Aricioglu F. The neuroinflammation perspective of depression: reuniting the outstanding mechanisms of the pathophysiology. *Bull Clin Psychopharmacol.* **2016**; 26(2): 196-206.
5. Aricioglu F, **Sahin Ozkartal C**, Unal G, Dursun S, Cetin M, Muller N. Neuroinflammation in schizophrenia: A critical review and the future. *Bull Clin Psychopharmacol.* **2016**; 26(4): 429-437.
6. **Sahin C**, Unal G, Aricioglu F. Regulation of GSK-3 activity as a shared mechanism in Psychiatric disorders. *Bull Clin Psychopharmacol.* **2014**; 24(1):95-106.
7. **Sahin C**, Aricioglu F. Future directions of cytokine hypothesis in depression: 'NLRP3 infammasome'. *Bull Clin Psychopharmacol.* **2013**; 23(3): 280-288.

SCI Dışındaki Uluslararası Hakemli Dergilerde Yayınlanmış Derlemeler

1. Erkmen T, **Sahin C**, Aricioglu F. Şizofrenide inflamatuvar mekanizmaların yeri. *MÜSBED* **2015**; 5(2):134-139.

2. **Sahin C**, Unal G, Aricioglu F. Akt-GSK-3 İlişkisi: İki Ayrı Yolak İki Ayrı Hastalık. MÜSBED **2014**; 4(1): 51-57
3. **Sahin C**, Aricioglu F. Depresyon ve Sitokin Hipotezinde Yeni Bir Boyut: ‘NLRP3 İnflamazomu’. MUSBED **2013**; 3(2): 65-68.
4. Gumru S, **Sahin C**, Aricioglu F. Yeni Bir Nörotransmitter/Nöromodülatör Olarak Agmatine Genel Bir Bakış. MÜSBED **2013**; 3(Suppl. 1): 23-28.
5. Gumru S, **Sahin C**, Aricioglu F. Role of Agmatine in Cognitive Functions. OA Behavioural Medicine. **2013**;1(1):2.

2. BİLDİRİLER

Uluslararası Kongre (sempozyum, panel vb.) Tam Metin Bildiri:

1. **Sahin Ozkartal C**, Aricioglu F, Tuzun E, Keles R, Kandemir C, Sirvanci S, Küçükali Cİ. Agmatine produces antidepressant effect via modulation of neuroinflammation in chronic unpredictable mild stress model of rats: Implication in inflammatory perspective of depression. Psychiatry and Clinical Psychopharmacology 2017; 27(suppl 1): p60. 9th International Congress on Psychopharmacology and 5th International Symposium on Child and Adolescent Psychopharmacology 26-30 Nisan **2017**, Antalya/Türkiye (*Tez Kaynaklı Bildiri*).

Uluslararası Kongre (sempozyum, panel vb.) Sözlü Özet Bildiri:

1. **Sahin C**, Podda G, Grayson B, Marsh S, Aricioglu F, Neill JC. Sub-chronic PCP treated rats demonstrate pessimism in a task of optimistic cognitive bias: A novel approach for investigating the disruption of anticipatory motivation in schizophrenia. J Psychopharmacol. 2015; Suppl 29 (8): 71. 26-29 Temmuz, BAP Summer Meeting **2015**, Bristol/İngiltere.

Uluslararası Kongre (sempozyum, panel vb.) Poster Özet Bildiri:

1. **Sahin Ozkartal C**, Aricioglu F, Tuzun E, Keles R, Kucukali CI. Possible involvement of the mammalian target of rapamycin (mTOR) signaling pathway in the antidepressant-like effect of agmatine as a novel endogenous

neuromodulator. J Psychopharmacol. 2017; 31(Suppl 8): A61. British Association of Psychopharmacology (BAP) Summer Meeting **2017** 23-26 Temmuz, Harrogate/İngiltere.

2. **Sahin Ozkartal C**, Aricioglu F, Tuzun E, Keles R, Kandemir C, Sirvanci S, Küçükali Cİ. Agmatine produces antidepressant effect via modulation of neuroinflammation in chronic unpredictable mild stress model of rats: Implication in inflammatory perspective of depression. Psychiatry and Clinical Psychopharmacology 2017; 27(suppl 1): p60. 9th International Congress on Psychopharmacology and 5th International Symposium on Child and Adolescent Psychopharmacology 26-30 Nisan **2017**, Antalya/Türkiye.
3. **Sahin Ozkartal C**, Aricioglu F, Tuzun E, Kucukali CI, Kandemir C, Sirvanci S, Keles R. The effect of antidepressant-acting NOS inhibitors on Nod-like receptor protein 1 (NLRP1) inflammasome-mediated sterile neuroinflammation in a rat model of depression. 13th World Congress on Inflammation (WCI), 8-12 Temmuz **2017**, Londra/İngiltere.
4. Aricioglu F, Arkan G, **Sahin Ozkartal C**, Tuzun E, Kucukali CI, Utkan T. Harmane ameliorates depressive-like behaviors in chronic mild stress-treated rats: The possible involvement of the neuroinflammatory pathway. 13th World Congress on Inflammation (WCI), 8-12 Temmuz **2017**, Londra/İngiltere.
5. Aricioglu F, Bastaskin T, Kandemir C, Sirvanci S, **Ozkartal C**, Utkan T. Antiinflammatory properties of Brilliant Blue G on chronic unpredictable mild stress-induced changes in rat hippocampus. Eur Psychiatry. 2017; 41(Suppl): s365-366. 25th European Congress of Psychiatry 1-4 Nisan **2017**, Floransa/İtalya.
6. Aricioglu F, Arkan G, Kandemir C, Sirvanci S, **Ozkartal C**, Utkan T. Harmane suppresses microglial neuroinflammatory response and induce antidepressant-like effect in rats. Eur Psychiatry. 2017; 41(Suppl): s366. 25th European Congress of Psychiatry 1-4 Nisan **2017**, Floransa/İtalya.

7. Arıcıoğlu F, Bastaskın T, **Sahin Ozkartal C**, Tuzun E, Kucukali CI, Utkan T. Purinergic 2X7 receptor antagonism attenuates neuroinflammation in prefrontal cortex in chronic stress model of rats. Psychiatry and Clinical Psychopharmacology 2017; 27(suppl 1): p62. 9th International Congress on Psychopharmacology and 5th International Symposium on Child and Adolescent Psychopharmacology 26-30 Nisan **2017**, Antalya/Türkiye.
8. Arıcıoğlu F, Yalcinkaya C, Kandemir C, Sirvanci S, **Sahin Ozkartal C**, Utkan T. Ketamine suppresses microglial activation and induce antidepressant-like effect in rats. Psychiatry and Clinical Psychopharmacology 2017; 27(suppl 1): p63. 9th International Congress on Psychopharmacology and 5th International Symposium on Child and Adolescent Psychopharmacology 26-30 Nisan **2017**, Antalya/Türkiye.
9. Unal G, Dokumaci AH, Aycan Yerer MB, **Ozkartal C**, Arıcıoğlu F. Olanzapine Reversed MK-801 Induced Cell Damage via Akt/GSK-3 β/β –Catenine Signaling Pathway in SH SY5Y Cell Culture. Psychiatry and Clinical Psychopharmacology. 2017; 27(suppl 1): p57. 9th International Congress on Psychopharmacology and 5th International Symposium on Child and Adolescent Psychopharmacology 26-30 Nisan **2017**, Antalya/Türkiye.
10. Arıcıoğlu F, Unal G, Hazar AN, **Sahin C**, Keles R. Famotidine reverses social withdrawal but not fear conditioning deficits induced by acute ketamine model in rats. 7th European Congress of Pharmacology (EPHAR), Congress Book Version 27.06.2016; Page 412/604. 26-30 Haziran **2016**, İstanbul/Türkiye.
11. Arıcıoğlu F, Yalcinkaya C, Utkan T, **Sahin C**. Chronic intermittent administration of ketamine inhibited depressive symptoms in chronic unpredictable mild stress model in rats. Bull Clin Psychopharmacol 2016;26(Supp 1):p182. 8th International Congress on Psychopharmacology and 4th International Symposium on Child and Adolescent Psychopharmacology 20-24 Nisan **2016**, Antalya/Türkiye.

12. Arıcıoğlu F, Bastaskin T, Utkan T, **Sahin C**. Chronic blockade of P2X7 receptors by brilliant blue G inhibited depressive symptoms in rats. Bull Clin Psychopharmacol 2016;26(Supp 1):p183. 8th International Congress on Psychopharmacology and 4th International Symposium on Child and Adolescent Psychopharmacology 20-24 Nisan **2016**, Antalya/Türkiye.
13. Keles R, Hazar AN, **Sahin C**, Unal G, Arıcıoğlu F. Agmatine potentiates the antidepressant effect of ketamine in forced swimming test of rats. Bull Clin Psychopharmacol 2016;26(Supp 1):p184. 8th International Congress on Psychopharmacology and 4th International Symposium on Child and Adolescent Psychopharmacology 20-24 Nisan **2016**, Antalya/Türkiye.
14. Hazar AN, Unal G, **Sahin C**, Keles R, Kraus M, Arıcıoğlu F. Famotidine reverses learning and memory deficits induced by acute ketamine model of schizophrenia in novel object recognition test in rats. Bull Clin Psychopharmacol .2016;26(Supp 1):p185. 8th International Congress on Psychopharmacology and 4th International Symposium on Child and Adolescent Psychopharmacology 20-24 Nisan **2016**, Antalya/Türkiye.
15. Dokumacı AH, Unal G, Yerer Aycan BM, **Sahin C**, Arıcıoğlu F. Possible neuroprotective effects of agmatine via GSK3 β protein expression in SH SY5Y cell line. Bull Clin Psychopharmacol. 2016; 26(Supp 1):p186. 8th International Congress on Psychopharmacology and 4th International Symposium on Child and Adolescent Psychopharmacology 20-24 Nisan **2016**, Antalya/Türkiye.
16. Unal G, Dokumacı AH, Yerer Aycan BM, **Sahin C**, Arıcıoğlu F. Agmatine treatment prevents MK-801 induced neurodegeneration in cell culture Bull Clin Psychopharmacol. 2016;26(Supp 1):p186-7. 8th International Congress on Psychopharmacology and 4th International Symposium on Child and Adolescent Psychopharmacology 20-24 Nisan **2016**, Antalya/Türkiye.

17. **Sahin C**, Podda G, Grayson B, Marsh S, Aricioglu F, Neill JC. Sub-chronic PCP treated rats demonstrate pessimism in a task of optimistic cognitive bias: A novel approach for investigating the disruption of anticipatory motivation in schizophrenia. J Psychopharmacol. 2015; Suppl 29 (8): p71. 26-29 Temmuz, BAP Summer Meeting **2015**, Bristol/İngiltere.
18. **Sahin C**, Albayrak O, Yanikkaya Demirel G, Aricioglu F. Agmatine reverses stress induced NLRP3 inflammasome activation and pro-inflammatory cytokines in rats. CINP (College of International Neuropsychopharmacology) Thematic Meeting 4-6 Haziran **2015**, Dublin/İrlanda.
19. **Erdag E**, **Sahin C**, Tızın E, Kucukali CI, Aricioglu F. In vivo, in vitro and behavioural effects of intracerebral injection of neuro-Behcet's disease immunoglobulin and sera to brain parenchyma. Eur Neuropsychopharmacol. 2015; 25(Suppl 2):p229. 28th European College of Neuropsychopharmacology (ECNP) Congress, **2015**, Amsterdam/Hollanda.
20. **Sahin C**, Podda G, Grayson B, Marsh S, Neill JC, Aricioglu F. The deficit in anticipatory motivation as a negative symptom of schizophrenia: phencyclidine treated rats exhibit pessimism in an optimistic bias task. Eur Neuropsychopharmacol. 2015; 25(suppl 2): 283-283. 28th ECNP Congress, **2015**, Amsterdam/Hollanda.
21. **Unal G**, Terzioğlu G, **Sahin C**, Yanikkaya Demirel G, Aricioglu F. The effect of acute ketamine administration on NLRP3 inflammasome activation in a sub-chronic stress model of rats. Eur Neuropsychopharmacol. 2015; 25(Suppl 2): p226. 28th ECNP Congress **2015**, Amsterdam/Hollanda.
22. **Tuzun E**, **Erdag E**, **Sahin C**, Kucukali CI, Kaya M, Kurtuncu M, Turkoglu R, Aricioglu F. Serum antibodies isolated from neuro-Behcet's disease patients mediate neuronal death and cognitive impairment. American Academy of Neurology Annual Meeting 2015;84(14). 8-25 Nisan **2015** Washington DC/ABD.

23. **Sahin C**, Albayrak O, Yanikkaya Demirel G, Guden DS, Aricioglu F. Acute Agomelatine administration has no inhibitory effect on NLRP3 inflammasome activation and pro-inflammatory cytokines induced by sub-chronic restraint stress in prefrontal cortex of rats. Bull Clin Psychopharmacol. 2015; 25(Suppl. 1): S100. 7th International Congress on Psychopharmacology and 3rd International Symposium on Child and Adolescent Psychopharmacology, 15-19 Nisan **2015**, Antalya/Türkiye.
24. **Unal G**, Terzioğlu G, **Sahin C**, Yanikkaya Demirel G, Aricioglu F. Acute administration of ketamine inhibited stress induced pro-inflammatory cytokines in hippocampus of rats. Bull Clin Psychopharmacol. 2015;25(Suppl. 1): S101. 7th International Congress on Psychopharmacology and 3rd International Symposium on Child and Adolescent Psychopharmacology, 15-19 Nisan **2015**, Antalya/Türkiye.
25. **Hayward A**, **Sahin C**, Squirrel D, Gigg J, Harte M, Grayson B, Neill J. Methylphenidate in cognition: improved memory and neural correlates of attention. British Neurosci. Assoc. Abstr., Vol. 23: p167, 2015 ISN 1345-8301 2015 British Neuroscience Association (BNA): Festival of Neuroscience, 12-15 Nisan **2015** Edinburgh/İskoçya.
26. **Arıcıoğlu F**, **Sahin C**, Unal G, Arkan G, Utkan T. Bioactive beta carbolines harman and norharman attenuate oxidative damage in sub-chronic stress model in rats. 4th World Psychiatric Association International Congress, **2015**; 447-447.
27. **Arıcıoğlu F**, **Sahin C**, Unal G, Arkan G, Utkan T. Agmatine attenuates cecal ligation induced sickness behavior in rats. 4th World Psychiatric Association International Congress, **2015**; 446-446.
28. **Sahin C**, Albayrak O, Yanikkaya Demirel G, Aricioglu F. Sub-chronic stress not only induces pro-inflammatory cytokines but also activates NLRP3

inflammasome in rats. Eur Neuropsychopharmacol. 2014; 24(Suppl 2):S618 27th ECNP Congress, 18-21 Ekim **2014**, Berlin/Almanya.

29. Akdag K, Kocyigit-Kaymakcioglu B, **Sahin C**, Unal G, Aricioglu F. Synthesis and antinociceptive activities of some hydrazide hydrazones of ethyl 4-chloro-2-methylthio-5-pyrimidine carboxylate. Joining Forces in Pharmaceutical Analysis and Medicinal Chemistry (MCB2014), **2014**, Groningen/Hollanda.
30. **Sahin C**, Guden DS, Unal G, Aricioglu F. Acute P2X7 receptors blockade by Brilliant Blue G (BBG) does not result in antidepressant-like activity in mice. Bull Clin Psychopharmacol. 2014; 24(Suppl1): 136. 6th International Congress of Psychopharmacology, 16-20 Nisan **2014**, Antalya/Türkiye.
31. Aricioglu F, **Sahin C**, Albayrak O, Akbulut Z, Akdeniz FT, Yanikkaya Demirel G. Agmatine reverses stress induced inflammatory response in rats. 2nd Euroasian Regional Congress of Biological Psychiatry. 5-8 Haziran **2014**, Bursa/Türkiye.
32. Gumru S, **Sahin C**, Aydemir O, Aricioglu F. Etanercept potentiates antidepressant activity of desipramine in forced swim test in mice. 3rd International Congress on Neurobiology, Psychopharmacology & Treatment Guidance ICNP2013 Abstract Book p.139. 30 Mayıs-2 Haziran **2013**, Selanik/Yunanistan.

Ulusal Kongre (sempozyum, panel vb.) Sözlü Özet Bildiri

1. Erdağ E, **Şahin C**, Küçükali Cİ, Arıcıoğlu F, Kaya M, Tüzün E. İntraserebral Nöro-Behçet IgG ve serum enjeksiyonunun beyin parankim histolojisi üzerine etkileri. Ulusal Nöroloji Kongresi, Kasım **2014**, Antalya/Türkiye.

Ulusal Kongre (sempozyum, panel vb.) Poster Özet Bildiri

1. Terzioğlu G, **Şahin C**, Ünal G, Akdeniz T, Akbulut Z, Aru B, Yanikkaya Demirel G, Arıcıoğlu F. Sıçan subkronik stres modelinde, hipokampus ve prefrontal korteks bölgelerinde, inflamazom ilişkili genlerin ekspresyonunda değişiklikler.

23. Ulusal İmmünoloji Kongresi Bildiri Kitabı s.36, 2015. 26-30 Nisan 2015, Antalya/Türkiye.

3. PROJE DENEYİMLERİ

a. Tamamlanmış Projeler

Kurumsal:

1. **Şahin C** (Araştırmacı). **(2013-2016)**. Deneysel Hayvan Modelleri Kullanılarak Oluşturulan Psikiyatrik Hastalıklarda Glutamaterjik Sistem ile Sitokin İlişkisinin Araştırılması. (Proje Yürütücüsü: Prof. Dr. Feyza Arıcıoğlu) M.Ü. Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi, 2013-2016 (SAG-E-120613-0233).
2. **Şahin C** (Araştırmacı) **(2016-2017)**. NöroBehçet Olgularının Serum İmmünoglobulin Örneklerinin Nöronal Sağkalım Üzerine Etkileri(Proje Yürütücüsü: Prof. Dr. Erdem Tüzün). (TDK-2016-22073). İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi 18.08.2016-18.02.2017.

TÜBİTAK:

1. **Şahin C** (Araştırmacı). **(2015-2016)**. Fensiklidin ve Mk-801 Uygulanmış Sh Sy5y Hücrelerinde Famotidin'in Akt/Gsk-3 β /Katenin Sinyal Yolağı Üzerine Etkilerinin İncelenmesi (Proje Yürütücüsü: Prof. Dr. Feyza Arıcıoğlu). TÜBİTAK 1002, 01.07.2015-(115S145).

Uluslararası:

1. **Şahin C** (Araştırmacı). **(2014)**. Investigating the effect of sub-chronic PCP treatment on cognitive bias using the sandpaper test. University of Manchester-Biological Services Facility, Researcher, 2014 (Proje Yürütücüsü: Prof. Joanna C Neill). (P.L.N: 40/3597 P.I.L: 60/13133)

b. Devam Eden Projeler:

Kurumsal:

1. **Şahin C** (Araştırmacı). Sıçanlarda oluşturulan depresyon modelinde Nod benzeri reseptör proteini-3 inflamazomu aracılı inflamatuvar yollar ve nitridojik sistem arasındaki ilişkinin araştırılması (SAG-C-DRP-110915-0417), M.Ü. Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi, (Yürütücü: Prof. Dr. Feyza Arıcıoğlu 11.09.2015- Devam Ediyor).

TÜBİTAK:

1. **Özkartal C** (Proje Yürütücüsü) (2017-). Ketaminin antidepresan etkisine nöroinflamatuvar mekanizmaların olası katkısının araştırılması TÜBİTAK 1002, (216S797).

4. BURS BİLGİLERİ

TÜBİTAK, Yurtdışı Doktora Eğitimi Burs Programı BİDEB- 2211 Bursiyeri (Mart 2013-2017)

5. ÖDÜL BİLGİLERİ

1. President's Poster Prize-2017

Sahin Ozkartal C, Arıcıoğlu F, Tuzun E, Keles R, Kucukali CI. Possible involvement of the mammalian target of rapamycin (mTOR) signaling pathway in the antidepressant-like effect of agmatine as a novel endogenous neuromodulator. Journal of Psychopharmacology 2017; 31(Suppl 8): A61. British Association of Psychopharmacology (BAP) Summer Meeting 23-26 Temmuz 2017, Harrogate/İngiltere.

Ödül tipi: Poster ödülü

Ödülü veren kuruluş: İngiliz Psikiyatrikoloji Birliği (British Association of Psychopharmacology; BAP) tarafından 23-26 Temmuz 2017 tarihleri arasında

Harrogate, İngiltere’de düzenlenen toplantıda (BAP 2017 Summer Meeting) verilmiştir.

2. Best Poster Award-2017 (Tez Kaynaklı Bildiri Ödülü)

Sahin Ozkartal C, Aricioglu F, Tuzun E, Keles R, Kandemir C, Sirvanci S, Kucukali CI. (2017). Agmatine produces antidepressant effect via modulation of neuroinflammation in chronic unpredictable mild stress model of rats: Implication in inflammatory perspective of depression. *Psychiatry and Clinical Psychopharmacology*, 2017; 27(suppl 1): p60. 9th International Congress on Psychopharmacology and 5th International Symposium on Child and Adolescent Psychopharmacology 26-30 Nisan 2017, Antalya/Türkiye.

Ödül tipi: Poster Birincilik ödülü

Ödülü veren kuruluş: Türk Psikofarmakoloji Birliği (Turkish Association of Psychopharmacology; TAP) tarafından 26-30 Nisan 2017 tarihleri arasında Antalya’da düzenlenen 9. Uluslararası Psikofarmakoloji Kongresi, 5. Uluslararası Çocuk ve Ergen Sempozyumu (9th International Congress on Psychopharmacology and 5th International Symposium on Child and Adolescent Psychopharmacology) kapsamında verilmiştir.

Ek-2 Etik Kurul Onayı



MARMARA ÜNİVERSİTESİ HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU

PROJE ONAY FORMU

BAŞVURU BİLGİLERİ	PROTOKOL KODU	55.2015.mar	ÇALIŞMA: BİLİMSEL		
	PROJE ADI	sıçanlarda Oluşturulan Depresyon Modelinde Nod Benzeri Reseptör Proteini 3 inflamazomu Aracılı inflamatuvar Yolaklar ve Nitriderjik Sistem Arasındaki ilişkisinin Araştırılması			
	SORUMLU ARAŞTIRMACI ÜNVANI/ ADI	Prof. Dr. Feyza ARICIOĞLU			
	ARAŞTIRMA MERKEZİ	DEHAMER			
	DESTEKLEYİCİ				
KARAR BİLGİLERİ	TARİH: Yukarıda başvuru bilgileri verilen araştırma başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmancının gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş ve gerçekleştirilmesinde sakınca bulunmadığı için kurumumuzca onaylanmasına oy birliği ile karar verilmiştir. Onay sonrasında yapılacak her türlü proje değişiklikleri (katılımcılar, başlık vb.) veya protokol değişikliklerinin Etik Kurula bildirilerek proje onayının yenilenmesi gerekmektedir.				
ETİK KURUL BİLGİLERİ					
ÇALIŞMA ESASI	Deney hayvanları ile yapılacak olan bilimsel araştırma, test, sağlık hizmetleri uygulamaları ve eğitim-öğretim gibi temel etkinliklerde kullanılan yöntem ve materyaller ile ilgili etik standartları gözetmek, etik ilkeler doğrultusunda görüş bildirmek, araştırma önerilerini incelemek ve sertifikası olmayanların deney hayvanı kullanmalarını engellemektir.				
ÜYELER					
Ünvanı/ Adı/ Soyadı	Uzmanlık Dalı	Kurumu/ Ek Üyeliği	Onaylanan Proje ile ilişkisi	Toplantıya Katılım	İmza
Prof.Dr. Göksel ŞENER	Farmakoloji	M.Ü. Eczacılık Fakültesi ve Hayvan Deneyleri Etik Kurul Başkanı	Var Yok	Evet Hayır	
Prof.Dr. İnci ALICAN	Fizyoloji	M.Ü. Tıp Fakültesi ve Hayvan Deneyleri Etik Kurul (Yürütücü Sekreter)	Var Yok	Evet Hayır	
Prof.Dr. Ayşen YARAT	Biyokimya	M.Ü. Diş Hekimliği Fakültesi ve Hayvan Deneyleri Etik Kurul Üyesi	Var Yok	Evet Hayır	
Prof.Dr. Serap ŞİRVANCI	Histoloji Embriyoloji ABD	M.Ü. Tıp Fakültesi ve Hayvan Deneyleri Etik Kurul Üyesi	Var Yok	Evet Hayır	
Prof.Dr. Rezzan GÜLHAN	Farmakoloji	M.Ü. Tıp Fakültesi ve Hayvan Deneyleri Etik Kurul Üyesi	Var Yok	Evet Hayır	
Doç.Dr. Gürkan SERT	Tıp Tarihi ve Etik	M.Ü. Tıp Fakültesi ve Hayvan Deneyleri Etik Kurul Üyesi	Var Yok	Evet Hayır	
Vet.Hek. Dilek ÖZBEYLİ	Veteriner Hekim	M.Ü. Tıp Fakültesi ve Hayvan Deneyleri Etik Kurul Üyesi	Var Yok	Evet Hayır	
Bio. Arif GÜMÜŞ	Biyoloji	Sivil Toplum Kuruluşu Üyesi ve Kurumla ilişkisi olmayan TC vatandaşı üye	Var Yok	Evet Hayır	
Dilek KÖKTÜRK	Emekli Memur	Kurumla ilişkisi olmayan TC vatandaşı üye	Var Yok	Evet Hayır	