SENEM ESİN YAVAŞ

HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI DOKTORA TEZİ. 2024

T.C.
BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIP FAKÜLTESİ HİSTOLOJİ VE
EMBRİYOLOJİ ANA BİLİM DALI

SIÇANLARDA DENEYSEL SİSTEMİK İNFLAMASYONDA ALL-TRANS RETİNOİK ASİT (ATRA)' İN HİPOKAMPUSTAKİ ETKİLERİNİN EPHA4 VE EPHB2 EKSPRESYONU İLE ARAŞTIRILMASI

SENEM ESİN YAVAŞ

(DOKTORA TEZİ)

BURSA-2024

T.C.
BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIP FAKÜLTESİ HİSTOLOJİ VE
EMBRİYOLOJİ ANA BİLİM DALI

SIÇANLARDA DENEYSEL SİSTEMİK İNFLAMASYONDA ALL-TRANS RETİNOİK ASİT (ATRA)' İN HİPOKAMPUSTAKİ ETKİLERİNİN EPHA4 VE EPHB2 EKSPRESYONU İLE ARAŞTIRILMASI

SENEM ESİN YAVAŞ

(DOKTORA TEZİ)

DANIŞMAN:
Prof. Dr. Semiha ERSOY

TDK-2021-552- B.U.Ü. Bilimsel Araştırma Projeler Koordinasyon Birimi

BURSA-2024

T.C.
BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ETİK BEYANI

Doktora tezi olarak sunduğum "**Sıçanlarda deneysel sistemik inflamasyonda all-trans retinoik asit (ATRA)' in hipokampustaki etkilerinin EphA4 ve EphB2 ekspresyonu ile araştırılması**" adlı çalışmanın, proje safhasından sonuçlanmasına kadar geçen bütün süreçlerde bilimsel etik kurallarına uygun bir şekilde hazırlandığını ve yararlandığım eserlerin kaynaklar bölümünde gösterilenlerden oluştuğunu belirtir ve beyan ederim.

Senem Esin YAVAŞ

15.01.2024

TEZ KONTROL ve BEYAN FORMU

26./01./2024

Adı Soyadı: Senem Esin YAVAŞ
Anabilim Dalı: TIP – Histoloji ve Embriyoloji
Tez Konusu: Sıçanlarda deneysel sistemik inflamasyonda all-trans retinoik asit (ATRA)'in hipokampustaki etkilerinin EphA4 ve EphB2 ekspresyonu ile araştırılması

ÖZELLİKLER	UYGUNDUR	UYGUN DEĞİLDİR	AÇIKLAMA
Tezin Boyutları	x	❑	
Dış Kapak Sayfası	x	❑	
İç Kapak Sayfası	x	❑	
Kabul Onay Sayfası	x	❑	
Sayfa Düzeni	x	❑	
İçindekiler Sayfası	x	❑	
Yazı Karakteri	x	❑	
Satır Aralıkları	x	❑	
Başlıklar	x	❑	
Sayfa Numaraları	x	❑	
Eklerin Yerleştirilmesi	x	❑	
Tabloların Yerleştirilmesi	x	❑	
Kaynaklar	x	❑	

DANIŞMAN ONAYI

Unvanı Adı Soyadı:
Prof. Dr. Semiha ERSOY

İmza:

İÇİNDEKİLER

ETİK BEYANI.....II
KABUL ONAY SAYFASI.....III
TEZ KONTROL ve BEYAN FORMU.....IV
İÇİNDEKİLER V
TÜRKÇE ÖZET.....VIII
İNGİLİZCE ÖZET.....IX
TEZ KONUSUNUN KÜRESEL SÜRDÜRÜLEBİLİR KALKINMA HEDEFLERİ İLE İLİŞKİSİ X
1. GİRİŞ.....1
1.1. Tez Çalışmasının Amacı ve Ana Hatları…….....4
2. GENEL BİLGİLER…….....8
2.1. İnflamatuvar yanıt ve sistemik inflamasyon: Nöroinflamasyonun rolü.....8
2.1.1. İmmun sisteme genel bakış.....8
2.1.2. İnflamasyon.....10
2.1.3. Lipopolissakkarit.....12
2.2. Nöroinflamasyon.....14
2.2.1. Periferik immün yanıtın beyne iletilmesi.....15
2.2.2. Merkezi sinir sistemindeki lokal immün yanıtlar.....16
2.2.3.MSS'de inflamatuvar sitokinler…….....19
2.2.4. Nöroinflamasyonun sonuçları.....21
2.2.5. LPS ilişkili nöroinflamasyonun indüklenmesi.....24
2.3. Depresyon 25
2.3.1. Depresyonun etiyolojisi.....25
2.3.2. Depresyona duyarlılıkta cinsiyet farklılıkları.....28
2.3.3. Hastalık davranışı ve depresyon.....28
2.3.4. Depresyonun deneysel olarak modellenmesi.....29
2.4. Hipokampus 32
2.4.1. Hipokampusun histofizyolojisi.....32
2.4.2. Hipokampal piramidal nöronların organizasyonu…….....36
2.4.3. Hipokampal devre.....37
2.4.4. Hipokampal nöroplastisite.....37
2.5. Eph-ephrin sinyal sistemi.....41
2.5.1. Moleküler yapı 42
2.5.2. Eph-ephrin sinyali: hücre temasına bağımlı sinyalleşme.....44
2.5.3. Eph-ephrin sinyal modelleri ve hücresel yanıtları.....45
2.5.4. Eph-ephrin sinyalleşmesinin biyolojik etkileri.....47
2.5.5. Yetişkin MSS'inde eph/ephrin sinyal sistemi.....49
2.5.6. Eph/ephrin sisteminin patolojilerdeki rolleri.....52
2.6. Retinoidler.....54
2.6.1. Retinoidler (A vitamini) 54
2.6.2. Retinoik asit metabolizması ve sinyali.....56
2.6.3. İmmun sistemde retinoik asit sinyalinin etkileri.....54

2.6.4. Retinoidlerin klinik kullanımı……...58
2.6.5. Embriyonik dönemde retinoik asit sinyali: Embriyogenez ve MSS'nin gelişimindeki roller……59
2.6.6. Yetişkin merkezi sinir sisteminde retinoik asit sinyali.....60
2.6.7.Merkezi sinir sistemi patolojilerinde retinoik asit sinyali……...61
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....63
3.1. Etik onay.....63
3.2. Deney hayvanları.....63
3.3. Deney grupları.....63
3.3.1. Akut nöroinflamasyon.....64
3.3.2. Kronik nöroinflamasyon.....64
3.4. Deneysel tasarım 65
3.5. Sistemik inflamatuvar yanıt üzerinden nöroinflamasyonun indüklenmesi.....66
3.5.1. LPS'nin hazırlanması.....66
3.5.2. Akut nöroinflamasyon ve hastalık davranışının indüklenmesi.....67
3.5.3. Kronik nöroinflamasyon ve depresyon benzeri davranışın indüklenmesi……67
3.6. All trans retinoik asit (ATRA) uygulaması.....67
3.7. Davranış Testleri.....68
3.7.1. Açık Alan Testi (Open Field Test - OFT) 68
3.7.2. Kuyruk Süspansiyon Testi (Tail Suspention Test - TST) 68
3.8. Kan eldesi.....69
3.9. Hemositometri.....69
3.10. Periferik kan yayma.....70
3.11. Kardiyak perfüzyon ve doku eldesi.....70
3.11.1. Doku takibi.....71
3.11.2. Kesitlerin alınması.....72
3.11.3. Krezil viyole metodu.....72
3.12. İmmünohistokimyasal analizler.....73
3.12.1. Avidin-biyotin peroksidaz metodu.....73
3.12.2. İmmunofloresans işaretleme metodu.....74
3.13. TUNEL metodu.....76
3.14. İstatistiksel analizler.....77
4. BULGULAR.....79
4.1. LPS ile indüklenen sistemik inflamatuvar yanıtın ve *ATRA* uygulamalarının toplam lökosit sayılarına ve formül lökosite etkisi.....79
4.2. Davranış testlerinin sonuçları.....82
4.2.1. Akut sistemik inflamasyonun ve *ATRA*'in anksiyete ve depresyon davranışına etkisi.....83
4.2.2. Uzun süreli kronik sistemik inflamasyonun ve *ATRA*'in anksiyete ve depresyon davranışına etkisi.....86
4.3. Hipokampusun histopatolojik değerlendirmeleri.....89
4.3.1. Akut dönem gruplardaki histopatolojik değişiklikler.....89
4.3.2. Kronik dönem gruplarındaki histolopatolojik değişiklikler.....94
4.4. Hipokampal nöroplastisitenin Eph reseptörleri ile değerlendirmeleri….....99
4.4.1. Hipokampal EphA4 ve EphB2'nin laminar ekspresyon paterni……99
4.4.2. Akut sistemik LPS ve *ATRA*'nın hipokampal EphA4 ve EphB2 ekspresyonuna etkisi.....102
4.4.3. Kronik sistemik LPS ve *ATRA*'nın hipokampal EphA4 ve EphB2 ekspresyonuna

etkisi…….113
4.5. Bulguların Özeti……..……124
4.5.1 Akut gruplar…….124
4.5.2. Kronik gruplar…….……125
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....127
6. KAYNAKLAR.....149
7. SİMGELER VE KISALTMALAR…….....187
8. EKLER.....190
9. TEŞEKKÜR.....193
10. ÖZGEÇMİŞ…….....194

TÜRKÇE ÖZET

Sistemik inflamasyon, nöroinflamatuvar değişikliklere neden olarak birçok kronik psikiyatrik bozukluğun da gelişiminden ve ilerlemesinden sorumludur. Retinoik asit beyinde proliferasyon, diferansiyasyon, hücrelerin sağkalımı gibi biyolojik olayları düzenlerken, yüksek dozlarda nörotoksiktir. Eph reseptörleri hem işlevsel hem de yapısal nöronal plastisiteyi modüle ederek, hipokampal davranışları düzenlerler. Çalışmamızda nöroinflamasyon ve yüksek retinoik asit düzeylerinin hipokampusta EphA4 ve EphB2 reseptörlerinin ekspresyonları üzerine etkilerinin incelenmesi amaçlandı.

Çalışmada *Wistar albino* dişi sıçanlar kullanıldı. Akut sistemik inflamasyon intraperitoneal 5mg/kg lipopolisakkarit (LPS) ile, kronik sistemik inflamasyon intraperitoneal 0,5mg/kg/7 gün LPS ile indüklendi. Kronik gruplarda immün yanıtın uzun süreli devamlılığı için 7 günlük aralarla 3 idame doz LPS uygulandı. Akut all trans retinoik asit (*ATRA*) uygulamaları 50 mg/kg dozda, kronik *ATRA* uygulamaları 28 gün 6 mg/kg dozda intragastrik gavaj ile gerçekleştirildi. Deneklerden elde edilen parafin beyin kesitlerine Nissl boyaması, TUNEL metodu, Iba-1, EphA4 ve EphB2 immünohistokimyası uygulandı.

Akut ve kronik sistemik inflamasyonun hipokampusta mikroglial yanıtı tetiklediği, nöronal dejenerasyon ve apoptoza neden olduğu belirlendi. Sağlıklı koşullarda kronik *ATRA* uygulamasının düşük derecede aseptik nöroinflamatuvar yanıta neden olduğu, LPS ile indüklenen kronik mikroglial yanıtı kısmen baskıladığı saptandı. Akut ve kronik nöroinflamasyonda EphA4 ekspresyon düzeylerinin arttığı, EphB2 ekspresyonlarının azaldığı görüldü. Tekrarlanan retinoik asit uygulamaları özellikle EphB2 ekpsresyon düzeylerinde azalmaya neden oldu.

Sonuç olarak, LPS ve yüksek retinoik asit kaynaklı nöronal fonksiyon kaybı Eph reseptörlerindeki azalış/artış ile ilk kez gösterildi. İnflamatuvar süreçler sonrası gelişen nöropatolojilere yönelik yeni terapötik stratejiler geliştirmede Eph reseptör ekspresyonları ile plastisitenin modülasyonu ve monitorizasyonunun yararlı olacağı düşünüldü.

Anahtar kelimeler: Nöroinflamasyon, depresyon, all trans retinoik asit, EphA4, EphB2

İNGİLİZCE ÖZET

INVESTIGATION of THE EFFECTS of ALL-TRANS RETINOIC ACID (ATRA) on the HIPPOCAMPUS in EXPERIMENTAL SYSTEMIC INFLAMMATION in RATS by EPHA4 and EPHB2 EXPRESSION

Systemic inflammation causes neuroinflammatory changes and is responsible for the development and progression of many chronic psychiatric disorders. Retinoic acid regulates biological events in the brain, such as proliferation, differentiation, and cell survival, but is neurotoxic at high doses. Eph receptors regulate hippocampal behavior by modulating both functional and structural neuronal plasticity. In our study, we aimed to investigate the effects of neuroinflammation and high retinoic acid levels on the expression of EphA4 and EphB2 receptors in the hippocampus.

Wistar albino female rats were used in the study. Acute systemic inflammation was induced with intraperitoneal 5mg/kg lipopolysaccharide (LPS), and chronic systemic inflammation was induced with intraperitoneal 0.5mg/kg/7 days LPS. For long-term maintenance of immune response in chronic groups, three maintenance doses of LPS were administered at 7-day intervals. Acute all-trans-retinoic acid (*ATRA*) administration was performed at a dose of 50 mg/kg, and chronic *ATRA* administration was performed by intragastric gavage at a dose of 6 mg/kg for 28 days. Nissl staining, TUNEL method, Iba-1, EphA4, and EphB2 immunohistochemistry were performed on the paraffin brain sections obtained from the subjects.

Acute and chronic systemic inflammation triggered a microglial response in the hippocampus, causing neuronal degeneration and apoptosis. Chronic *ATRA* administration induced a low aseptic neuroinflammatory response in healthy conditions and partially suppressed the LPS-induced chronic microglial response. EphA4 expression levels increased, and EphB2 expression levels decreased in acute and chronic neuroinflammation. Repeated retinoic acid applications caused a decrease, especially in EphB2 expression levels.

In conclusion, LPS and high retinoic acid-induced loss of neuronal function were demonstrated for the first time by the decrease/increase in Eph receptors. Modulation and monitoring of plasticity by Eph receptor expression may help develop new therapeutic strategies for neuropathologies that develop after inflammatory processes.

Keywords: Neuroinflammation, depression, all-trans-retinoic acid, EphA4, EphB2

BUÜ SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TEZ KONUSUNUN KÜRESEL SÜRDÜRÜLEBİLİR KALKINMA HEDEFLERİ İLE İLİŞKİSİ



Doktora tezi olarak sunduğum **"Sıçanlarda deneysel sistemik inflamasyonda all-trans retinoik asit (ATRA)'in hipokampustaki etkilerinin EphA4 ve EphB2 ekspresyonu ile araştırılması"** başlıklı tez **3.** Küresel Sürdürülebilir Kalkınma Hedefi ile ilişkilidir.

1. GİRİŞ

İnflamasyon, immün sistemin zararlı ve yabancı uyaranları tanıyıp uzaklaştırdığı iyileşme sürecini başlattığı, savunma mekanizmasının önemli bir parçasıdır. Patojenik organizmalara karşı koruma amaçlı zamana ve bölgeye özgü bir savunma mekanizması olarak ortaya çıkabileceği gibi, merkezi ve periferik makrofajları aktive ederek hasarlı hücresel kalıntıları ortadan kaldırılması için de önemli bir mekanizmadır (Hannoodee, & Nasuruddin, 2022). Ancak çözülmemiş inflamatuvar yanıt, adaptif bağışıklık sisteminin aktivasyonu yoluyla dolaşımdaki lökositlerin, özellikle B- ve T- lenfositleri içeren kronik bir inflamasyon durumuna geçebilir (Chovatiya, & Medzhitov, 2014). Sistemik inflamasyon, beyin parankiminin nöroinflamasyonu tetikleyebilir. İnflamatuvar süreç uzadığında ve proinflamatuvar mediyatörlerin fizyolojik aralığın üzerine çıkması durumunda, nörodejeneratif değişiklikler de ortaya çıkar (Wang ve ark., 2023).

Lipopolisakkarit (LPS), gram negatif bakterilerin dış membranının ana bileşenidir. Çok sayıda araştırma birçok patolojik süreçte kanda dolaşan düşük LPS seviyelerinin varlığını göstermektedir (Brenchley ve ark., 2006; Szeto ve ark., 2008; Zhang ve ark., 2009). Bu LPS kaynaklarının, ağız boşluğu da dahil olmak üzere gastrointestinal sistemin endojen florasından bakteriyel translokasyonunu yansıttığı düşünülmektedir. Ağız boşluğu ve bağırsaklar bakteri, virüs, mantar, protozoa gibi çok çeşitli mikroorganizmalara sahip karmaşık birimlerdir; bu bölgelerden sisteme mikroorganizma kaçışı, genel sağlığı etkileyecek düşük dereceli sistemik inflamasyonu indükleyebilir. Düşük dereceli bile olsa kronik sistemik inflamasyonun, nörodejeneratif ve kardiyovasküler hastalıklar gibi birçok kronik hastalık için de bir risk faktörü olduğu kabul edilmiştir (Ferrucci, & Fabbri, 2018). Kronik inflamasyonun bu tür etkileri birçok kronik psikiyatrik bozukluğun da karakteristiğidir. İmmun, endokrin ve nörotransmitter sistemleri işlevsiz hale getirebilir ve böylece kronik psikiyatrik bozuklukların psikopatolojisine katkıda bulunabilir (Holmes, 2003; Mrak, 2009).

Retinoik asit (RA) ailesini, A vitamininin ana metabolitleri olan 13-cis-retinoik asit (13-cis-RA veya izotretinoin, ITT) ve all-trans retinoik asit (*ATRA*, atRA, tretionin) oluşturur. *ATRA* ve diğer retinoik asit metabolitleri hücrelerdeki retinoik asit reseptörlerine bağlanarak doku homeostazını korumak için gerekli olan hücre

farklılaşması, çoğalması, hayatta kalması ve ölümü gibi bir dizi biyolojik olayı düzenleyen hormon benzeri moleküller olarak görev alır. Embriyonik Merkezi Sinir Sistemi (MSS)'nin gelişiminde retinoik asit, nöronal farklılaşmanın önemli bir düzenleyicisidir. Yetişkin MSS'de de önemli bir faktör olan RA, gen ekspresyonlarını düzenleyerek nöronal sinaptik plastisiteyi ve nörojenezi düzenler. Retinoik asit reseptörlerinin yetişkin beyninde en yüksek ekspresyonu hipokampustadır. Bu da yetişkin beyninin özellikle hipokampus bölgesinin RA'e duyarlı olduğunu gösterir. A vitamini veya RA normal beyin fonksiyonu için gereklidir (McCaffery, Zhang & Crandall, 2006). Ancak RA seviyelerindeki dengesizlikler ve normal paternde bir bozulma, gelişmekte olan veya olgun MSS'de anormal değişikliklere neden olacaktır. Bununla birlikte, retinoik asitler dermatoloji, immün yetmezlik ve onkoloji alanında (özellikle lösemi) geniş terapötik uygulamalara sahip moleküllerdir (Chandraratna, 1998). Yakın zamanlı çalışmalarda, retinoik asitin teropötik kullanımı sonucunda artan depresyon ve intihar oranları bildirilmiştir (Hu, van Dam, Wang, Lucassen, & Zhou, 2020; McCaffery ve ark., 2006). *ATRA*'nın sistemik uygulamasını takiben, kan beyin bariyerini aşarak beyin dokusunda yüksek konsantrasyonlara ulaştığı bilinmektedir (Jing, Nelson, Paik, Shirasaka, Amory, & Isoherranen, 2017; Wang, Campbell, & Furner, 1980). Nörotoksisite, A vitamini ve retinoidlerin orta ila yüksek dozlarının yanlışlıkla veya tıbbi tavsiye nedeniyle tüketilmesinin olası bir yan etkisi olarak uzun zamandır gösterilmektedir. Bununla birlikte, bu tür moleküllerin rol aldığı nörotoksik mekanizma henüz net değildir.

Depresyon; dünya genelinde nüfusun yaklaşık %10-20'sini yaşamın bir döneminde etkileyen oldukça karmaşık etiyolojiye sahip, yaygın bir nöropsikiyatrik hastalıktır (Lim, Tam, Lu, Ho, Zhang, & Ho, 2022). Depresyon ve inflamasyon arasında ilişki olduğunu gösteren kanıtlar giderek artmaktadır (Goldsmith, Rapaport, & Miller, 2016). Akut bir enfeksiyonu takiben görülen 'hastalık davranışı', yorgunluk, uyku bozukluğu ve azalmış motivasyon gibi belirtilerin büyük çoğunluğu depresyonla ortaktır (Dantzer, O'Connor, Freund, Johnson, & Kelley, 2008). Yaşamın erken dönemindeki geçirilen enfeksiyonlar yetişkinlikte daha yüksek depresyon riski ile ilişkilendirilirken (Benros, Nielsen, Nordentoft, Eaton, Dalton, & Mortensen, 2011), romatoid artrit gibi kronik immün aracılı inflamatuvar hastalıkları olan kişilerin daha yüksek depresyon prevalansı sergilediği bildirilmiştir (Dickens, McGowan, Clark-

Carter, & Creed, 2002).

Günümüzde kullanılan antidepresanların çoğu serotonerjik ve/veya noradrenerjik nörotransmisyonu modüle etmektedir (Jones, & Thomsen, 2013). Ancak bunların etkinliği hem doktorların hem de hastaların umduğu kadar yüksek değildir. Bu nedenle yeni tedavi stratejileri arayışlarında, araştırmacılar psikiyatrik ve nörolojik hastalıklarda doğuştan gelen bağışıklık sisteminin kilit rol oynadığını gösteren yeni kanıtlar bulmaya yönelmiştir (Jones, & Thomsen, 2013; Miller, 2010).

Merkezi sinir sisteminin belirli bölgelerindeki özellikle de hipokampustaki anormal nöroplastisitenin (nörogenez, akson dallanması, dendritogenez ve sinaptogenez) depresyonun patofizyolojisinde önemli bir faktör olduğu düşünülmektedir (Masi, & Brovedani, 2011). EphA, EphB reseptörleri ve onlara bağlanan ephrin ligandları, gelişmekte olan ve yetişkin sinir sisteminin organizasyonunu, bağlantısını ve plastisitesini düzenler (Cramer, & Miko, 2016). EphB2 resptörü, N-methyl-D-aspartate reseptörü (NMDAR) ile doğrudan etkileşime girer (Dalva ve ark. 2000; Grunwald ve ark., 2001) ve işlevlerini modüle eder (Takasu, Dalva, Zigmond, & Greenberg, 2002). EphB2'nin aktivasyonu NMDAR'lerinin Src ailesi kinazlar tarafından fosforilasyonunu indükler ve böylece NMDAR'e bağlı kalsiyum akışını güçlendirir (Takasu ve ark., 2002). EphB2 sinyali ayrıca dendritik omurga morfolojisini ve sinaptik plastisiteyi modüle eder (Dalva ve ark., 2000; Kania, & Klein, 2016). EphA4 reseptörü de beyindeki plastisitede rol oynar ve plastisitenin yüksek olduğu yetişkin hipokampusunda en yüksek ekspresyon seviyesine sahip EphA reseptör ailesi üyesidir (Bouvier ve ark., 2008; Pasquale, 2008; Tremblay ve ark., 2007). EphA4'ün, depresyonun patofizyolojisinde de rol oynayan N-metil-D-aspartat (NMDA) reseptör nörotransmisyonunun negatif bir düzenleyicisi olduğu bildirilmektedir. EphA4 sinyallemenin aktivasyonu dendritik spina uzunluğunu azaltırken, EphA4 sinyalinin inhibisyonu omurga uzunluğunu artırır (Nimchimsky, Sabatini, & Svoboda, 2002). EphA4, EphB1, EphB2 ve EphB3 dahil olmak üzere Eph reseptör ailesinden işlevleri daha çok bilinen bu dört üyesi, depresyon, anksiyete ve hafıza sorunları gibi duygusal ve bilişsel bozukluklarla yakından ilişkili olan prefrontal korteks, hipokampus ve amigdalada yüksek oranda eksprese edilir (Liebl, Morris, Henkemeyer, & Parada, 2003). Nöronal fonksiyonun niteliği, geniş dendritik bağlantı ağının bütünlüğüne ve sağlıklı sinaps sayısına bağlıdır. Bu nedenle bu iki süreçle de

yakından ilişkili olan düzenleyici proteinlerin, psikiyatrik hastalıkların ana mekanizmasında rol alması olasıdır.

Depresyon gibi nörobiyolojik hastalık modelleri, en yaygın olarak etkilenen beş ana süreç üzerinden tanımlanır. Bunlar; (i) monoaminerjik sistem, (ii) nöroendokrin olaylar, (iii) nöroinflamasyon, (iv) nörogenez (v) hücresel ve sinaptik plastisiteyi içerir. Bu sistemler oldukça karmaşık olmasına rağmen RA, bu sistemler içindeki birçok mekanizmanın düzenleyicisi ve normal beyin işleyişinde çok önemli olduğu için birleştirici bir faktör gibi görev alabilir. Bu nedenler, RA'i nöropsikiyatrik hastalıklar için son derece önemli bir araştırma hedefi haline getirmektedir ve RA etkilerinin anlaşılması, psikiyatrik bozuklukların patofizyolojilerinin daha iyi anlaşılmasına katkıda bulunabilir.

1.1. Tez Çalışmasının Amacı ve Ana Hatları

Genel araştırma hipotezimiz, retinoik asit seviyelerinin sıçanlarda hipokampus homeostazı üzerinde etkili olduğudur.

Depresyonun yeni anlaşılan karmaşık etiyolojisi sebebiyle, monoamin hipotezinin tek başına depresyon patolojisini açıklaması mümkün gözükmemektedir. Depresyonun patogenezini oluşturan nöronlar ve diğer süreçlerde, özellikle sinapslardaki bir eksikliğin düzeltilmesini içeren bir "antidepresan" etki arayışı vardır. Nöroinflamasyonun nöroplastisite üzerindeki olumsuz etkileri de bilinmektedir. Hayvan modellerinde veya Major Depresif Bozukluk (MDB) hastalarında inflamatuvar durumun incelenmesi önemlidir, çünkü inflamatuvar sitokinlerin depresyonla ilişkilendirilen hücresel yolakları etkileyebildiği gösterilmiştir (Capuron, Ravaud, Neveu, Miller, Maes, & Dantzer, 2002; Miller, 2010; Linthorst, 1994; Shintani ve ark., 1993; Song, & Wang, 2011).

ATRA uygulamasının, kemirgenlerde anksiyete ve depresyon benzeri davranışa neden olduğunu bildiren çok sayıda deneysel çalışma (Cai ve ark., 2010; Hu ve ark., 2013; Hu ve ark., 2016; Cai, Li, & Zhou, 2015) ve klinik veri olmasına (Chia, ve ark., 2005; Efficace ve ark., 2021; Ferahbas, ve ark., 2004) rağmen, retinoik asidin MSS'de özellikle de hipokampustaki yüksek reseptör ekspresyonu nedeniyle, retinoik asidin sinaptik plastisitedeki pozitif düzenleyici rolleri bildirilmektedir. Birkaç hayvan çalışması, spesifik sitoplazmik mRNA'lara bağlı retinoid reseptörlerinin, sinaptik

proteinlerin sentezini, trafiğini ve birikimini düzenleyerek sinaptik plastisiteyi kontrol ettiğini ortaya koymuştur (Aoto, Nam, Poon, Ting, *&* Chen, 2008; Groth, *&* Tsien, 2008; Maghsoodi, Poon, Nam, Aoto, Ting, *&* Chen, 2008; Poon, *&* Chen, 2008). Bu çalışmanın sonuçları, *ATRA*'nın sinaptik plastisiteyi indükleme yeteneğini göstermektedir. Bununla birlikte, *ATRA*'nın sinaptik plastisitedeki modülatör rolleri konusunda yeterli bilgi mevcut değildir.

Başta sitokinler olmak üzere çok sayıda inflamatuvar mediyatörler, inflamasyon sırasında salınır ve sinaptik işlevi etkiler (Vereker 2000; Allan & Rothwell 2001; Dantzer ve ark. 2008; Filippo, Sarchielli, Picconi, & Calabresi, 2008; Trotta, Porro, Calvello, & Panaro, 2014; Yang, & Chen, 2008). Bu faktörlerin nöral işlevi etkilediği mekanizmaların araştırılması zordur, çünkü inflamatuvar sinyal kaskadlarının çeşitli ve aynı zamanda zıt etkileri olabilir (Sriram & O'Callaghan, 2007). Örneğin, TNFα'nın glial hücrelerden bazal salınımının homeostatik sinaptik plastisiteyi etkilemek için gerekli olduğu gösterilmiştir (Becker, Zahn, Deller, & Vlachos, 2013; Beattie 2002; Stellwagen & Malenka 2006; Pribiag, & Stellwagen, 2013; Steinmetz & Turrigiano 2010; Santello & Volterra 2012). Bununla birlikte TNFα'nın beyin dokusu içinde aşırı salınımının ise patojenik etkileri olduğu bilinmektedir (Mehta, Gracias, & Croft, 2018; Wang, Asensio, & Campbell, 2002). Bu nedenle, beyindeki inflamatuvar durumlarda sinaptik plastisitedeki karmaşıklığın değerlendirilmesi için daha fazla belirtece ihtiyaç vardır.

Sitoskeleton modülasyonları ve NMDA reseptörleriyle etkileşimleri nedeniyle, EphA4 ve EphB2'nin dendritik arborizasyon ve hipokampal mossy fibrillerinde ve de CA3-CA1 sinapslarının modülasyonuna dahil olduğu bilinmektedir (Grunwald ve ark., 2001). Nöroinflamatuvar koşullarda beyinde EphA4 ve EphB2 gibi reseptör proteinlerin rolünü bildiren çok az sayıda çalışma vardır ve bu çalışmalar hipokampal alt katmanlarda ilgili reseptörlerin ekspresyon düzeylerine ilgili bilgi içermemektedir (Li, Su, Chen, Nie, Yuan, & Wong, 2022; Wu ve ark., 2019). Beyinde, retinoik asit ve Eph reseptörlerinin MSS patolojilerine katılımı daha önce ilişkilendirilmemiştir. Literatür taramasında tespit edilen bilgi açıklıklarına ve yukarıdaki gerekçelere dayanarak teze dair amaçlarımız ve spesifik hedeflerimiz ile birlikte tez çalışmasının ana hatları şöyledir:

Akut inflamasyonu modellemek amacıyla, tek doz intraperitoneal 5 mg/kg LPS

enjeksiyonu uygulandı. Daha düşük dereceli bir kronik inflamasyonun modellenmesi için, tekrarlanan daha düşük dozlarda LPS uygulamaları, sürekli inflamasyona bağlı depresif benzeri davranışın yeni bir modelini geliştirmek için kullanıldı. Çok sayıda araştırma, nöroinflamatuvar süreçlerin depresyona önemli ölçüde katkıda bulunduğunu göstermektedir (Diniz, Teixeria, Talib, Gattaz, & Forlenza, 2010; Dowlati ve ark., 2010.) Literatürde uzun süreli (4 hafta) düşük dereceli kronik inflamasyonun beyin üzerindeki etkileri hakkında az sayıda veri bulunmaktadır. Ayrıca kullanılan LPS'in suşu ve hayvanların heterojenliği nedeniyle, bu soruyu ele almak ve doğrulamak için kronik inflamasyon 7 günlük LPS enjeksiyonları ile indükledikten sonra, inflamasyonun uzun süreli devamlılığı için 7 günlük aralıklarla ek enjeksiyonlar eklendi.

LPS'in akut ve kronik uzamış etkilerinin *ATRA* uygulaması sonrasındaki fizyolojik sonuçlarını değerlendirmek için, kuyruk süspansiyon testi ve açık alan testindeki davranışsal görevlerde depresif benzeri davranış değerlendirildi. Aynı parametreler, bazal koşullar altında yalnızca *ATRA* uygulanarak da değerlendirildi. Bu hedef, deneysel anlamda oral retinoid terapilerinin depresyon benzeri davranışa katkısını daha iyi aydınlatmak için önemlidir. Çünkü, akne tedavisinde ve kanser terapisinde sıklıkla kullanılan oral retinoidlerin depresyona neden olabileceğini gösteren epidemiyolojik veriler oldukça tartışmalıdır. Kansere bağlı inflamasyon, kanser teşhisi sırasında erken belirtilerden biridir. Bu nedenle depresyon benzeri davranışlar kanser hastalarında erken belirtiler olarak da gelişebilir (Aldea, Craciun, Tomuleasa, *&* Crivii, 2014). Aknenin insanların öz imajı ve öz saygısı üzerindeki psikososyal etkisi, kanser hastalarının yaşadığı yoğun kaygı nöbetleri ve kanser kaynaklı olası nöroinflamasyon nedeniyle, oral retinoid terapilerinin olası yan etkileri ve var olan depresyonu ilerletip ilerletmediği hakkında bilgi eksikliği söz konusudur.

Periferik sistemle karşılaştırıldığında, *ATRA*'in MSS'de antiinflamatuvar rolü büyük ölçüde bilinmemektedir. Periferik sistemde ve MSS deki olası etkilerine dayanarak (Maden 2001), *ATRA*'in sistemik inflamasyon kaynaklı nöroinflamatuvar koşullar altında mikroglial aktivasyonu baskılayabileceği düşünüldü. Hipotezimizi test etmek için kronik ve akut sistemik LPS enjeksiyonları ile nöroinflamasyon indüklendikten sonra *ATRA* uygulandı. Beyindeki inflamatuvar yanıttaki değişiklikleri analiz etmek için mikroglialar incelendi. Tez çalışmamızda beyindeki nöron

fonksiyonunun nitelik ve niceliğinin değerlendirilmesi için krezil viyole boyaması ile genel morfoloji, nöronal sağkalımı değerlendirmek için de hipokampal hücrelerde apoptoz değerlendirildi.

Amaç doğrultusundaki hedeflerimizden bir diğeri ise, LPS'in ve *ATRA*'in hipokampal plastisite üzerindeki etkilerini belirlemekti. Hipokampal nöronların yapısal ve fonksiyonel sinaptik özelliklerindeki LPS ve *ATRA* aracılı değişiklikleri incelemek amacıyla, kemirgen beyninde sinaptik plastisitenin önemli bir düzenleyicisi olan Eph reseptörlerinden EphA4 ve EphB2'nin ekspresyonları, hipokampal histolojik katmanlarda değerlendirildi.

Kısaca, bu doktora tezi ile belirtilen literatür taramaları doğrultusunda saptanan bilgi boşluklarını ele almayı ve temelde sistemik inflamasyon kaynaklı nöroinflamasyonda *ATRA*'in beyinde sinaptik plastisite üzerinde önemli görevleri olan Eph reseptörleri ile ilişkilerinin anlaşılmasına katkıda bulunmak amaçlanmıştır. Ayrıca mevcut iki depresyon hipotezininin (inflamatuvar ve nöroplastisite teorileri) birleştirilmesi, daha entegre bir yaklaşıma ve zaman içinde depresyonun gelişimini ve ilerlemesini destekleyen altta yatan mekanizmaların daha iyi anlaşılmasına olanak sağlayacaktır.

2. GENEL BİLGİLER

Bu tez boyunca sık sık "sistem" terimi kullanılsa da; sistemler, biyolojik işlevi anlamamıza ve kavramsallaştırmamıza yardımcı olan yapılarımızdır. "Organizma" sistemleri bilmez, sadece kendi dengesini -yani homeostazı- bilir. Organizmalar, kendisini hasardan korumak ve iç dengesini stabil tutmak için elindeki biyolojik işlevleri kullanır, örneğin patojenleri elimine etmek için toksik maddeler salgılamak veya davranışı değiştirmek gibi (Hart, 1990). Tüm bu dengeyi korumak için sistemler iç içedir ve karşılıklı iletişim kurarlar. Patojenlerle savaşan immün sistem, aynı zamanda sürekli olarak merkeze rapor verir ve çeşitli tepkilerin oluşumunu sağlar. İmmün sistem hücrelerinin şiddetli yanıtları kontrol edilemezse, homeostaz bozulur ve organizmada çeşitli ve bazen de kalıcı hasarlara neden olur.

2.1. İnflamatuvar Yanıt ve Sistemik İnflamasyon: Nöroinflamasyonun Rolü

2.1.1. İmmun sisteme genel bakış

İmmun sistem, doğuştan gelen ve sonradan kazanılan bağışıklık sistemlerinden oluşur. Doğuştan gelen bağışıklık sistemi savunmanın ilk hattıdır. Fiziksel bariyerlerden (deri ve mukoza), çözünebilir faktörlerden ve lökositlerden oluşur. Lökositler, istilacı patojenleri tespit edip öldürmek ve ölü ve yaşlanmış hücreleri, yabancı maddeleri ve anormal hücreleri tespit edip ortadan kaldırmak için protein, lipit ve karbonhidrat moleküllerinden (iltihap aracıları ve bunların reseptörleri) oluşan karmaşık bir sistem aracılığıyla birlikte çalışır. Bir patojen vücuda girdiğinde, ilk olarak deri veya mukoza ile karşılaşır ve patojen bu sınırı geçerse doğuştan gelen bağışıklık sistemi hücrelerini aktive eder (Newton, & Dixit, 2012). Doğuştan gelen bağışıklık sistemi hücreleri makrofajları, nötrofil granülositleri ve doğal öldürücü hücreleri içerir. Bu hücreler patojeni fagosite ederek ortadan kaldırır. Ayrıca makrofajlar ve dendritik hücreler patojenleri işleyip adaptif bağışıklık sistemine antijen sunarken, doğuştan gelen lenfoid hücreler hem doğuştan gelen hem de adaptif bağışıklık sistemini düzenleyen sinyal molekülleri salgılayarak doku hasarına yanıt verir (Chen ve ark., 2017). Bu, dokuda sitokinlerle güçlendirilmiş bir inflamatuvar yanıta yol açar ve yanıt lökositlerin artışı ve C-Reaktif Proteinin yükselmesiyle ölçülebilir. Kompleman sistemi, lizozimler ve sitokinler gibi doğuştan gelen bağışıklık

sisteminin güçlendirilmesinde ve ayrıca patojenin doğrudan öldürülmesinde rol oynayan çözünebilir faktörler de vardır (Mold, Gewurz, & Du Clos, 1999).

İnflamatuvar mediyatörler, biyokimyasal özelliklerine göre yedi gruba ayrılabilir: vazoaktif aminler, vazoaktif peptitler, kompleman bileşenlerinin parçaları, lipid mediatörler, sitokinler, kemokinler ve proteolitik enzimlerdir (Hestie ve ark., 2018). Sitokinler, eksojen veya endojen bir sinyalle uyarılmaya yanıt olarak bağışıklık hücreleri tarafından üretilen ve salınan sinyal moleküllerdir. Doğuştan gelen bağışıklık sisteminde kritik öneme sahiptirler ve inflamatuvar yanıtı yayarak ya da engelleyerek etki ederler. İnflamasyon ve immün sistem tepkilerinin düzenlenmesinde görev alan sitokinler monositler, lenfositler, nötrofiller, endotel hücreleri gibi çok sayıda farklı hücrelerden sentezlenen ve salgılanan küçük, hormon benzeri glikoproteinlerdir. Yüksek afiniteli hücre yüzey reseptörleri aracılığıyla, esas olarak parakrin ve otokrin bir şekilde picomolar konsantrasyonlarda hareket ederler (Suzuki, Nakaji, Yamada, Totsuka, Sato, & Sugawara, 2002; Suzuki, 2018; Suzuki, 2019). Bugüne kadar yaklaşık 200 farklı sitokin keşfedilmiştir (Ray 2016). Sitokinler çok çeşitli işlevlere sahiptirler; diğer immün sistem hücrelerini çekme ve aktive etme, farklılaşmayı uyarma ve apoptozu inhibe etme veya indükleme gibi işlevlerle hem doğal hem de adaptif bağışıklığın düzenlenmesinde önemli rol oynarlar (Bradley, 2008; Hopkins, 2003; Scheller, Chalaris, Schmidt-Arras, & Rose-John, 2011). Sitokinlerin fizyolojik etkileri arasında hücresel ve humoral immün yanıtın geliştirilmesi, inflamatuvar yanıtın indüklenmesi, hematopoezin düzenlenmesi, hücresel proliferasyonun ve farklılaşmanın kontrolü ve yara iyileşmesi yer almaktadır (Arai, Lee, Miyajima, Miyatake, Arai, & Yokota; 1990).

Bağışıklık sisteminin konağa ait bileşenlerini konakçı olmayan moleküllerden ayırt etmesi önemlidir. Doğuştan gelen bağışıklık sistemi hücreleri, kendinden olan ve olmayan arasında ayrım yapmak için örüntü tanıma reseptörlerini (PRR:s) kullanır. Bu reseptörler, konakta bulunmayan patojenle ilişkili moleküler kalıplar (PAMP:s) yoluyla mikrobiyal patojenleri tanıyabilen proteinlerdir. PRR:ler ayrıca konağın bileşenlerini, hasarlı veya ölü hücreler tarafından salınan hasarla ilişkili moleküler kalıpları (DAMPS) da tanıyabilir (Tang, Kang, Coyne, Zeh, & Lohze, 2012).

2.1.2. İnflamasyon

İnflamasyon, vücudun infeksiyöz veya infeksiyöz olmayan etiyolojilere karşı doğuştan gelen savunma mekanizmasının önemli bir parçasıdır. İnflamatuvar yanıt, sürecinin zamanına bağlı olarak üçe ayrılabilir; indüklenmeden hemen sonra ortaya çıkan ve birkaç gün süren "akut inflamasyon", akut inflamasyon çözülmediğinde aylarca hatta yıllarca sürebilen "kronik inflamasyon" ve akuttan kroniğe geçiş dönemi olarak kabul edilen "subakut inflamasyon" 2 ila 6 hafta arasında sürer (Ferrero-Miliani, Nielsen, Andersen, & Girardin, 2007).

2.1.2.1. İnflamatuvar yanıt ve akut inflamasyon

İnflamatuvar bileşiklerin PRR'ler tarafından tanınması, ana transkripsiyon faktörü nüklear faktör-κB'nin (NF-κB) aktivasyonuna yol açar. NF-κB aktivasyonundan sonra, sitokinlerin transkripsiyonu ve salgılanması artar. Sitokinler daha sonra spesifik hücresel immün yanıtı indüklemek için diğer hücreler üzerinde etkili olur (Lenardo, & Baltimore, 1989). Akut faz yanıtı (AFY), doku enfeksiyonu olduktan hemen sonra başlayan genel vücut savunması çok çeşitli nöroendokrin, fizyolojik ve metabolik değişiklikleri tanımlar (Baumann, & Gauldie, 1994; Gabay, & Kushner, 1999). Monositler ve nötrofiller gibi hücreler büyük ölçüde hasar görmüş, stresli veya enfekte olmuş hücreleri algılar, lokal ve sistemik bir pro-inflamatuvar yanıt ortaya çıkarırlar. Interlökin-6 (IL-6), Interlökin-1 (IL-1), Interlökin-8 (IL-8), Tumor necrosis factör-α (TNF-α) ve Interferon-γ (IFN-γ) gibi pro-inflamatuvar sitokinleri salgılayarak ve çok çeşitli "alarminler"i serbest bırakarak alana daha fazla yardım isterler (Tanaka, Narazaki, & Kishimoto, 2014). Bu tür değişiklikler lokal veya sistemik olarak gerçekleşebilir.

Nötrofiller enfeksiyon, travma ve kimyasal ya da fiziksel saldırıların neden olduğu inflamasyona hızla yanıt verir. C5a, kemokinler (interlökin [IL]-8), sitokinler (tümör nekroz faktörü [TNF]), lökotrienler (örn. LTB4) ve mikrobiyal ürünler dahil olmak üzere kemoatraktanlar tarafından inflamasyon bölgesine yönlendirilen ilk fagositlerdir, bu nedenle akut fazın değerlendirilmesinde kullanılan belireçtir.

AFY ilk olarak doku inflamasyonunu başlatma ve güçlendirmede rol alsa da, nihayetinde inflamasyonu baskılamaya ve çözmeye yardımcı olur. Normalde AFY, indüklendikten sonraki birkaç saat içinde ortaya çıkar ve yanıtın çoğu 24-48 saatlik bir

süre içinde azalma eğilimi gösterir. Sonuç olarak, indükleyicinin şiddetine göre vücudun birkaç gün içinde homeostaza ve normal fonksiyona dönmesi muhtemel olabilir. Ancak, ilk uyaran devam ederse veya normal bir düzenleyici adım bozulursa bu süreç uzayabilir ve kronik bir reaksiyona dönüşebilir (Gabay, & Kushner, 1999; Uhlar, & Whitehead, 1999).

2.1.2.2. Kronik inflamasyon

Genel olarak patolojik bir inflamatuvar durum, özellikle primer suçlular enfeksiyon veya yaralanma olduğunda homeostazı ve doku restorasyonunu amaçlayan mekanizmadır (Medzhitov, 2008). Ancak belirgin bir patolojik durum yokluğunda iyileştirilememiş kronik bir hasar, inflamasyonun endojen olarak kalıcı aktivasyonuna yol açabilir (Chen, & Nunez, 2010; Medzhitov, 2008). Akut inflamatuvar yanıt patojeni ortadan kaldıramazsa, inflamatuvar süreç devam eder ve farklı özellikler kazanır. Lökosit infiltrasyonu, nötrofil yerine makrofajlar ve T hücreleri ile yer değiştirir. Bu hücrelerin kombine etkisi hala yetersizse, granülomların ve üçüncül lenfoid dokuların oluşumunu içeren kronik bir inflamatuvar durum ortaya çıkabilir (Drayton, Liao, Mounzer & Ruddle, 2006; Kumar, 2003).

Kan damarlarının genişlemesi (vazodilatasyon), kan akışında artış, kapiller geçirgenlik ve nötrofillerin kapiller duvarından enfekte dokuya göçü (diapedez) gibi akut inflamasyonda gelişen spesifik olaylar, inflamasyon kronik hale geldikçe devam eder. Ancak kısa sürede lökositlerin tipi değişerek kısa ömürlü olan nötrofillerin yerini makrofajlar ve lenfositler almaya başlar. Bu nedenle kronik inflamasyonun ayırt edici özellikleri; bölgedeki makrofajlar, lenfositler ve plazma hücreleri gibi birincil inflamatuvar hücrelerin infiltrasyonudur. Bu hücreler inflamatuvar sitokinleri, büyüme faktörlerini ve diğer inflamatuvar faktörleri üretir. Dolayısıyla doku hasarının ilerlemesine, fibröz ve granülom oluşumu vb. dahil olmak üzere sekonder onarıma katkıda bulunurlar (Cutolo, Soldano, & Smith, 2019; Milenkovic, Stanton, Nothdurfter, Rupprecht, & Wetzel, 2019; Needham ve ark., 2019; Yousuf, Ibrahim, Greening, & Brightling, 2019).

Akut inflamasyon ile kronik düşük dereceli inflamasyon arasındaki temel fark; akut inflamasyondaki tetikleyicilerin hem PAMP'leri hem de DAMP'leri içermesi, yanıtın büyüklüğünün genellikle yüksek dereceli olması, sürenin kısa olması,

inflamasyon tetikleyicinin ortadan kaldırılması ve doku onarımı olmasıdır. Bunun aksine, daha düşük dereceli kronik inflamasyonda başlatıcı genellikle DAMP'lerdir ve yanıtın büyüklüğü düşük derecelidir, kollateral hasarla çözülmez ve yaşla ilişkisi vardır (Furman ve ark., 2019).

Kronik inflamasyon romatizmal hastalıklar, inflamatuvar bağırsak hastalıkları (IBD), sedef hastalığı ve alerjik astım gibi birçok inflamatuvar hastalıkta ve aynı zamanda diğer birçok bozuklukta merkezi bir rol oynamaktadır. Düşük dereceli olsa bile kronik sistemik inflamasyonun zararlı bir süreç olduğuna, nörodejeneratif ve kardiyovasküler hastalıklar gibi birçok kronik hastalık için bir risk faktörü olduğuna dair artan kanıtlar bulunmaktadır (Ferrucci, & Fabbri, 2018; Milenkovic ve ark., 2019; Pahwa, Goyal, & Jialal, 2023).

2.1.3. Lipopolissakkarit

Lipopolisakkarit terimi ilk olarak endotoksinlerin karbonhidrat ve lipid içeriklerinin tanımlanmasıyla ortaya çıkmıştır. Endotoksin olarak da bilinen lipopolisakkarit, immün tepkiyi ortaya çıkaran Gram-negatif bakterilerin dış zarının önemli bir bileşenidir (Raetz, & Whitfield, 2002). Çeşitli Gram-negatif bakteriler üzerine yapılan çalışmalar, LPS'in ortak bir genel yapısını göstermektedir. LPS'in temel yapısı 3 ayrı bölgeyi içerir: "Lipid A", molekülün yüksek oranda hidrofobik ve aktif kısmıdır. Lipid A'ya kovalent olarak bağlı olan, molekülün kendi içinde iç ve dış çekirdeğe ayrılan bölgesi, "Çekirdek" bölümüdür. İç çekirdek lipit A'ya proksimaldir, 3-deoksi-D-manno-octulosonic asit (Kdo) ve L-glycero-D-manno heptose (Hep) gibi yüksek oranda şeker içerir. Dış çekirdek bakteri yüzeyinden daha distaldedir, heksozlar ve hekzozaminler gibi şekerlerden oluşmaktadır. Dış çekirdeğe, tipik olarak ortak heksozlardan oluşan "O-polisakkarit" veya O-antijen bağlanır. "O-polisakkarit" yapısı ve bileşimi LPS serotipini belirler (Rietschel ve ark., 1994), ancak toksisiteyi veren ve Toll Like Reseptör 4 (TLR4) tarafından tanınan bölgesi, "Lipit A" kısmıdır (Buetler 2000).

LPS'i tanıyan reseptörlerin bağırsak epitel hücrelerinde de bulunduğu gösterilmiş ve bu reseptörler, bağırsaktaki luminal LPS'in dolaşıma geçirgenliği ile ilişkilendirilmiştir (Hornef, Normark, Vandewalle, & Normark, 2003; Neal ve ark., 2006). LPS sistemik dolaşıma girdikten sonra makrofajlar, karaciğerde bulunan

Kupffer hücreleri ve dalaktaki bağışıklık hücreleri tarafından veya plazma proteinlerine bağlanarak etkisiz hale getirilebilir veya detoksifiye edilebilir (Buttenschoen, Radermacher, & Bracht 2010; Rutenburg, Skarnes, Palmkrio, & Fine., 1967; Satoh, Ando, Shinoda, & Yamazaki., 2008). Bununla birlikte, LPS'in bağırsak kanalından daha fazla geçirgenliğe sahip olması nedeniyle sistemik tespit ve deaktivasyonun başarısız olması durumunda, dolaşımdaki LPS'in artması, ilerleyen düşük dereceli bir sistemik inflamasyona neden olabilir (Rice ve ark., 2003; Zweifach, & Janoff, 1965).

2.1.3.1. Lipopolissakkarit ile ilişkili inflamatuvar yanıt

İnflamasyonu ve fizyolojik etkilerini inceleyen çalışmalarda inflamatuvar bir yanıtı indükleyebilen çok sayıda antijen kullanılmaktadır. Bununla birlikte en yaygın kullanılan ve en iyi karakterize edilen inflamatuvar indükleyici bileşiklerden biri lipopolisakkarittir (Ngkelo, Meja, Yeadon, Adcock, & Kirkham, 2012). LPS, inflamatuvar yanıtın güçlü bir aktivatörüdür ve Gram-negatif bakterilerde çok önemli bir patojenle ilişkili moleküler paterndir (PAMP'ler), sonuç olarak bakteriyel bir enfeksiyon nedeniyle kanda bulunan küçük miktarlarda LPS, *Toll like* reseptörler (TLR'ler) ile etkileşim yoluyla inflamatuvar bir yanıt ortaya çıkarmak için yeterlidir (Ngkelo ve ark., 2012). Dolaşımdaki az miktarda LPS, bağışıklık sistemini uyararak bir enfeksiyonun aktivasyonuna neden olabilirken, kandaki yüksek miktarda LPS septik şok sendromlarını tetikleyebilir.

Lipid A ve polisakkarit bölgeleri, güçlü bağışıklık tepkilerini indükleyebilir (Rietschel ve ark., 1994). Memelilerde lipopolisakkarit, TLR4 ve LPS-bağlayıcı protein (LBP), farklılaşma kümesi 14 (CD14) ve MD-2 gibi diğer proteinleri bulunduran çeşitli hücreler tarafından tanınır. TLR4-aracılı sinyalde, hücresel aktivasyonu başlatmak ve sürdürmek için TIRAP-MyD88 ve TRAM-TRIF gibi çoklu adaptör molekülleri kullanır (Lu, Yeh, & Ohashi, 2008). Geleneksel olarak, MyD88'e bağlı sinyal yolu NF-κB ve pro-inflamatuvar mediatörlerin aktivasyonu ile ilişkiliyken, TRAM/TRIF yolu interferon üretimi ile ilişkilidir (Kagan, Su, Horng, Chow, Akira, & Medzhitov, 2008).

LPS uzun zamandır septik şokta indükleyici bir faktör olarak kabul edilmektedir, ancak daha yakın zamanda kronik düşük dereceli inflamasyonun altında yatan potansiyel bir neden olarak tanımlanmıştır. Düşük dereceli kronik inflamasyonun oluşmasında, bağırsakta bulunan Gram-negatif bakterilerden gelen LPS dolaşıma girebilir ve pro-inflamatuvar sitokinlerin up-regülasyonuna neden olarak bağışıklık tepkisine neden olabilir (Ghosh, Wang, Yannie, & Gosh, 2020). LPS'in sistemik dolaşımdaki az miktarları, düşük dereceli kronik inflamasyona neden olabileceği, bunun da sıkı bağlantıların bozulmasına ve dolayısıyla bariyer hasarına yol açabileceği bilinmektedir. Bu durum, düşük dereceli inflamasyonun nasıl yayılabileceğine ve sistemik inflamasyonu başlatabileceğine dair bir hipotezdir (Ronnback, & Hansson, 2019).

2.2. Nöroinflamasyon

Beyin dokusunda kan beyin bariyeri (KBB)'nin olması ve lenfatik drenajının olmaması nedeniyle patojenik ajanların ve bağışıklık hücrelerinin girişine karşı korunduğu varsayılmaktadır (Cserr, Harling-Berg, & Knopf, 1992; Louveau, Harris, & Kipnis, 2015). Periferik bağışıklık etkileri açısından "kanunsuz bir bölge" olarak beynin savunmasını desteklemek için kendine özgü hücresel oyuncuları vardır: Miyelinli nöronların aksonlarına destek ve yalıtım sağlayan *oligodendrositler*, hasarlı beyin dokusunu ve patojenik ajanları temizleyerek beyinde yerleşik doğuştan gelen bağışıklık yanıtı hücreleri olarak görev yapan *mikroglial hücreler* ve hem KBB'nin perisitleri hem de nöronların sinapsları ile yakından ilişkili olan, hücre dışı glutamat seviyelerinin düzenlenmesinde ve beyin mikro sirkülasyonunun dinamik kontrolünde önemli bir role sahip olan *astrositler*dir (Engelhardt, Vajkoczy, & Weller, 2017). Bununla birlikte, B ve T lenfositler ve mast hücreleri gibi adaptif bağışıklık hücrelerinin ise beyin zarları ve Beyin-Omurilik Sıvısı (BOS) tarafından sınırlandırıldığı bilinmektedir. Ancak kemoatraktan ve yapışma moleküllerine bağlı olarak bu hücreler, perivasküler alanda ekstravazasyona neden olacak patolojik koşullarda beyin dokusuna sızabilmektedir (Congdon, Sanchez-Perez, & Sampson, 2019).

MSS homeostazı sağlamak için periferik inflamatuvar sinyalleri beyin vaskülatüründeki özel hücreler, koroid pleksus ve sirkümventriküler organlardaki

TLR'ler ve sitokin reseptörleriyle algılar. Periferik immün cevap bağlamında, nöroinflamatuvar sitokinlerin çoğalmasının bir sonucu olarak nörovasküler ünitenin ve yerleşik gliaların koordineli bir yanıtı olarak (Henry ve ark., 2009; Norden ve ark., 2014; Serrats ve ark., 2010) ateş, hipofaji, uyuşukluk, halsizlik, azalmış aktivite ve azalmış sosyal etkileşim gibi hastalık tepkisinin fizyolojik ve davranışsal tepkileri oluşur (Dantzer ve ark., 2008). Evrimsel olarak kazanılmış bu davranış değişiklikleri sayesinde enfeksiyonla savaşmak için sistemdeki kaynaklar korunur (Berg ve ark., 2004; Bluthe, Laye, Michaud, Combe, Dantzer, & Parnet, 2000). Bu yanıttaki bozulmaların morbidite ve mortalite üzerinde olumsuz etkisi vardır (Corona ve ark., 2013). Bu yüzden, yanıt uygun şekilde kontrol edildiğinde ve çözüldüğünde konakçı organizmaya faydalıdır. Ancak uzamış immün yanıt zararlı olabilir.

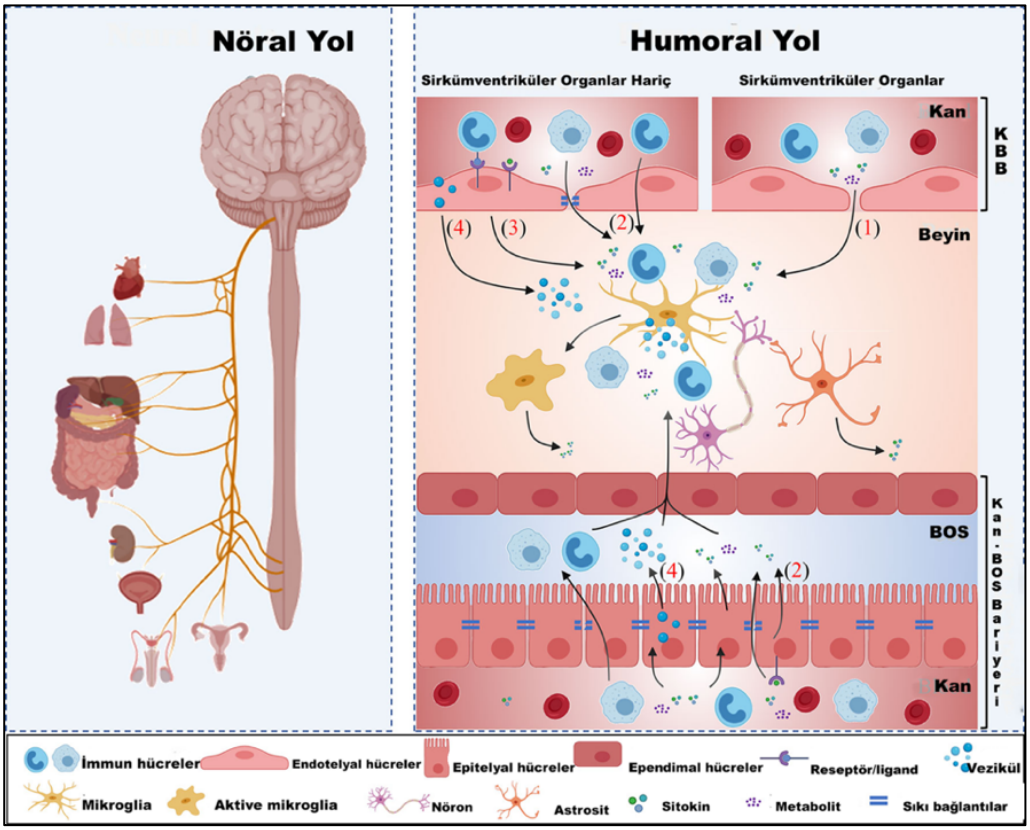
2.2.1. Periferik immün yanıtın beyne iletilmesi

Periferdeki bir inflamatuvar olayın, torasik-abdominal boşluktan gelen sitokinler veya prostaglandinler gibi periferik sinyallerin beyne ulaşmasını teorize eden iki yol vardır: Nöronal ve humoral yollar (Şekil 1).

Nöronal yol, patojenin intraperitoneal enjeksiyonunu takiben abdominal organların vagal afferentleri gibi enfeksiyon bölgesini innerve eden afferent duyusal nöronlar yoluyla doğrudan beyne iletilmesini teorize eder. Araştırmalar, *intraperitoneal* LPS enjeksiyonundan kaynaklanan periferdeki sitokinlerin, vagal sinir içindeki mikroglialar tarafından tanındığını göstermiştir (Goehler, Gaykema, & Nguyen, 1999). Vagal sinirin dalları içinde TLR ve IL eksprese eden mikrogliaların aktivasyonu sitokinler, prostaglandinler (PGE) ve siklo-oksijenaz gibi faktörlerin up-regülasyonuna yol açar (Zhao ve ark., 2019). Bu faktörler vagal sinirdeki nöronlarla etkileşime girerek talamik bölgelere iletilen inflamatuvar sinyali indükler (Kennedy, & Silver, 2015; Wang, & Wang, 2016). Bu afferentlerin aktivasyonu, preoptik hipotalamus gibi hastalık davranışlarında rol oynayan alt beyin bölgelerinin aktivasyonuna yol açar (Blomqvist, & Engblom, 2018).

Beyin-immün yanıt iletişiminin bir diğer yolu olan humoral yol, birbiriyle ilişkili birkaç mekanizma aracılığıyla dolaylı olarak etki eder. Periferik dolaşımdaki pro-inflamatuvar moleküller, sirkümventriküler organlardaki mikroglialar, beyin kan damarlarının endotel duvarları ve kan-beyin bariyeri tarafından algılanır (Rivest,

Lacroix, Vallieres, Nadeau, Zhang, & Laflamme, 2000). Bunun sonucunda primer olarak, mikroglia ve endotel hücreleri tarafından sitokinlerin ve interlökin faktörleri, PGE ve Nitrik oksit (NO) gibi moleküler ürünlerin üretilmesi tetiklenir (Romanovsky, 2000).



Şekil 1. Periferden beyne iletişim yolları. Periferik organlar, vagus siniri (nöral yol) aracılığıyla çeşitli serebral bölgelere sinyaller yansıtır (Sol taraf). Ayrıca, perifer tarafından beyinle iletişim kurmak için farklı hümoral yollar kullanılır (Sağ taraf): (1) Dolaşımdaki bağışıklık aracıları beyne sirkumventriküler organlar yoluyla ulaşır; (2) Periferik bağışıklık hücreleri sitokinleri ve metabolitleri serebral endotel hücreleri ve koroid pleksus epitel hücreleri üzerindeki taşıyıcılarıyla etkileşime girer ve daha sonra beyne girer; (3) Periferden beyne iletişim, periferik sinyaller ve beyin hücreleri arasındaki hücre aracılı etkileşimler yoluyla gerçekleşebilir ve bu da mikroglial aktivasyona ve nöroinflamasyona yol açar. (4) Periferik bağışıklık aracıları koroid pleksus epitel hücrelerini aktive eder ve ekstrasellüler veziküllerin salınmasına neden olur. Veziküller beyne girer ve mikroglia tarafından fagosite edilerek proinflamatuvar yanıtı tetikleyebilir. KBB, kan-beyin bariyeri; BOS, beyin omurilik sıvısı. Orijinal çizim Türkçeleştirilmiştir (Xie ve ark., 2022).

2.2.2. Merkezi sinir sistemindeki lokal immün yanıtlar

MSS'nin kendi alanı içinde immünolojik olarak bulunan inflamatuvar hücreleri astrositler ve mikroglialardır. MSS'de en yoğun bulunan hücre tipi (nöronlardan daha fazla) astrositlerdir, mikroglialar tüm hücrelerin yaklaşık %10'unu oluşturur (Vaughan, & Peters, 1974). Her iki hücre tipi de inflamatuvar sinyallere hızla tepki verir ve MSS içindeki inflamatuvar molekülleri salgılarlar.

2.2.2.1.Astrosit

Astrositler, homeostazı sürdüren ve MSS savunmasını sağlayan, nöroepitelden köken almış öncül hücre olan radyal glialardan köken alan nöral hücrelerdir, astroglia olarak da bilinirler. Astrositler en bol glial hücre türüdür. Sağlıklı beyinde hücre dışı alanlarda optimal iyon ve nörotransmitter konsantrasyonlarını korumak, nöronal gelişimde, sinaps oluşumunda ve nöronal metabolizmanın düzenlenmesi gibi çok sayıda önemli işlevleri düzenler (Verkhratsky, *&* Nedergaard, 2018). Ancak bazı durumlarda astrositler, nörotrofik işlevlerinin çoğunu kaybettikleri ve bunun yerine beyin inflamasyonunu artırmak için sitokinler, kemokinler ve büyüme faktörleri salgıladıkları reaktif bir dönüşüm geçirerek beyin hasarına doğrudan katkıda bulunabilirler (Giovannoni, *&* Quintana, 2020; Liddelow ve ark., 2017; Liddelow, *&* Barres, 2017). Örneğin, altta yatan çeşitli etiyoloji ve mekanizmalara sahip önemli bir küresel sorun olan depresyonda, astrositlerin gözlemlenen davranış değişikliklerine doğrudan katkıda bulunduğu öne sürülmüştür ve özellikle hayvan çalışmaları, astrosit kaynaklı abartılı beyin inflamasyonunun depresyon benzeri davranışlara yol açabileceğini göstermiştir (Dantzer, O'Connor, Freund, Johnson *&* Kelley, 2008; Leng ve ark., 2018; Yirmiya ve ark., 2000). Astrositleri nöroinflamasyona dahil eden çalışmalar olmasına rağmen, astrosit reaktivitesini ve astros-aracılı beyin inflamasyonunu kontrol eden moleküler mekanizmalar ve hücresel sinyal kaskadları henüz tam olarak anlaşılamamıştır.

2.2.2.2. Mikroglia

Mikroglia, MSS'de bulunan makrofajlar gibi yerel bağışıklık hücreleridir. Kemik iliğinden köken alan ve patolojik durumlarda beyne sızabilen makrofaj/monositlerin aksine, mikroglia embriyonik vitellus kesesindeki erken eritro-miyeloid öncüllerden ortaya çıkar ve kan beyin bariyeri oluşmadan önce beyin mezenkimine göç ederler (Ginhoux, & Prinz, 2015; Gomez Perdiguero ve ark., 2015; Walker, Nilsson, & Jones, 2013). Beyne sızan periferik makrofajlar ise, hematopoetik kök hücrelerden kaynaklanan ve kemik iliğinde olgunlaşan monositlerdir (Gomes-Leal, 2019). Mikroglia, MSS mikroçevresini sürekli olarak araştıran sentinel hücreler olarak hareket eder (Nimmerjahn, Kirchoff, *&* Helmchen, 2005). Fizyolojik

koşullarda, mikroglial hücreler dallanmış bir fenotip gösterir ve immünolojik olarak inaktiftir. Hücresel gelişimlerinin erken döneminde uzantıları yoktur, ancak hücreler olgunlaştıkça morfolojik fenotipleri değişir. Küçük bir soma ve çok sayıda ince dallanmalar ile karakterize olurlar (Butovsky ve ark., 2014; Erblich, Zhu, Etgen, Dobrenis, & Pollard, 2011; Kierdorf ve ark., 2013; Smith, Piasecki, Weera, Olszewicz, & Lonstein, 2013). Ancak çeşitli tetikleyiciler aracılığıyla "aktive" edildiklerinde, amoeboid bir morfolojiye bürünür ve antijen sunan, fagositik ve sitotoksik hücreler olarak hareket ederler. Sağlıklı bir beyinde mikroglia homeostatik işlevleri yerine getirir; sinaps oluşumunu ve eliminasyonunu şekillendirmede ve hasar veya anormallik göstergeleri için çevredeki alanları araştırmak için beyin parankimi boyunca eşit olarak dağılmışlardır (Augusto-Oliveira ve ark., 2019). Ayrıca fagositik mikroglial hücreler, sinaptik budama ve nörogeneze katkıda bulunarak MSS gelişiminde ve fizyolojisinde de önemli bir rol oynarlar (Graeber, Li, & Rodriguez, 2011).

Mikroglial hücreler fenotipik ve fonksiyonel olarak M1 veya M2 olarak sınıflandırılmıştır. M1 mikroglia, proinflamatuvar olarak kabul edilir. TNF-α, IL-1β, süperoksit, NO ve reaktif oksijen türleri (ROS) gibi çok sayıda proinflamatuvar sitokinleri salgılamak üzere inflamasyon bölgesinde bulunurlar. M1 fenotipi nörodejeneratif hastalıklarla da ilişkililendirilmektedir (Tang, & Weidong, 2016). Bununla birlikte M2 mikroglia "alternatif aktivasyon" veya "kazanılmış aktivasyon" olarak sınıflandırılır (Colton, & Wilcock, 2010). Alternatif aktivasyon fenotipi, anti-inflamatuvar süreçler ile doku onarımını teşvik eder ve IL-4 tarafından tetiklenir (Ponomarev, Maresz, Tan, & Dittel, 2007). Kazanılmış aktivasyon da inflamasyonu hafifletmeyi amaçlar. IL-10 ile indüklenir ve apoptotik hücrelerin fagositozunu sağlar (Sawada, Suzumura, Hosoya, Marunouchi, & Nagatsu, 1999). Mikroglia, makrofajların küçültülmüş bir versiyonudur; makrofajlar periferde agresif ve çok çeşitli bir inflamatuvar içerikleri ile oldukça reaktif hücreler iken, mikroglia daha az agresif bir reaksiyon modeline sahiptir ve beynin inflamatuvar süreçlere yoğun duyarlılığı nedeniyle sitokinleri çok daha düşük konsantrasyonlarda eksprese ederler (Ferro, Auguste, & Cheadle, 2021).

Enfeksiyon, beyin travması, felç ve nörodejenerasyon gibi hasar durumlarında bu hücreler çeşitli tetikleyiciler tarafından indüklenebilir. Birçok sitokin, kemokin ve

diğer bağışıklık aracıları yanıt olarak üretilir ve salınır (Lawson, Perry, & Gordon, 1992; Perry, & Holmes, 2014). Mikroglia, nöronal hasar durumunda iyileşme sürecini hızlandırmak için spesifik anti-inflamatuvar ve nörotrofik maddeler üretebilir (Liao, Bu, Wang, Ahmed, & Xiao, 2005). Ancak, bu avantajlı durum ile dokuya zarar veren mikroglial etkileşim sinerjisi zarar gördüğünde, bu hücreler patolojik hale gelebilir ve sorun daha da kötüleşebilir (Block, & Hong, 2007).

2.2.3. MSS'de inflamatuvar sitokinler

Çeşitli sitokinler ve reseptörleri normal insan beyninde yapısal olarak, genellikle astrositler ve mikroglialar tarafından eksprese edilir ve salgılanır. Kemirgenlerde IL-1, IL-2, IL-6 ve TNF-α reseptörlerinin maksimum yoğunlukları hipokampus ve hipotalamusta saptanmıştır (Vitkovic, Bockaert & Jacque, 2001). Yaşa göre çeşitli sitokinlerin seviyeleri MSS'de artabilir, bu da yaşa bağlı nörodejeneratif yanıt riskinin artmasına neden olabilir (Sheng, Mrak, & Griffin, 1998).

2.2.3.1. İnterlökinler

İnterlökinler (IL'ler), hücre ve dokularda immün yanıtları ortaya çıkaran bir grup immünomodülatör sitokindir. IL'lerin çoğunluğu makrofajlar, monositler, T-lenfositler ve endotel hücreleri tarafından salgılanır. Lökosit fonksiyonu üzerindeki etkilerine göre pro-inflamatuvar ya da anti-inflamatuvar olarak sınıflandırılırlar. Pro-inflamatuvar IL'ler inflamatuvar reaksiyonların up-regülasyonunda rol oynar ve öncelikle makrofajlar tarafından üretilirler. Anti-inflamatuvar IL'ler ise pro-inflamatuvar yanıtların dengelenmesinde rol oynarlar. Beyinde glial hücreler ve nöronlar IL'leri sentezler. En çok çalışılan interlökinler IL-6, IL-1β ve IL-10'dur (Akdis ve ark., 2011).

2.2.3.1.1. İnterlökin-6

İnterlökin-6 (IL-6), nöronal hasara yanıt olarak üretilen güçlü bir pro-inflamatuvar sitokindir ve yüksek konsantrasyonlarda nörodejeneratif hastalıklarda rol oynar (Dionisio-Santos, Olschowka, & O'Banion, 2019). Mikrobiyal uyaranlara yanıt olarak makrofajlar tarafından salgılanır. Akut faz yanıtı sırasında nöroinflamasyona aracılık ettiği bilinmektedir. Aslında IL-6, MSS içinde nöroprotektiftir; ancak yüksek

seviyeleri pro-inflamatuvar ve nörotoksik olabilir. IL-6'nın ekspresyonu inflamasyonun başlangıcında ve klasik ya da trans IL-6 sinyal yolu üzerinden gerçekleşen sinyalizasyon ile artar (Erta, Quintana, & Hidalgo, 2012).

IL-6 reseptörü, klasik IL-6 sinyalizasyonuna aracılık eder. IL-6 reseptörü, daha sonra hücresel membrana bağlı gp130 ile ilişkilendirilir. IL-6'nın pro-inflamatuvar yanıtı, çözünür IL-6 reseptörüne bağlanan ve daha sonra gp130'a bağlanan IL-6'nın aracılık ettiği trans-sinyalizasyon ile ilişkilidir. Çalışmalarla hem glial hem de nöronal hücrelerde IL-6 ve IL-6 reseptörleri tanımlanmıştır. Bakteriyel endotoksin LPS ile uyarılmanın ardından, BV2 mikrogliada IL-6 salgılanması meydana gelmektedir (Garner, Amin, Johnson, Scarlett, & Burton, 2018).

2.2.3.1.2. İnterlökin-1β

İnterlökin-1 beta (IL-1β), interlökin-1'in bir parçası olan indüklenebilir pro-inflamatuvar bir sitokindir. IL-1 ailesinin bir üyesidir, genel immün yanıtta ve nöroinflamatuvar yanıtlarda rol oynar. IL-1β, mikroglia ve nöronlar dahil olmak üzere beyin hücrelerinde eksprese edilir (Mendiola, & Cardona, 2018). İnterlökin-1 reseptör tip 1 (IL-1R1) aracılığıyla sinyal başlatarak nöroinflamatuvar süreçlerde proinflamatuvar yanıt üretir (Mendiola, & Cardona, 2018). LPS uygulamasını takiben beyindeki hücrelerde IL-1β salgılanmasında önemli bir artış olduğu gösterilmiştir (Sheppard, Coleman, & Durrant, 2019).

2.2.3.1.3. İnterlökin-10

İnterlökin-10 (IL-10) immün sistem hücreleri tarafından üretilir ve inflamasyona karşı anti-inflamatuvar, inhibe edici ve düzenleyici bir etkiye sahiptir. Nöroinflamasyon sırasında immün yanıtta önemli bir rol oynayan anti-inflamatuvar bir sitokindir (Porro, Cianciulli, & Panaro, 2020). Patojenlere karşı bir bağışıklık tepkisinin düzenlenmesinde rol oynayan ve böylece nöronal hasarı önleyen bir immünoregülatör sinyal molekülüdür (Ip, Hoshi, Shouval, Snapper, & Medzhitov, 2017). TLR-4 aktivasyonu yoluyla mikroglialardan sentezlendiği ve pro-inflamatuvar sitokinlerin üretimini azalttığı gösterilmiştir. Hem hücresel hem de humoral düzeyde immünsupresif etkiler ortaya çıkarır ve zarar verici bir inflamatuvar yanıt sırasında, mikrogliaların hasar bölgesinde aktivasyonunu engeller (Steen, Wang, Balaji, Butte,

Bollyky, & Keswani, 2020). IL-10 üretimindeki bir eksiklik, aşırı inflamasyona ve kronik enfeksiyona yol açabilir (Iyer & Cheng, 2012).

2.2.3.2. TNF-α

Tümör nekroz faktörü-alfa (TNF-α), bağışıklık sistemi içindeki inflamatuvar sürece aracılık eden pro-inflamatuvar bir sitokindir ve inflamasyona karşı konak tepkisinin önemli bir düzenleyicisidir (Hop ve ark. 2017; Lima, Lima, Piuvezam, Azevedo, Maciel, & Morais, 2019). Çeşitli hücre tipleri TNF-α üretir, ancak makrofajlar TNF-α üreten birincil monositik soy hücreleridir (Lima ve ark., 2019). TNFR1 reseptörünün aktivasyonu, NF-kB, p38 MAPK, JNK ve ERK gibi çeşitli intrinsik yolakları başlatan pro-inflamatuvar bir yanıt üretir. Bunun aksine, TNFR2 reseptörünün aktivasyonu, anti-inflamatuvar yanıt üretir ve hücre büyümesini destekler (Hop ve ark., 2017).

Beyinde inflamatuvar yanıt sırasında, mikroglia TNF-α salgılayarak ek pro-inflamatuvar sitokinlerin üretimini başlatır. Hiperaktive olmuş mikrogliaların, beyin için zararlı olan aşırı miktarda TNF-α salgıladığı ve bu sitokinin yüksek seviyelerinin nörodejeneratif hastalıklarla ilişkili olduğu bildirilmiştir (Olmos, & Lladó, 2014). TNF-α sinyali, TNFR1 ve TNFR2 transmembran reseptörlerinin bağlanması yoluyla gerçekleşir ve her ikisi de işlevleri ve bağlanma afiniteleri bakımından farklıdır (Page, Bester & Pretorius, 2018). Çalışmalar, TNF-α'nın nörotoksik etkisini ortaya koymuştur. TNF-α'nın glutamat nörotoksisitesine neden olarak, glutamat alımını doğrudan önlediği gösterilmiştir (Zou, & Crews, 2005). TNF-α'nın beyin hasarı üzerindeki etkileri, çözünür TNF-α reseptörleri, antisens blokerleri veya kemirgenlerde travmatik ve iskemik beyin hasarının azalmasına neden olan nötralize edici antikorlarla tedavi yoluyla endojen TNF-α'nın akut olarak inhibe edilmesiyle daha iyi anlaşılmıştır (Zou, & Crews, 2005).

2.2.4. Nöroinflamasyonun sonuçları

Nöroinflamasyon, beyin veya omurilik içinde inflamatuvar bir yanıt olarak tanımlanır. Bu inflamasyona sitokinler, kemokinler, reaktif oksijen türleri ve ikincil habercilerin üretimi aracılık eder. Bu aracılar, yerleşik MSS glial hücreleri (mikroglia ve astrositler), endotel hücreleri ve periferik olarak türetilmiş bağışıklık hücreleri

tarafından üretilir. Nöroinflamatuvar yanıtların immün, fizyolojik, biyokimyasal ve psikolojik sonuçları vardır. Dahası, nöroinflamasyonun derecesi birincil uyaranın bağlamına, süresine ve seyrine bağlıdır. Örneğin, inflamasyon bağışıklık hücrelerinin toplanmasına, ödeme, doku hasarına ve potansiyel olarak hücre ölümüne yol açabilir (DiSabato, Quan, & Godbout, 2016). Nöroinflamatuvar tepkilere birkaç önemli pro-inflamatuvar sitokin (IL-1β, IL-6 ve TNFα), kemokinler (CCL2, CCL5, CXCL1), ikincil haberciler (NO ve prostaglandinler) ve reaktif oksijen türleri (ROS) aracılık eder. Bu aracıların çoğu, mikroglia ve astrositler dahil olmak üzere aktive olmuş yerleşik MSS hücreleri tarafından üretilir (Norden, Trojanowski, Villanueva, Navarro, & Godbout, 2016). Ayrıca, endotel hücreleri ve perivasküler makrofajlar (Dunn, Swiergiel, Zhang, & Quan, 2006) da bu inflamatuvar sinyallerin MSS içinde yorumlanması ve yayılmasında önemlidir. Bu tanımın genişliğini gösteren, erken beyin gelişiminde aktif mikroglia ve sitokin üretimine dair kanıtlar vardır (Salter & Beggs, 2014). Dahası, aktif mikroglia MSS içinde destek, sinaptik budama ve immünolojik faaliyetler sağlar (Schafer, & Stevens, 2013). T-hücreleri ve yerleşik MSS hücreleri arasında gelişmiş nöroinflamatuvar sinyalizasyon da normal hafıza ve öğrenmede rol oynamaktadır (Derecki ve ark., 2010, Ziv ve ark., 2006). Bu örnekler, hücresel biyokimyayı, fizyolojiyi ve gelişimi etkilemek için diğer hücreler üzerinde bir dereceye kadar etkili olan nöroinflamatuvar sitokin üretimini ifade etmektedir.

2.2.4.1. Nörodejenerasyon ve nöronal apoptoz

Uzamış ve/veya şiddetli nöroinflamasyon nörodejenerasyona ve devamında nöron ölümüne neden olan yıkıcı bir tepkidir. Beyinde, nöronal ölüm genellikle iki ana hakaret türünü takiben gözlenir. İlk tip; anoksi/iskemi, travma veya şiddetli epilepsinin neden olduğu akut yaralanma sırasında aşırı glutamat salınımından kaynaklanır. İkinci tip; bakteriyel menenjit, viral meningoensefalit, parazit invazyonu gibi bulaşıcı hastalıklara bağlı inflamatuvar süreçlerle (Däubener ve ark., 1996; Lucas, Lou, Juillard, Moore, Bluethmann, & Grau, 1997) veya amiloid-β gibi anormal protein birikimi (Kordek, Nerurkar, Liberski, Isaacson, Yanagihara, & Gajdusek, 1996) ilişkilidir. Çeşitli sitokinlerin, özellikle de pro-inflamatuvar olanların, tüm bu patolojik olaylar sırasında sentezlendiği ve salındığı bilinmektedir. Benzer sonuçlar, bakteriyel menenjitin hayvan modellerinde veya subaraknoidal boşlukta doğrudan

lipopolisakkarit (LPS) veya diğer bakteriyel bileşenlerin enjeksiyonunu takiben elde edilmiştir. Herpes ensefalit ve HTLV-1 olan hastaların beyin omurilik sıvısında interferon gama (IFN-γ) saptanmıştır. TNF-α ve IFN-γ dahil olmak üzere çeşitli sitokinler için mRNA'lar, virüs bulaşmış farelerin beyninde yukarı düzenlenirken, bu sitokinler HIV hastalığından ölen hastaların beyninde immünohistokimyasal olarak tespit edilmiştir (Sippy, Hofman, Wallach, & Hinton, 1995; Wesselingh ve ark. 1993; Wesselingh, Takahashi, Glass, McArthur, Griffin, & Griffin, 1997).

Genellikle ölen/öldürülen hücreler karışık sinyal tipleri gösterir ve farklı hücre ölümü modellerine göre sınıflanlandırılması zorlaşır. Terminal transferaz dUTP nick-end etiketleme (TUNEL metodu) beyin dokusunda apoptozun bir belirteci olarak kullanılır (Grasl-Kraupp, Ruttkay-Nedecky, Koudelka, Bukowska, Bursch, & Schulte-Hermann, 1995).

2.2.4.2.Hastalık davranışı

Patojenlerle savaşmak enerji tüketen bir aktivitedir ve başarılı bir immünolojik koruma hayatta kalmak için çok önemlidir. Bu nedenle evrimsel olarak memeliler bağışıklık sisteminin bileşenleri tarafından sağlanan kimyasal ve hücresel cevabı desteklemek ve güçlendirmek için davranışsal değişiklik geliştirmişlerdir (Dantzer, 2004). Sistemik bir enfeksiyonu takiben tüm hayvan türlerinde ortaya çıkan semptomlar temelde benzerdir. Viral veya bakteriyel enfeksiyona yanıt olarak davranışta ortaya çıkan değişikliklere toplu olarak 'hastalık davranışı' adı verilir. İlk olarak Hart (1988) tarafından önerilen kavram, akut inflamatuvar bir duruma karşı nispeten kısa vadeli bir tepki olarak ortaya çıkar ve bireyin hayatta kalması için kritik öneme sahiptir. Hastalık davranışının semptomları arasında anhedoni (isteksizlik), ateş, bilişsel işlev bozukluğu, iştah kaybı, anksiyete/sinirlilik, yorgunluk, eklem ağrısı, uyku değişiklikleri, ağrıya karşı artan hassasiyet, sosyal geri çekilme ve psikomotor yavaşlama yer alır (Dantzer, 2001; Kelley ve ark., 2003). Bu değişikliklerin, enerji tasarrufu (hareketlerin kısıtlanarak) ve vücut sıcaklığının arttırılması yoluyla patojenlere karşı direnci arttırıp, iyileşmeyi desteklemek için organizmanın önceliklerini düzenlenme mekanizması olduğu söylenebilir. Bu tür semptomlar, iyileşme sürecinin gerçekleşebilmesi için hayvanın güvenli bir ortama çekilmesini sağladığından hayatta kalmak için faydalı olacaktır. Bu tür bir davranışın evrimsel

avantajı, gruptaki diğer kişilerle temastan kaçınmanın bir sonucu olarak ortaya çıkacak ve böylece enfeksiyonun yayılmasını da azaltacaktır.

Hastalık davranışına yol açan sinyal basamakları bakteri, maya veya virüs formundaki bulaşıcı ajanların periferik bağışıklık hücreleri tarafından tespit edilmesiyle başlar. Bu enfeksiyöz ajanlar immün sistem hücreleri üzerindeki reseptörler (PRR'ler) tarafından tanınan, patojenle ilişkili moleküler proteinler (PAMP) taşırlar. En yaygın olarak incelenen PRR'ler, monositlerin ve dendritik hücrelerin yüzeyinde eksprese edilen Toll like reseptörler (TLR)'dir (McCusker, & Kelley 2013). TLR'lerin enfeksiyöz ajanlar tarafından aktivasyonu sonucunda, sitokinler ve diğer immün moleküllerin sentezi ve salınması tetiklenir. TLR'lerin çeşitli alt tipleri arasında TLR4 en iyi karakterize edilenidir. Bu PRR, CD14/MD2 kompleksi ile birlikte bakteriyel endotoksin lipopolisakkariti (LPS) tanır ve miyeloid farklılaşma birincil yanıt geni 88'in (MyD88) aracılık ettiği aşağı akış sinyallemesine yol açar (McCusker & Kelley 2013).

IL-1'in, TNF- α'nın doğrudan uygulanması veya sitokin indükleyicisi olarak LPS'in farelere ve sıçanlara periferik veya merkezi olarak uygulanması, hastalık davranışlarının tüm spektrumunu indükler (Dantzer, 2001). Periferik sitokinler beyne girdikten sonra merkezi bir inflamatuvar tepkiyi indükler. Merkezi olarak üretilen sitokinler, beyin boyunca yaygın bulunan sitokin reseptörleri ağı ile etkileşime girer ve hastalıkla ilişkili psikolojik, davranışsal ve bilişsel değişiklikleri ortaya çıkaran nörokimyasal değişiklikleri tetikler (Layé, Parnet, Goujon, & Dantzer, 1994). Fakat bu değişikliklere neden olan sinyal yolları tam olarak açıklanmamıştır. Evrimsel olarak kazanılmış bu davranış değişiklikleri sayesinde enfeksiyonla savaşmak için sistemdeki kaynaklar korunur (Berg ve ark., 2004; Bluthe ve ark., 2000;). Bu yanıttaki bozulmaların morbidite ve mortalite üzerinde olumsuz etkisi vardır (Corona ve ark., 2013). Bu yüzden yanıt uygun şekilde kontrol edildiğinde ve çözüldüğünde konakçı organizmaya faydalıdır. Ancak uzamış immün yanıt zararlı olabilir.

2.2.5. LPS ilişkili nöroinflamasyonun indüklenmesi

Periferik LPS kan beyin bariyerini geçerek ve MSS içindeki hücreleri doğrudan aktive ederek etkili olabilir. MSS'de Toll-like reseptör 4' e sahip mikroglia (Marzolo ve ark., 2000), astrositler (Chakravarty, & Herkenham, 2005) ve ayrıca beyin endotel

hücreleri (Reyes ve ark., 1999; Verma ve ark., 2006 doğrudan LPS'ye yanıt verebilir. Ayrıca LPS, vagal (Goehler ve ark., 1999) veya diğer afferent sinir (Romeo, Tio, Rahman, Chiappelli, & Taylor, 2001) stimülasyonu yoluyla dolaylı yoldan da MSS'ni etkileyebilir.

2.3. Depresyon

Major Depresif Bozukluk (MDB) olarak da tanımlanan depresyon, oldukça yaygın bir nöropsikiyatrik bozukluktur. Depresyonun yaşam boyu prevalansının %2-20 olduğu tahmin edilmektedir ve depresyon vakalarının %60'ından fazlası yaşam kalitesini tehlikeye atmaktadır (Ribeiro, Ribeiro, & Von Doellinger, 2018; Zilcha-Mano, Dinger, McCarthy, Barret, & Barber, 2014). MDB, temelde ruh halinde düşüşler (üzüntü duyguları), anhedoni (keyif alamama) gibi major semptomlar ile kilo ve iştahta değişiklikler, uyku davranışında değişiklikler, anksiyete, yorgunluk (enerji kaybı), düşünme ve/veya konsantre olma yeteneğinde azalma, değersizlik duyguları ve intihar düşüncelerini içeren semptomları içerebilir (Otte ve ark., 2016).

2.3.1. Depresyonun etiyolojisi

Tarihsel olarak MDB'un merkezi sinir sisteminde düşük serotonin, norepinefrin ve/veya dopamin seviyeleri ile karakterize bir monoamin eksikliği hastalığı olduğu düşünülmekteydi. Bununla birlikte monoaminlerle tedavinin hastaların ruh hali üzerinde çok az yararlı etkisi olduğu görülmektedir. Hastaların bir kısmı monoaminlerle tedaviye yanıt vermekte, monoamin seviyeleri enjeksiyonlardan birkaç saat sonra eski haline dönmesine rağmen depresyon nüksü sıklıkla gözlenmektedir (Thase, 2006; Trivedi ve ark., 2006). Depresyonun karmaşıklığı ve heterojenliği nedeniyle, büyük ölçüde genetik ve çevresel faktörler tarafından belirlenen kesin biyolojik mekanizmaları belirlemek zordur. Genetik yatkınlık, nörotransmitter sistemlerinde bozulma (monoamin teorisi), nöroinflamasyon, nöroplastisite ve nörogenez ile hipotalamik hipofiz-adrenal aksın aşırı aktivitesi gibi depresyon patogenezi için birçok hipotez önerilmiştir (Triverdi ve ark., 2006).

2.3.1.1. Depresyonun monoamin hipotezi

Depresyonun nörobiyolojisi ve farmakolojisi üzerine çalışmalar ve monoaminerjik sistem teorisinin ortaya çıkışı, üç bilimsel olayın sonucu olarak

1950'lerde meydana gelmiştir. İlki, tüberküloz tedavisi için iproniazid ilacının geliştirilmesi ve depresif tüberküloz hastalarının ruh hali iyileşmesinin gözlenmesidir (Loomer, Saunders, & Kline, 1957). İkincisi, antipsikotik ilaç olarak geliştirilen ve antidepresan bir etki üreten bir ilaç olan imipramin'in ortaya çıkmasıdır (Kuhn, 1957). Üçüncü önemli olay ise, hastalar arasında depresif semptomların ortaya çıkmasına neden olduğu ortaya çıkan antihipertansif bir ilaç olan reserpin gelişimi sırasında yapılan çalışmalardan kaynaklanmıştır (Lemieux, Davignon, & Genest, 1956) ve daha sonraki çalışmalarda bu etki imipramin tarafından antagonize edilmiştir (Domenjoz, & Theobald 1959).

Beyindeki monoamin fonksiyonu yetersiz olduğunda depresyon olur. Azalan sinaptik monoamin nörotransmitterleri (serotonin, norepinefrin ve dopamin) depresyon oluşumunu indükler ve yüksek intersinaptik monoamin nörotransmitterleri antidepresan etkiler sağlayabilir. Trisiklik antidepresanlar ve monoamin oksidaz inhibitörleri (MAOI'ler) monoamin nörotransmisyonunu farklı mekanizmalar yoluyla arttırır. Bu keşif depresyonun monoamin teorisini destekler ve depresyonun patogenezini monoamin teorisi perspektifinden ortaya çıkarır (Lemieux ve ark., 1956).

2.3.1.2. Depresyonun nöroplastisite hipotezi

Depresyondaki heterojenliği kısmen açıklayabilecek bir aday etiyoloji de, depresyonun nöroplastisite hipotezidir. Bu hipotez, duygu ve hafızayı düzenleyen beyin bölgelerinin anormal gelişiminin ve plastisitesinin depresif bozukluklara giden etiyolojik bir yolu temsil ettiğini öne sürmektedir (Duman, Heninger, & Nestler, 1997). Nörotrofinler nöronların gelişimi, bakımı ve işlevi ve plastisitesinde rol oynayan proteinlerdir (Huang, & Reichardt, 2001). Beyin kaynaklı nörotrofik faktör (BDNF), merkezi ve periferik sinir sisteminde eksprese edilen bir nörotrofindir ve en çok hipokampus, korteks ve bazal ön beyinde aktiftir (Martinowich, Manji, & Lu, 2007). BDNF proteini periferik kan örneklerinde ölçülebilir ve bu da BDNF'nin potansiyel bir depresyon biyobelirteci olarak araştırılmasını destekler.

2.3.1.3. Depresyonun nörogenez hipotezi

Yeni oluşan nöronlar, yetişkin hipokampusuna sürekli olarak eklenir. Depresyon ve anksiyete modellerinde yetişkin nörogenezinin bozulduğu ve

antidepresan tedavi ile arttığı gösterilmiştir. Bu spekülatif teori başlangıçta depresyon ve yetişkin hipokampal nörogenez arasında birkaç korelasyona dayandırılmaktadır: Depresif hastalar ortalama olarak daha küçük hipokampüse sahiptir (Hanson, Owens, & Nemeroff, 2011). Depresyonun nöroplastisite (nörotrofin) hipotezinin ve nörogenez hipotezinin birleştiği noktalardan birisi, stresin BDNF ekspresyonunu azalttığıdır. Bu durum zamanla nörogenezi bozarak hipokampüsün atrofisi ile sonuçlanabilir, bu da hipokampal işlevin bozulmasına yol açarak depresif semptomlarla sonuçlanır (Molendijk, Spinhoven, Polak, Bus, Pennix, & Elzinga, 2014).

2.3.1.4. Depresyonun nöroinflamasyon hipotezi

İnsanlar sürekli olarak bakteriyel ve viral patojenlere maruz kalmaktadır. Düşük dereceli enfeksiyonların, doktor randevularının %35'ini oluşturduğu bildirilmektedir (Fleming, Smith, Charlton, Charlton, & Nicoll, 2002). Düşük dereceli sistemik inflamasyon, sitokinlerin artan seviyeleri ile karakterizedir ve depresyonun inflamasyon hipotezinin erken bir versiyonu, depresyonun doğrudan veya dolaylı olarak sitokinlerden kaynaklandığını belirtir. Nöroinflamasyon depresyon hipotezi ilk olarak Smith (1991) tarafından ortaya atılmıştır. Bu tarihten günümüze kadar yapılan çalışmalar, nöroinflamasyonun klinik depresyonda kritik olduğunu gösteren güçlü kanıtlar sağlamıştır.

Sitokinlerin ve diğer inflamatuvar mediatörlerin nöroendokrin fonksiyonunun nöral plastisite ve nörotransmitter metabolizması üzerindeki geniş sistemik etkileri göz önüne alındığında, beyindeki kronik bir inflamasyon durumu depresif semptomların gelişimine katkıda bulunan bir faktör olarak önerilmektedir (Kim, Na, Myint, & Leonard, 2016). Sağlıklı deneklerle karşılaştırıldığında, depresif hastaların plazmasında artan pro-inflamatuvar sitokin konsantrasyonlarının bulguları, depresif bozukluk ve periferik inflamasyon arasında bir ilişki olduğunu göstermektedir (Diniz, ve ark., 2010; Dowlati ve ark., 2010). Kronik periferik inflamatuvar hastalıkları olan hastaların sağlıklı bir popülasyona kıyasla daha yüksek depresif bozukluk insidansına sahip olduğunu gösteren kanıtlar da bu hipotezi desteklemektedir (Murray, & Lopez, 1997).

Pro-inflamatuvar sitokinlerin ekspresyonu, beyin nörotransmitter sistemleriyle de etkileşime girebilir. Örneğin depresif semptomların ortaya çıkmasıyla ilişkili

olarak, IL-2 ve/veya IFN-α alan hastaların plazmasında triptofan (serotonin sentezi için bir öncü molekül) seviyeleri azalır (Capuron ve ark., 2002). Bunu desteklemek için yapılan IL-1β uygulaması, deneysel olarak sıçanların hipokampusunda ve hipotalamusunda serotonerjik nörotransmisyonu arttırır. Anti-inflamatuvar sitokin olan IL-1β'ye uygulaması ise, ön hipotalamusta norepinefrin ve dopamin salınımını da artırır (Linthorst 1994; Shintani ve ark., 1993).

2.3.2. Depresyona duyarlılıkta cinsiyet farklılıkları

Depresyonun klinik prevalansı, kadınlar arasında daha yüksek seviyelerde bildirilmektedir (Ma, Xu, Wang, & Li, 2019) Depresyon, erkeklere kıyasla kadınları neredeyse 2:1 oranında orantısız bir şekilde etkilemektedir (Albert, 2015; LeGates, Kvarta, & Thompson, 2019) ve tanı konulduktan sonra kadınların tekrarlayan depresyon yaşama olasılığı erkeklere kıyasla dört kat daha fazladır (Seney ve ark., 2018).

Cinsiyetler arası farklılığın nedeni tam olarak bilinmemekle birlikte, erkekler ve kadınlar arasında serotonerjik sistemde gözlenen farklılıklarla ilişkili olabilir. Pozitron emisyon tomografisi (PET) kullanılan bir çalışmada, sağlıklı kadınların kortikal bölgelerde sağlıklı erkeklere kıyasla daha yüksek 5-HT1A reseptör yoğunluğuna ve daha düşük SERT yoğunluğuna sahip olduğu bildirilmiştir (Jovanovic ve ark., 2008). 5-HT1A reseptörü beyinde en çok eksprese olan 5-HT reseptörüdür ve depresyon patolojisinde önemli rol oynar (Kaufman, DeLorenzo, Choudhury, & Parsey, 2016). Ayrıca, kadınların üreme yaşam döngüsü (ergenlik, adet döngüsü, doğum ve menopoz) ile ilişkili gonadal steroidlerdeki (östrojen ve progesteron) dalgalanmalar depresyon yatkınlığına katkıda bulunabilir (Duman, Aghajanian, Sanacora, & Krystal, 2016) Bununla birlikte östrojenler, depresyon benzeri davranışa katkıda bulunabilen anormal immünolojik fonksiyonları iyileştirebilir (Ma ve ark., 2019).

2.3.3. Hastalık davranışı ve depresyon

Hastalık davranışı ve depresyonun ilişkisi, aralarındaki çok dikkat çekici benzerliğe dayanmaktadır. Hem hastalık davranışında hem de depresyonda fiziksel ve sosyal çevreden çekilme, anhedoni, düşük ruh hali, yorgunluk, bilişsel bozukluk, iştah

kaybı ve uyku bozukluğu görülür (Beurel, Toups, & Nemeroff, 2020). Bu semptomlara hastalık davranışındaki sitokinler neden oluyorsa, o zaman majör depresyondaki semptomların gelişiminde sitokinlerin de rol oynayabildiği makul bir varsayım sayılabilir. Ancak ateş gibi hastalık davranışının bazı semptomları depresyonda gözlenmez. Ayrıca enfeksiyonla mücadele edildiğinde hastalık davranışı azalır ve organizmanın öncelikleri normale döner (Serretti, 2023). Depresyonda, enfeksiyon yokken yaygın düşük ruh hali ve anhedoni mevcuttur. Bunun yerine, depresyona katkıda bulunan altta yatan, spesifik olmayan bir inflamatuvar süreç olabilir. Bu benzerlikler nedeniyle, hastalık davranışının majör depresyona dönüşen bir sürecin parçası mı olduğu, yoksa depresyonla sonuçlanan patolojik süreçlerden ayrı mı olduğu sorusu ortaya çıkmaktadır (Beurel ve ark., 2020).

2.3.4. Depresyonun deneysel olarak modellenmesi

Nöropsikiyatrik modeller, makul risk faktörlerinin bir kombinasyonu veya insan hastalığına karşılık gelen makul derecede nöral ve davranışsal patolojilerin oluşturulması yoluyla geliştirilebilir. Modelin amaçlanan kapsamı, modelin geçerli bir insan hastalığı modeli olarak kabul edilmesi için yerine getirmesi gereken kriterleri belirlemelidir. Herhangi bir deneysel hayvan modelinin geçerliliği üç ana kavrama dayanmaktadır: yapı geçerliliği, görünüş geçerliliği ve tahmin geçerliliği (Willner, & Mitchell, 2002). Yapı geçerliliği; hastalık benzeri bir durumu ortaya çıkarmak ve değerlendirmek için kullanılan metodolojik yaklaşımı, görünüş geçerliliği; model ile hastalık durumu arasındaki hem davranışsal hem de nöropatolojik benzerliği ve, tahminsel geçerlilik ise; bir modelin farmakolojik tedavilere insandaki duruma benzer şekilde yanıt verme yeteneğini tanımlar (Willner, & Mitchell, 2002).

Psikiyatrik hastalıkların hayvan modelleri, duygusal durumun göstergesi olan davranışsal ve fizyolojik değişikliklerden hastalığın etiyolojisine ve terapötik müdahalelerin etkilerine kadar insan durumunun çeşitli özelliklerini yakalamaya çalışır (Fuchs, 2006). Hayvanlarda depresif durumların ilk modelleri, insan olmayan primatlarda anne ayrılığı deneylerine dayanmaktadır (Jesberger, & Richardson, 1985). Kemirgenlerde, doğum öncesi stres ve anne ayrılığı gibi erken yaşam ortamının manipülasyonu, yetişkinliğe kadar devam eden ve psikopatoloji için bir risk faktörünü temsil eden biyolojik davranış değişiklikleri üretir (Sanchez, Ladd, & Plotsky, 2001).

Hayvanlarda insan depresif durumunu simüle etmek için bir başka davranışsal yaklaşım, öğrenilmiş çaresizlik modelidir. İlk olarak kaçınılmaz elektrik şokuna maruz bırakılan köpeklerde tanımlanan bu model (Seligman, & Maier, 1967), fare ve sıçanlarda "depresyon" çalışmalarında büyük ilgi görmüştür. Ayak şokunun bir sonucu olarak çaresizlik testinin sınırlamaları, testin laboratuvarlar arasında tekrarlanmasının zor olması (Vollmayr, & Henn, 2001) ve etik veya düzenleyici denetim nedeniyle bazı ülkelerde rutin olarak kullanılamamasıdır (O'Neil, & Moore, 2003). Kronik hafif stres modeli, hayvanların (genellikle sıçanlar) kontrol edilemeyen stres faktörlerine maruz bırakılmasına dayanmaktadır. Hayvanlar arka arkaya, ışık-karanlık döngüsünün bozulması, ıslak yatak, ev kafesine davetsiz bir sıçanın yerleştirilmesi veya ev kafesinin 1 ila 2 gün boyunca bir açıyla eğilmesi gibi bir dizi hafif stres etkenine maruz bırakılır (Willner, Muscat, & Papp, 1992). Bu modelin karmaşık prosedürleri, her laboratuvarın en azından biraz farklı deney düzeneklerine ve sonuç olarak protokollerin farklı yorumlarına sahip olmasını neredeyse garanti eder (O'Neil, & Moore, 2003). Depresif dönemleri tetiklediği veya ortaya çıkardığı bilinen en güçlü faktörler arasında stresli yaşam olayları yer almaktadır (Paykel, 2001). Stresin bir organizmanın homeostazını, nörotransmitter, nöroendokrin ve hormonal sistemlerde uzun süreli bir dengesizliğe ve dolayısıyla nihayetinde psikiyatrik bir hastalığa yol açabilecek şekilde bozduğu düşünülmektedir. Duygudurum bozukluklarının stres hipotezi, bir dizi varsayılan depresyon hayvan modelinin geliştirilmesini teşvik etmiştir (Yadid ve ark., 2000). İnsanlarda rütbe ve/veya sosyal statü kaybı, büyük bir depresyon riski ile ilişkili belirli bir "yaşam olayı" türü olarak giderek daha fazla tanınan kayıp deneyimlerinin bir örneğidir. Bir dizi davranış modeli, hayvanlarda sosyal ilişkileri manipüle ederek depresyonu uyarmaya veya modellemeye çalışmış ve stres faktörleri olarak kronik psikososyal pertürbasyonları kullanan yeni güçlü hayvan modelleri oluşturulmuştur (Blanchard, & Blanchard, 1990).

Depresyonun; bireyin semptomlarında, biyokimyasında ve tedaviye yanıtında büyük değişkenlik gösteren çok yönlü bir hastalık olması ve modellenebilecek güvenilir biyobelirtecinin olmaması nedeniyle deneysel olarak tam bir modeli yoktur. Bu engeller, belirli semptomlar veya patofizyolojik süreçler gibi hastalığın belirli yönlerinin modelleri oluşturularak aşılmıştır. Bu şekilde duygudurum bozukluklarına yönelik araştırmalar, bir depresyonu bir bütün olarak modellemeye çalışmak yerine

'endofenotiplere' ayrılır (Slattery, & Cryan, 2014). Örneğin, depresif hastaların bir alt popülasyonunda sergilenen inflamasyonu incelemek için, inflamasyon indüklenebilir veya davranışsal ve biyokimyasal çıktı olarak inflamatuvar belirteçler değerlendirilebilir.

Depresyonun yaygın semptomları davranışsal umutsuzluk ve çaresizliktir. Hayvanlarda davranışsal umutsuzluk genellikle depresyon araştırmalarında yaygın olarak kullanılan iki testle ölçülebilir: zorunlu yüzme testi (FST) ve kuyruk süspansiyon testi (TST) (Can, Blackwell, Piantadosi, Dao, O'Donnell, & Gould, 2011; Nestler, Barrot, DiLeone, Eisch, Gold, & Monteggia, 2002). Aynı zamanda, hastalarda psikomotor değişiklikler ve psikomotor gerilik gözlenir (Alcantara, Parise, & Bolaños-Guzmán, 2017; Vollmayr & Henn, 2001). Psikomotor gerilik, yalnızca lokomotor aktivitelerde genel bir azalma olarak değil, aynı zamanda temel bedensel ihtiyaçları karşılayamama veya uyarlanabilir davranışsal tepkiler verememe olarak da bilinir (Alcantara ve ark., 2017). Kemirgenlerde bu özellikler genellikle açık alan testi (OFT), yükseltilmiş artı labirent (EPM) ve açık-karanlık kutu gibi yaygın anksiyete testlerinin kullanımı yoluyla değerlendirilir (Choleris, Thomas, Kavaliers, & Prato, 2001; Ihne, Fitzgerald, Hefner, & Holmes, A, 2012; Walf & Frye, 2007).

2.3.4.1. Sistemik inflamasyon kaynaklı depresyon modeli

İnflamasyonun deney hayvanlarında davranış üzerindeki etkisini incelemek için çeşitli yollar vardır. En basit yol, inflamatuvar bir yanıtı indükleyen inflamatuvar bir ajanın doğrudan uygulanmasıdır. LPS, kemirgen modellerinde hastalık davranışını ve depresyonu değerlendirmek için kullanılan en popüler moleküldür. LPS'nin uygulaması geniş bir inflamatuvar tepkiye neden olur ve depresif benzeri davranışları indükler (O'Connor ve ark., 2009). Bu tür modeller geçici bir inflamasyon dönemini değerlendirir. Tekrarlanan LPS, sürekli inflamasyonu modellemek için de kullanılabilir (Kubera ve ark., 2013). Buna ek olarak, LPS *intraserebroventriküler* (i.c.v.) enjeksiyon yoluyla doğrudan MSS'ye uygulanarak nöroinflamasyonun sistemik inflamasyon olmadan değerlendirilmesine olanak sağlar (Lawson, McCusker, & Kelley, 2013).

LPS'in davranışsal etkileri; sosyal etkileşimlerden çekilme, keşif davranışında isteksizlik, anoreksi, vücut ağırlığının azalması ve zorunlu yüzme testlerinde (FST) ve

kuyruk süspansiyon testlerinde (TST) artan hareketsizlik süresi gibi insanlardaki depresyon ve hastalık davranışına benzer etkiler yaratır (Konsman, Parnet, & Dantzer 2002).

2.4.Hipokampus

Hipokampus, temporal lobun derinliklerine gömülü karmaşık bir beyin bölgesidir, öğrenme, hafıza. Ve duygu durumu ile ilgili temel rollere sahiptir. Çeşitli uyaranlardan, etkilenen oldukta plastisitesi yüksek bir bölgedir (Anand, & Dhikav, 2012). Hipokampus, lateral ventrikülün temporal boynuzunun tabanında çıkıntı yapan, koronal beyin kesitlerinde C şeklinde bir yapıdır. Denizatına benzerliğinden dolayı (hippos = at, kampos = deniz) Yunanca denizatı anlamına gelen "hipokampus" adı verilmiştir. Bu yapının dış yüzü koç boynuzuna benzediğinden dolayı "cornu ammonis" olarak da adlandırılmıştır. Hipokampustaki piramidal nöronların heterojenliğinden dolayı CA1, CA2, CA3 ve CA4 olarak kısaltılarak adlandırıp bölümlere ayrılmıştır (Insausti & Amaral, 2004; Schultz, & Engelhardt, 2014).

Hipokampal oluşum; dentat girus, üç alt bölüme (CA1, CA2 ve CA3) ayrılmış hipokampus, subiküler kompleks (subikulum, presubikulum ve parasubikulum) ve entorhinal korteks olmak üzere dört farklı bölgeden oluşur. Bu bölgeler, iyi tanımlanmış laminalar halinde düzenlenmiş benzersiz ve büyük ölçüde tek yönlü projeksiyonlarla bir sonrakine bağlıdır (Amaral, Scharfman, & Lavenex, 2007).

2.4.1. Hipokampusun histofizyolojisi

Hipokampus tipik lameller organizasyonu bakımından benzersizdir. İşlevselliği ve anatomisine göre farklı katmanları (hücresel ve sinaps katmanları) tanımlanmıştır. Hipokampal nöronlar ana hücreler ve internöronlardan oluşur. Ana hücrelerden nörotransmitter olarak glutamatarjik nörotransmisyondan sorumlu olan "granül hücreleri", dentat girusun başlıca hücreleridir.

2.4.1.1. Dentat girus

Dentat girusun üç histolojik katmanı vardır: Stratum molekulare, stratum granulare ve polimorfik tabaka (Amaral ve ark., 2007).

Stratum molekulare: Sıçanda yaklaşık 250µm kalınlığında olan, az sayıda ara nöronların dışında genellikle dentat granül hücrelerinin dendritlerinin bulunduğu nispeten hücresiz bir tabakadır. Bu tabakada ayrıca entorhinal korteksten gelen perforan yolun lifleri bulunur.

Stratum granulare: Ana hücre katmanı olan granül hücre katmanı büyük ölçüde yoğun şekilde paketlenmiş granül nöronlarından oluşur. Granül hücre tabakasının kalınlığı 4 ila 8 nöron veya ∼60 µm arasında değişir. Granül hücre katmanı esas olarak granül hücrelerinden oluşsa da granül ve polimorfik katmanların sınırında yer alan başka hücreler de vardır (Tatu, *&* Vuillier, 2014).

Dentat girusun (DG) subgranüler zonu (SGZ), nörojenik progenitörleri içerir ve yetişkin nörogenezinin gerçekleştiği bölgelerden biridir. Yetişkinde bu progenitör hücreler ara progenitörlere ve kısa bir mesafeye göç eden nöroblastlara farklılaşarak sonuçta granül nöronlarını oluşturur. Yetişkin bir insanda her gün hipokampusta yaklaşık 700 yeni nöron oluştuğu düşünülmektedir (Abrous ve ark. 2005; Spalding ve ark, 2013; Zhao ve ark., 2008).

Granül hücre tabakası ile polimorfik tabakanın arasında subgranüler zon bulunur. Burası yetişkin beyninde bilinen iki nörojenik nişten birisi olması sebebiyle oldukça önemlidir. Bunun dışında, dentat piramidal sepet hücrelerinin gövdeleri genellikle polimorfik tabaka ile sınırında granül hücre tabakasının hemen içinde yer alır.

Polimorfik tabaka: Granül hücre tabakası dentat girusun üçüncü tabakasını oluşturan, aynı zamanda dentat girusun hilusu olarak da tanımlanan, polimorfik hücre tabakası adlı hücresel bir bölgeyi çevreler. Polimorfik tabakada ağırlıklı olarak Mossy hücreleri olarak bilinen glutamaterjik nöronlar bulunur (Tatu, *&* Vuillier, 2014).

2.4.1.1.1. Granül nöronları

Dentat girusun temel hücre tipi granül hücreleridir. Dentat granül hücresi yaklaşık 10µm genişliğinde ve 18µm yüksekliğinde eliptik bir hücre gövdesine sahiptir (Claiborne, Amaral, *&* Cowan, 1990). Granül hücre gövdeleri sıkıca bir araya toplanmıştır ve çoğunlukla hücreler arasında glial kılıf bulunmaz. Granül hücresi, spinaları olan apikal dendritlerden oluşan koni şeklinde karakteristik bir ağaca sahiptir. Dallar dentat girusun moleküler tabakası boyunca uzanır ve dendritik ağacın distal

uçları sadece hipokampal fissürde veya ventriküler yüzeyde sonlanır. Suprapiramidal kanatta bulunan granül hücrelerinin dendritik ağaçlarının toplam uzunluğu ortalama olarak infrapiramidal kanattaki hücrelerinkinden daha büyüktür (sırasıyla 3500µm'ye karşı 2800µm). Suprapiramidal kanattaki hücrelerin dendritlerinde 1,6 spina/µm bulunurken, infrapiramidal kanattaki dendritlerde 1,3 spina/µm bulunur (Desmond, *&* Levy, 1985).

2.4.1.1.2. Mossy fibrilleri

Granül hücrelerinin, Ramón y Cajal'ın mossy fibrilleri (yosunsu lifler) adını verdiği kendine özgü miyelinsiz aksonları vardır. Mossy fibrilleri, polimorfik tabakanın yosunsu hücreleri ve hipokampüsün CA3 piramidal hücreleri ile sinapslar oluşturan alışılmadık derecede büyük terminal butonlara sahiptir. Her bir ana fibril 0,2-0,5µm çapındadır ve hipokampüsün CA3 alanına girmeden önce polimorfik tabaka içinde birkaç tane daha ince kollateral oluşturur (Claiborne, Amaral, & Cowan, 1986).

2.4.1.2. Cornu ammonis

Hipokampüsün CA alt bölgeleri en derinden yüzeye doğru, 6 histolojik katmana ayrılır: *alveus* (1), *stratum oriens* (2), *stratum pyramidale* (3), *stratum radiatum* (4), *stratum lucidum* (5) *stratum lacunosum/moleculare moleculare* (6).

(1) Alveus, fimbria ile bitişiktir, CA1 ve CA2' nin üzerinde bulunur.

(2) Stratum oriens tabakası, alveus ile stratum pyramidale arasında bulunur. Bu tabakada basket nöronları bulunur. Birkaç inhibitör sepet hücreli internöron içerir; stratum oriens'te iki tip sepet hücresi gözlenir. Piramidal hücrelerin aksonları ve dendritleri, tekrarlayan akson kollateralleri ve komissural lifler stratum oriens'i geçer (Chauhan, Jethwa, Rathawa, Chauhan, & Mehra, 2021; Stephan, *&* Manolescu 1980).

(3) Stratum pyramidale, cornu ammonis'in ana piramidal nöronlarını içeren katmandır. Bu piramidal nöronların somaları tipik olarak üçgen şeklindedir, tabanı alveusa bakarken, tepesi hipokampal sulkusa bakar. Aksonu, tabanından stratum oriens'i aşarak alveusa geçer. Bu piramidal aksonlar esas olarak septal çekirdeklere projeksiyon gönderir, ancak bazıları diğer piramidal nöronlar için assosiasyon lifleridir. Seyir halindeyken bu tür aksonlar stratum radiatuma doğru kıvrılan ve diğer piramit nöronlarına ulaşan Schaffer kolleterallerine sahiptir. Her piramidal nöronun

tepesinde, stratum molekülere ulaşmak için cornu ammonis'in tüm kalınlığını kat eden oldukça uzun apikal dendrit bulunur. Proksimal apikal dendritler stratum radiatum'a ve distal apikal dendritler stratum lacunosum-moleculare'ye projekte olur. Apikal dendrite ek olarak, soma'nın bazal açılarından bazal dendritleri bulunur; bunlardan bazıları stratum oriens'te dallanır. Hipokampal piramidal nöronlar, çift dendritik ağaçlanma gösterdikleri için "çift piramidal" olarak adlandırılmıştır (Isaacson 1974). Somaları, stratum oriens'te bulunan sepet nöronlarının dendritik ağı ile yoğun olarak çevrilidir. Ayrıca, bu katmanda sepet internöronları ve stellat nöronlar da (cornu ammonis'in diğer katmanlarında olduğu gibi) (Braak, 1974) stratum piramidale boyunca dağılmıştır (Olbrich, & Braak 1985).

(4) Stratum radiatum: Piramidal hücrelerin apikal dendritlerini ve bazı yıldız hücrelerini içerir. Stratum radiatumun birkaç ara nörona ek olarak paralel liflerden (septal ve komissural lifler) oluştuğu görülmektedir. Bu tabaka CA3'te daha belirgin olarak gözlenir (Chauhan, Jethwa, Rathawa, Chauhan, Mehra, & Pluta, 2021; Mazher, & Hassan, 2021).

(5) Stratum lucidum: Hipokampusun en ince tabakalarından birisi olan bu katman bazı araştırıcılar tarafından katman olarak sayılmamaktadır. Sadece CA3 bölgesinde olmakla birlikte hücresel yönden yoğun ve çoğunlukla motor tip piramidal hücrelerden oluşur. Bu katman, CA3 alanında bulunan hücreler arasında (piramidal hücreler ile dentat girusun granüler hücreleri) bağlantı sağlamak ile görevli yosunsu (mossy) lifleri de içerir. Bu lif ağı beyindeki en gelişmiş ve yaygın bir ağdır. Diğer primatlara göre insanlarda daha belirgindir. CA1 ile CA2 alanlarında bulunmaz (İzci, & Erbaş, 2015).

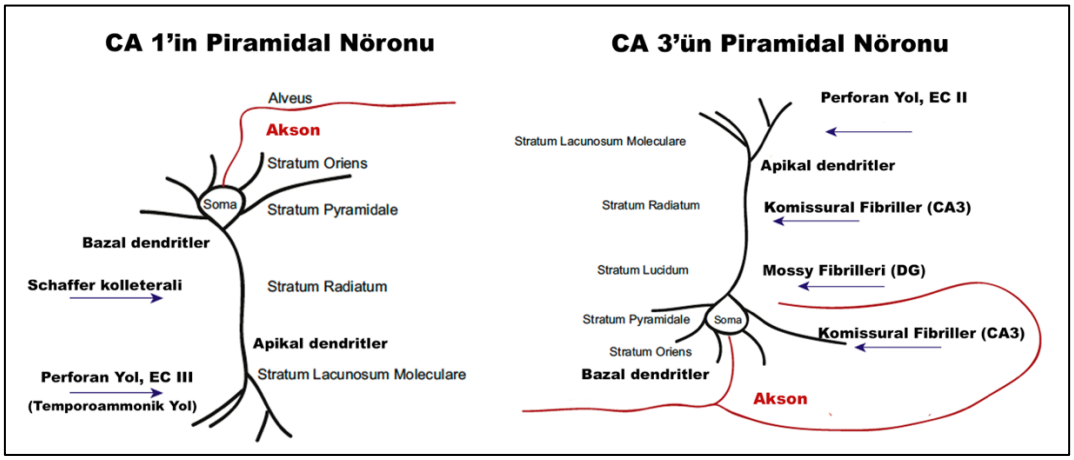
(6) Stratum lacunosum/moleculare: Hem stratum lacunosum'u hem de stratum moleküleri birbirinden ayırmak zordur, bu nedenle sıklıkla stratum lacunosum-moleculare adı verilen tek bir tabaka halinde gruplandırılıyorlar. Aksonları ve ara nöronları içerir. Bu katmandan retrosplenial kortekse doğru inhibe edici internöronlar gözlenir. Bunlar piramidal hücrelerin dendritlerinden, bazı ara nöronlardan ve sinapslardan oluşmaktadır (Chauhan, Jethwa, Rathawa, Chauhan, Mehra, & Pluta, 2021; Mazher, & Hassan, 2021).

2.4.2. Hipokampal piramidal nöronların organizasyonu

Hipokampüsün cornu ammonis'i dört bölgeye ayrılır (Şekil 2): CA1, CA2, CA3 ve CA4. En büyük bölgesi olan CA1, lateralde presubikulum ve medialde CA2 tarafından sınırlandırılır. CA1'deki nöronların çoğunluğunu (%90) piramidal nöronlar oluşturmaktadır (glutamaterjik projeksiyon nöronları), geri kalanı (%10) internöronlardır. CA2 bölümü, CA1 tarafından lateralde ve CA3 tabakası tarafından medialde sınırlanan bölümdür. Cornu ammonis'in CA2'si hipotalamusun supramamillar bölgesinden girdi alır. CA3 tabakası dentat girusun hilusuna doğru yönlendirilir ve CA2 tabakası tarafından medial olarak sınırlandırılır. Lorente de Nó (1934) tarafından benimsenen ilk isimlendirmede tanımlanan, ancak CA3'ün dentat girus içine giren kısmı için CA4 terimi kullanmıştır. Günümüzde CA4 kavramı genellikle terkedilmiştir (Chauhuan 2021).

Piramidal hücreler CA'in ana hücreleridir. Hipokampal piramidal hücreler, stratum oriens'e eğik olarak uzanan bazal dendritleri, stratum radiatum ve stratum lacunosum-molekulare'ye radyal olarak uzanan apikal dendritleri ile belirgin, üçgen bir hücre gövdesine sahiptirler. Bazal dendritler apikal dendritlerden daha çok sayıdadır. Ana hücreler, hücre gövdelerinin ve dendritlerinin bulunduğu yerin ötesine uzanan aksonal projeksiyonlara sahip olabilirken, internöronların aksonları ve dendritleri tek bir beyin alanıyla sınırlıdır (Adler ve ark., 2014; Mazher, & Hassan, 2021).

CA1'deki piramidal hücreler CA3'tekilerden daha küçüktür ve 50-100 μm kalınlığında dar bir tabaka (stratum pyramidale) oluştururlar (Blackstad, 1958; Lorente de Nó, 1934). CA1 ve CA3 piramidal hücrelerinin dendritleri apikal ve bazal dendritler olarak organize olmuştur. Ancak CA1'in aksine CA3, içindeki belirgin lateral akson kollateralleri sayesinde oldukça uyarılabilir, tekrarlayan şekilde bağlantılı bir ağdır (Fröhlich 2016). Her CA1 piramidal hücresi uyarıcı girdi alanı yaklaşık 30.000 spina sergiler. Entorhinal korteksin III. katmanından gelen doğrudan girdi (perforan yol) stratum lacunosum-moleculare'deki distal apikal dendritleri hedef alır. Buna karşılık, CA3'ten (Schaffer kolleteralleri) gelen girdi, stratum radiatum'daki apikal dendritler ve striatum oriens'teki bazal dendritler üzerinde sinapslar oluşturur.



Şekil 2. CA1 ve CA3 bölgelerindeki piramidal nöronların morfolojileri ve projeksiyonları, Fröhlich'in (2016) orijinal çizimi modifiye edilerek, Türkçeleştirilmiştir. EC: Enthorinal korteks.

2.4.3. Hipokampal devre

Hipokampus içindeki bilgi akışına, trisinaptik eksitatör devre aracılık eder. İlk olarak, dentat girusun granüler hücrelerine girer (Stratum moleculare), entorhinal korteksten perforan yol aracılığı ile gelir. Dentat girustan gelen bir grup nörona ait girdi, CA1'deki distal apikal dendritlere temporoammonik yol olarak projeksiyon yapar (Stratum lacunosum-moleculare ve Stratum radiatum). Bu doğrudan projeksiyon, elektronik olarak perisomatik bölgeden en uzak olanıdır, ancak CA1 aktivitesini modüle etmede kritik öneme sahiptir. İkincisi, CA3'ün piramidal hücrelerine mossy fibrilleri aracılığı ile dentat girus bağlantıları tarafından oluşturulur (Stratum lucidum). Son olarak CA3, Schaffer kollateral yolu aracılığıyla CA1'e bağlanır (Stratum oriens ve stratum radiatum). Çıktı alt alanlara ve kontralateral hipokampusa yönlendirilir. Bu, alt alanların birbiriyle bağlantılı çoklu yolları göz önüne alındığında, hipokampal devrelerin basitleştirilmiş bir görünümüdür olarak özetlenebilir (Basu, & Siegelbaum, 2015; Yeckel, & Berger, 1990). Hipokampal devreyi tamamlayan CA1'in piramidal hücreleri, subikulumda ve entorhinal korteksin katmanlarında sonlanan projeksiyonlar gönderir.

2.4.4. Hipokampal nöroplastisite

Beynin tanımlayıcı bir özelliği, deneyime bağlı bir şekilde uyum sağlamasını sağlayan plastisite yeteneğidir. Bu değişikliklere verilen yanıtlar yapısal düzeyde (örneğin; hücre sayısı –nörogenez-, dendritik omurga ve spina yoğunluğu ve

morfolojisi, sinaps sayısı ve sinaptik protein seviyeleri) veya fonksiyonel düzeyde (örneğin, senkron ateşleme) olabilir. Beyin plastisitesi stres tepkilerini, ruh halini, bilişi ve davranışı belirler. Sinaptik plastisite, sinapsların hem yapısındaki hem de işlevindeki iletişimin gerçekleştiği nöronlar arasındaki temas noktalarındaki değişimdir. Bu sinaptik temas bölgeleri, spina adı verilen nöronların dendritleri üzerindeki mikroskobik çıkıntılar sayesinde gerçekleşir. Dendritik spinalar oldukça dinamik yapılardır, uyaranlara tepki olarak şekillerini ve boyutlarını değiştirirler.

Hipokampus limbik sistemin çok önemli bir parçasıdır ve depresyonda rol oynar. Hipokampal plastisitede çok sayıda değişiklik hem insan depresyon hastalarında hem de kemirgen depresyon modellerinde görülebilir. Hipokampal hacimde önemli bir azalma vardır. Depresyon, hipokampustaki çeşitli alt bölgelerde, nöron sayılarında, glutamat reseptörlerinde ve glial hücrelerde değişikliklere neden olabilir. Bazı antidepresanlar aynı zamanda plastisite düzenlemesi yoluyla da etki gösterir.

2.4.4.1. Hipokampal nörogenez

Nörogenez, nöral kök hücrelerden ve nöronal progenitörlerden yeni nöronların üretildiği süreçtir. Embriyonik gelişim sırasında tüm beyinde meydana gelirken, yetişkinlikte lateral ventrikülün subventriküler bölgesi ve hipokampusun dentat girusunun subgranüler zonundaki spesifik nörojenik nişlerle sınırlıdır (Kiyota 2017). Hipokampal nörogenez 4 aşamada gerçekleşir; (1) öncü hücre aşaması, (2) erken hayatta kalma aşaması, (3) post-mitotik aşama ve (4) geç hayatta kalma aşaması (Bonaguidi, Song, Ming, *&* Song, 2012; Kempermann, Jessberger, Steiner, *&* Kronenberg, 2004). Hipokampal nörogenez beynin plastisitesinin bir şekli olarak tanımlanabilir.

Öncü hücre aşamasında, Tip-1 hücreler olarak adlandırılan hücreler asimetrik olarak bölünerek; bir adet geçici çoğalan hücre (Tip-2 hücre) ve kök hücre havuzunu korumak için de bir adet Tip-1 hücre oluşturur. Tip-1 hücreler, glial fibriller asidik protein (GFAP), nestin gibi proteinleri eksprese ederler. İç moleküler tabakaya çıkıntı yapan üçgen somaları ve dalları olan radyal glia benzeri hücrelerdir (Filippov, Oradd, *&* Lindblom, 2003; Seri, Garcia-Verdigo, McEwen, *&* Alvarez-Buylla, 2001). Erken hayatta kalma aşamasında kısa ve yassı morfolojideki Tip-2 hücrelerin aktivitesi öne çıkar. Bu hücreler Tip 1 hücrelerin aksine GFAP eksprese etmezler. Bu geçici hücreler

yüksek oranda proliferasyon gösterirler, çok sayıda Tip-2 hücre oluştururlar. Teğetsel göç yeteneğine sahiptirler. Tip-2 hücrelerinin diferansiyasyon durumuna göre; doublecortin (DCX) eksprese etmeyen DCX-negatif Tip-2A hücreler ve doublecortin eksprese eden DCX-pozitif Tip-2B hücreler olmak üzere iki alt tipi bulunur (Brown, Nesse, Vinokur, & Smith, 2003; Filippov ve ark., 2003). DCX, embriyonik ve yetişkin nörogenezinde nöronal göç sırasında yüksek seviyelerde eksprese edilen mikrotübül-ilişkili bir proteindir (Francis, Diorio, Liu, & Meaney, 1999; Nacher, Crespo, & McEwen, 2001). Daha yüksek farklılaşma gösteren Tip-2B hücreleri; DCX-pozitif ve nestin-negatif, yuvarlak çekirdekli nöroblastlar olan Tip-3 hücrelerine farklılaşırlar (Brandt ve ark., 2003). Tip-3 hücreleri de proliferatif karakterdedir ve yüksek oranda migrasyon özelliği gösterirler. Tip-3 hücreler farklılaşarak, calretinin ve DCX eksprese eden immatür nöronları (nöroblastlar) oluştururlar (Toth, & Maglóczky, 2014). Olgunlaşmamış nöronların (nöroblastlar) sayısı apoptoz dalgaları nedeniyle yaklaşık 4. günde hızla azalır, sonuç olarak yeni üretilen nöronların yaklaşık %20'si hayatta kalarak mevcut nöronal devreye dahil olur (Biebl, Cooper, Winkler, & Kuhn, 2000; Kempermann ve ark., 2004; Kuhn, Biebl, Wilhelm, Li, Friedlander, & Winkler, 2005).

2.4.4.2. Hipokampusun sinaptik ve Hebbian plastisitesi: Depresyon ile ilişkisi

Eksitatör veya inhibitör iletim için postsinaptik reseptörler nöronun farklı alanlarında bulunur. İnhibitör sinapslar ağırlıklı olarak hücre somasında bulunurken, eksitatör sinapsların çoğu, özellikle kortikal veya hipokampal piramidal nöronlarda, tipik olarak dendritten uzanan küçük çıkıntılar olan dendritik dikenlerin ucunda bulunur (Harris, & Kater, 1994; Nimchimsky ve ark., 2002).

Aktiviteye bağlı plastisitenin önemi Donald Hebb (1949) tarafından teorik temelde nöral topluluklar oluşturmaya yönelik bir mekanizma (homosinaptik plastisite) olarak öne sürülmüştür. Hebb'e göre: Hebbian plastisitesi, öğrenme ve hafıza oluşumu sırasında tipik olarak meydana gelen uzun süreli potansiyel (LTP) ve uzun süreli depresyon (LTD) olarak bilinen bireysel sinapslardaki değişiklikleri tanımlar. Homeostatik sinaptik plastisite, ağ istikrarını korumak için bir sinir ağı içindeki sinaptik gücü ölçeklendirerek sinaptik uyarılabilirlik veya inhibisyondaki LTP/LTD ile ilgili değişiklikleri kontrol etmek için hareket eden bir metaplastiklik

şeklidir (Yee, Hsu, & Chen, 2017). Hebb'e göre: "Bir A hücresinin aksonu bir B hücresini uyaracak kadar yakın olduğunda ve tekrar tekrar ya da ısrarla ateşlemede rol aldığında, bir ya da her iki hücrede de bazı büyüme süreçleri ya da metabolik değişiklikler meydana gelir ve böylece B'yi ateşleyen hücrelerden biri olarak A'nın etkinliği artar." Hebb'in fikri, bu tür bir sinaptik öğrenme kuralının, ortak tepki özelliklerine sahip nöronal toplulukların kablolanmasını sağlayacağı yönündeydi. Hebbian plastisitesi, belirli bir hafızayı kodlayan nöral toplulukların oluşumu için ideal gözükmektedir.

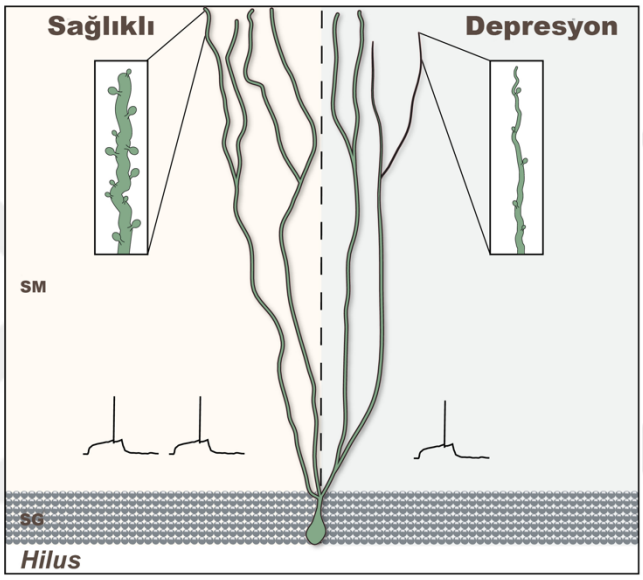
Sinaptik iletimin uzun dönem güçlendirmesi (LTP), Hebbian sinaptik öğrenme kuralının klasik bir örneğini temsil eder. Bliss ve Lomo (1973), anestezi uygulanmış tavşanlarda DG'a giden PP (perforan yol) girdilerinin kısa, güçlü bir tetanik uyarımı ile LTP'yi indüklemiş, bu da PP'dan DG'a uyarıcı sinaptik iletimin gücünde saatler ila günler süren uzun süreli bir artışa neden olmuştur. İlk keşfinin ardından LTP'nin daha sonra hipokampal sinaptik iletimin neredeyse tüm aşamalarında indüklenebilir olduğu bulunmuştur.

2.4.4.3. Hipokampal morfolojik plastisitesi: Depresyon ile ilişkisi

Strese yanıt olarak hipokampus ve amigdala sinaptik plastisitede değişiklikler gösterir. Bu değişiklikler, strese yanıt olarak organizmanın davranışsal değişiminin ifadesidir. Sinaptik plastisitenin bilgi kodlama, bağlantı, yapı ve sonraki bilişsel ve duygusal işlevler için temel önemi göz önüne alındığında, sinaptik plastisitedeki bozukluklar, depresyon gibi nöropsikiyatrik bozuklukların patofizyolojisinde önemli bir faktör olarak öne çıkmaktadır (Cramer ve ark., 2011; Gao, & Penzes, 2015; Keshavan, Mehta, Padmanabhan, & Shah, 2015; Vose, & Stanton, 2016; Workman, Niere, & Raab-Graham, 2018). Dendritik spinaların işlevi, dendritlerin yüzey alanını ve dolayısıyla dendritik uzunluk başına olası sinaps sayısını artırmaktır (Swindale, 1981). Ayrıca spinalar dendritlerin birden fazla aksona ulaşmasını sağlayarak bir sinapstan diğerine olan mesafeleri en aza indirir (Bonhoeffer, & Yuste, 2002).

PFC ve hipokampustaki dendritik omurga morfolojisindeki değişikliklerin depresyonun nörobiyolojisinde rol oynadığı iyi bilinmektedir (McEwen, (2007). Sağlıklı granül hücreleri uzun, kalın apikal dendritlere sahiptir. Ayrıca dendritik dikenlerin yoğunluğu ve perforant yol projeksiyonlarından gelen girdilerin çokluğu

plastisitesinde etkilidir (Şekil 3, sol taraf). Bu normal morfoloji, çoklu aksiyon potansiyelleriyle temsil edilen düzenli hücre aktivitesine olanak tanır. Depresyonda, granül hücreli dendritler omurga disfonksiyonuna ve atrofiye uğrayarak hacmin azalmasına neden olur (Şekil 3, sağ taraf). Dendritik fonksiyondaki bozulmaya AMPA reseptör alt birimlerinin azaltılmış ekspresyonu da eşlik eder. Bu değişiklikler, perforant yol sinapslarında plastisitenin azalmasına ve zayıflamış hücre aktivitesine yol açar (Umschweif, Greengard, *&* Sagi, 2021).



Şekil 3. Depresyonda dentat girus granül hücrelerinde bozulmuş morfoloji ve aktivitenin grafiksel özeti. SG: Stratum granulare; SM, Stratum moleculare. Umschweif ve ark.'ın (2021) orijinal çizimi Türkçeleştirilmiştir.

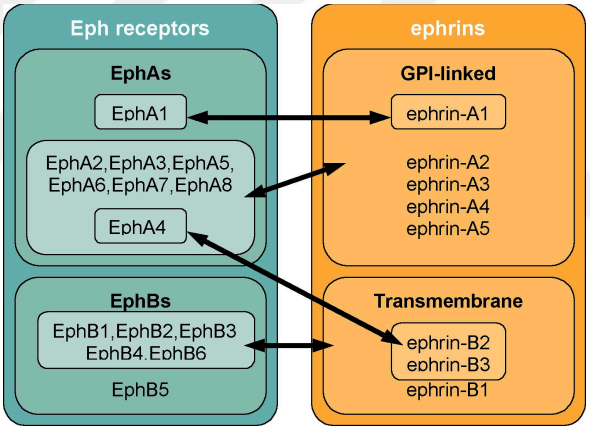
2.5. Eph-Ephrin Sinyal Sistemi

Reseptör tirozin kinazlar (RTK), sinyalleri hücre zarı boyunca ileten, hücre büyümesi ve hücre farklılaşması gibi hücresel fonksiyonları kontrol eden transmembran reseptörlerdir. İlk RTK'ın keşfinden bu yana, bu hücre yüzeyi reseptörleri ailesinin birçok üyesi proliferasyon ve farklılaşma, hücre sağkalımı ve metabolizma, hücre göçü ve hücre döngüsü kontrolü gibi kritik hücresel süreçlerin kilit düzenleyicileri olarak tanımlanmıştır (Blume-Jensen, *&* Hunter, 2001).

***E**rythropoietin-**P**roducing human **H**epatocellular* (**Eph**) reseptörleri 1987 yılında keşfedilmiştir ve bilinen en büyük reseptör tirozin kinaz ailesini oluşturmaktadır (Hirai, Maru, Hagiwara, Nishida, *&* Takaku, 1987). Çoğu reseptör

tirozin kinazın aksine, Eph reseptörleri çözünebilir ligandları değil, membrana bağlı ligandları bağlar. Bu ligand proteinler, Eph ailesi reseptör etkileşimli proteinleri anlamına gelen, "***Eph*** *family* ***r****eceptor* ***in****teracting proteins*"" ya da Yunanca gözetmen veya denetleyici anlamına gelen "*Ephoros"*tan ephrinler olarak adlandırılmıştır (Lemke, 1997). İnsanlarda ekspresyonu olan 14 adet Eph reseptörü (dokuz Eph A reseptörü [Eph A1- A8 ve Eph A10], beş Eph B reseptörü [Eph B1 - B4 ve Eph B6]) ve sekiz ephrin ligandı (beş ephrin A ligandı [ephrin-A1 - A5] ve üç ephrin B ligandı [ephrin B1 - B3]) vardır (Nagano ve ark., 2013; Pasquale, 1997) (Şekil 4).

Eph reseptörlerinin yaygın ekspresyon paternleri, çeşitli önemli hücresel olaylara katılımları ve benzersiz etki şekilleri biyolojik ve tıbbi alanlarda ilgi uyandırmıştır. Son bilimsel gelişmeler, Eph reseptörlerinin beyin patolojilerinin gelişiminde önemli bir rol oynadığını göstermektedir.



Şekil 4. Eph reseptör ve ephrin ligand ailesi, (Wilkinson, 2001).

2.5.1. Moleküler yapı

2.5.1.1. Eph reseptör proteinlerinin moleküler yapısı

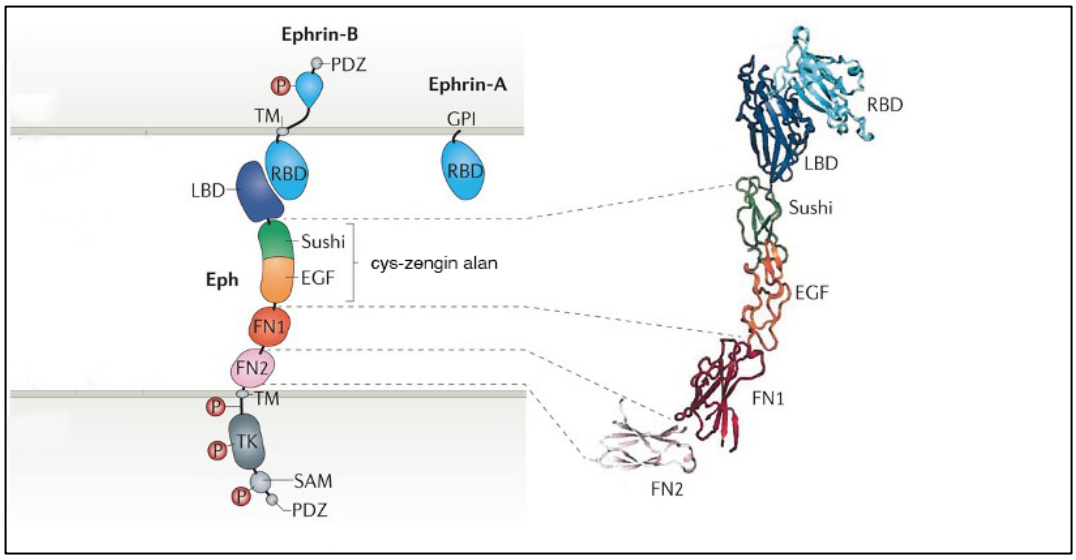
Eph reseptörleri; bir globüler ligand bağlama alanı, bir Sushi alanı ve epidermal büyüme faktörü benzeri bir alan içeren sisteince zengin alan ve iki fibronektin (FN) alanından oluşur. Hücre dışında bulunan FN 2'ye bir transmembran sarmal bağlıdır. Bu sarmalı tirozin kalıntıları, bir tirozin kinaz alanı, bir steril-α motif alanı ve C-terminal PDZ-bağlanma motifi içeren bir juxtamembran bölgesinden oluşan bir hücre içi bölge takip eder (Pasquale, 1997). Transmembran Eph reseptörleri de ephrin A veya ephrin B ligandlarına bağlanma afinitelerine göre Eph A ve Eph B alt sınıflarına ayrılır

(Flanagan, & Vanderhaeghen, 1998; Pasquale, 1997). Her iki alt sınıfın reseptörleri ve ligandları, ilgili alt sınıf içinde değişen afinite ile bağlanır. İstisna olarak EphrinB1-3 ile etkileşime giren EphA4 ve ephrinA5 ile etkileşime giren EphB2 gibi farklı alt sınıflara bağlanabilen reseptör etkileşimleri de olabilir (Gale ve ark., 1996, Himanen ve ark., 2004; Holland, Peles, Pawson, & Schlessinger, 1998; Qin, Noberini, Huan, Shi, Pasquale, & Song, 2009).

Sisteinden zengin alan; bir sushi (kompleman kontrol proteini) alanı ve ardından epidermal büyüme faktörü benzeri bir alan içerir (Seiradake ve ark., 2010). Bu bölgeler ve fibronektin tekrarları reseptör dimerizasyonunda (Lackmann ve ark., 1998), yüksek dereceli kümelenmede (Seiradake, Harlos, Sutton, Aricescu, & Jones, 2010) ve NMDA reseptörleri ile etkileşimde (Dalva ve ark., 2000) rol oynar. Ayrıca ortak bir hücre dışı motiftir ve reseptörün ligandı hücreden uzakta bağlamasına izin verir (Murai, & Pasquale, 2004).

2.5.1.2. Ephrin ligand proteinlerinin moleküler yapısı

Ephrin ligandları da iki gruba ayrılır: ephrinA ve ephrinB. Her iki ephrin alt sınıfı da hücre dışı bir Eph-reseptör bağlama alanına sahiptir. Bununla birlikte, moleküler yapılarında önemli farklılıklar vardır (Murai, & Pasquale, 2003). EphrinA proteinleri, sadece bir glikozilfosfatidilinositol (GPI) çapası aracılığıyla membranın hücre dışı kısmına bağlanır (Pasquale, 2005). Bu GPI çapası, inositolün C-6 hidroksilinden geçen bir karbonhidrat zinciri bağlantısına sahip tek bir fosfatidilinositol molekülünden oluşur (Pasquale, 2005). Bununla birlikte, ephrinB'ler transmembran proteinlerdir (Pasquale, 2008). EphrinB ligandları, fosforilasyon bölgeleri olarak birkaç korunmuş tirozin kalıntısı içeren kısa bir sitoplazmik alanı takip eden bir transmembran sarmal ve ardından C terminalinde hücre içi PSD-95, DIg ve ZO-1 alanı (PDZ) bağlayıcı motif içerir (Murai, & Pasquale, 2003) (Şekil 5).



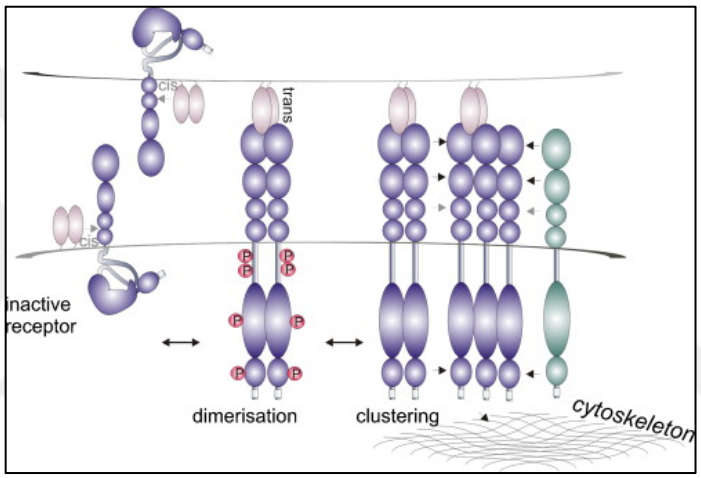
Şekil 5. Eph reseptörlerinin ve ephrin ligandlarının yapısı. Ephrin'in hem A hem de B alt sınıfları hücre dışı bir Eph-reseptör bağlama alanına sahiptir. Ephrin A molekülleri, bir glikozilfosfatidilinositol (GPI) çapası aracılığıyla membranın hücre dışı kısmına bağlanır. Ephrin B molekülleri transmembran proteinlerdir. Ephrin B ligandları, fosforilasyon için bölgeler olarak birkaç korunmuş tirozin kalıntısı içeren kısa bir sitoplazmik alan tarafından takip edilen bir transmembran sarmal ve ardından C-terminalinde bir hücre içi PSD-95, Dig ve ZO-1 alanı (PZD) bağlayıcı motif içerir. Eph reseptörleri, globüler bir ligand bağlama alanı, bir Sushi alanı ve epidermal büyüme faktörü benzeri bir alan içeren sisteinden zengin bir bölge ve iki fibronektin alanı olan FN1 ve FN2'den oluşur. FN2'yi bir transmembran sarmal ve birkaç korunmuş tirozin (y) kalıntısı, bir tirozin kinaz alanı, bir tirozin kinaz alanı, bir tirozin kinaz alanı içeren bir juxtamembran bölgesi içeren bir hücre içi bölge izler. Kania, & Klein'ın (2016) orjijinal çizimi Türkçeleştirilmiştir.

2.5.2. Eph-ephrin sinyali: Hücre temasına bağımlı sinyalleşme

Hem reseptörler hem de ligandlar plazma zarına bağlı olduğundan, ephrin sisteminin iki benzersiz özelliği vardır: İlk olarak, sinyalin gerçekleşmesi için iki hücrenin etkileşimi gereklidir. İkincisi, farklı sinyalizasyon yönleri mümkündür. Klasik sinyalleme modeli olan "trans sinyalizasyon" karşılıklı iki farklı hücre membranı arasında gerçekleşir ve 2 farklı yönde sinyalleme mümkündür. Bunlardan ilki, "ileri sinyalizasyon" karşı hücredeki ephrinler, Eph reseptörleri için ligand olarak davranır. Bununla birlikte, Eph reseptörleri de ephrinler için karşı hücrede ligandlar olarak da işlev görebilir, buna "geri sinyalizasyon" denir. Her iki sinyal yönü de aynı anda indüklenebilir ve buna "çift yönlü sinyalleme" denir (Egea, & Klein, 2007). Ayrıca Eph reseptörleri aynı hücredeki ephrinlerle cis içinde etkileşime girebilir ve bu durum Eph ileri sinyalini zayıflatabilir (Kao & Kania, 2011). Bazen Eph reseptörleri ligandlarından bağımsız olarak sinyal kaskadlarını indükleyebilir ve ephrinler de reseptörlerinden bağımsız olarak sinyal kaskadlarını indükleyebilir (Murai, & Pasquale, 2003).

2.5.2.1.Kümelenme

Eph/Ephrin bağlanması, tirozin kinaz oto-inhibisyonunun kaldırılmasını sağlar. Eph-Ephrin dimerleri dairesel bir heterotetramer oluşturur ve bu da genel sinyal sonucunu belirleyen oligomerizasyona yol açar. Tirozin fosforilasyonu, konformasyonel değişim ve oto-inhibisyondan kurtulmanın ardından başlatılır. Aktif tirozin kinaz alanı, Eph reseptörlerini ve aşağı akış hedeflerini transfosforile eder. Bu, Eph reseptörlerinin Ephrin bağlanmadan oligomere katılmasıyla da gerçekleşebilir. Konformasyonel değişiklikler de moleküler etkileşimler yoluyla sinyalleşmeyi yayar (Janes, Nievergall, & Lackmann, 2012) (Şekil 6).



Şekil 6. Eph reseptör kümelenmesi ve aktivasyonunun özeti. Bir reseptöre ephrin bağlanması ile, bir eph/ephrin hetero-tetramerine dimerizasyonu başlatır. Daha fazla kümeleme, A ve B tipi Eph'lerinin birlikte kümelenmesi de dahil olmak üzere bitişik eph'lerin çoklu alanları arasındaki reseptör-reseptör etkileşimleri ile kolaylaştırılır. Sitoplazmik proteinler ve sitoskeleton ile etkileşimler, biyolojik tepkilerin iletilmesinin yanı sıra kümelemeye de katkıda bulunabilir. Janes, Nievergall, & Lackmann (2012) orijinal çizimi.

2.5.3. Eph-ephrin sinyal modelleri ve hücresel yanıtları

2.5.3.1. İleri sinyalizasyon ve ilgili hücresel tepkiler

Eph reseptörlerinin aktivasyonu için ilk adım, kümeye dahil olan diğer Eph reseptörlerinin hücre içi bölgesinde bulunan birkaç tirozinin transfosforilasyonudur (Kalo & Pasquale, 1999). Özellikle, juxtamembran bölgesindeki iki tirozin kalıntısının fosforilasyonu, kinaz alanını tamamen aktif konformasyonuna dönüştürmek için çok önemli bir olaydır (Binns, Taylor, Sicheri, Pawson, & Holland, 2000; Kullander ve ark., 2001). Reseptör aktive edildikten sonra, adaptör proteinler ona bağlanır ve hücre içine sinyal iletimini düzenler (Kullander, & Klein, 2002; Pasquale, 2008). Bu adaptör

proteinler genellikle enzimatik aktiviteden yoksundur ancak sinyal protein komplekslerinin oluşumu için önemli olan Src- homoloji-2 (SH2) ve SH3 alanları gibi protein etkileşim alanları içerir (Pawson, & Scott, 1997).

Eph reseptörlerinin aşağı akışında en iyi karakterize edilen sinyal yolu, aktin hücre iskeletinde değişikliklere yol açan yoldur. Rho, Rac ve Cdc42 dahil olmak üzere küçük Rho ailesi GTPazları bu yolun kilit oyuncularıdır. İleri sinyalizasyon, Rho ailesi küçük GTPazların, Ras-MAP kinazların ve Src ailesi kinazların aktivasyonuna neden olarak hücre iskeletinin düzenlenmesini sağlar (Murai & Pasquale, 2003; Vearing, & Lackmann, 2005). Akson rehberliği ve sinaptik plastisite üzerindeki Eph-ephrin aracılı etkilerin çoğu, ileri sinyalleme yoluyla Rho GTPases ailesi aracılığıyla gerçekleşir. Rho ailesi RhoA, Cdc42 ve Rac'tan oluşur. Aktif GTP'ye bağlı form ile aktif olmayan GDP'ye bağlı konformasyon arasındaki geçişe, guanin değişim faktörleri (GEF'ler) aracılık eder. GEF'ler bağlı GDP'yi GTP ile değiştirir ve böylece Rho GTPaz'ı etkinleştirir (Noren, & Pasquale, 2004).

Fosfatidil inositol 3-kinaz (PI3K), Src ailesi kinazları ve MAPK'lar gibi diğer önemli sinyal yolları, Eph reseptörü ileri sinyalinin aşağı akışında mitogenez ve hücre yapışması gibi olmak üzere çok çeşitli hücresel süreçleri düzenler (Kullander, & Klein, 2002; Pasquale, 2008).

Bazı fizyolojik bağlamlarda Eph reseptör fonksiyonu ileri sinyalizasyon gerektirmez. Bazı durumlarda reseptörün ektodomain'i komşu hücrelerde ephrin aracılı ters sinyali aktive etmek için yeterlidir (Grunwald ve ark., 2004; Henkemeyer ve ark., 1996; Kullander ve ark., 2001). Diğer durumlarda Eph reseptörlerinin ektodomainleri diğer membran proteinleri ile cis etkileşimine girerek lokalize hücresel kompartımanlarda kümelenmelerini teşvik eder ve işlevlerini modüle eder (Dalva ve ark., 2000; Takasu ve ark., 2002).

2.5.3.2. Geri sinyalizasyon ve hücresel tepkiler

Ephrinlerin geri sinyale aracılık eden reseptörler olarak etkisi, Eph'lere yanıt olarak aşağı akış sinyal proteinlerinin aktivitesini ve/veya hücre altı lokalizasyonunu modüle etme yeteneklerine dayanır.

EphrinB'ler hem fosfotirozin kalıntılarını hem de sitoplazmik alanındaki PDZ alan bağlayıcı motifi kullanarak, aşağı akış sinyal proteinlerini aktive ederek

sinyalizasyon sürecini başlatabilirler. Tirozin kalıntıları Src ailesi kinazlar tarafından fosforile edilir ve bu da aktin hücre iskeletini değiştiren ve plastisite ile ilgili yapısal düzenlemeleri düzenleyen bir iskele proteini olan Grb4'ün aktivasyonuna neden olur (Cowan & Henkemeyer, 2001). Serin kalıntısı da fosforile edilerek hipokampal sinapslarda AMPA reseptörlerinin düzenlenmesine yol açar (Essmann ve ark., 2008).

EphrinA'lar sitoplazmik bir alana sahip olmasalar da, Eph bağlanmasına yanıt olarak ters sinyale aracılık edebilirler (Kullander, & Klein, 2002; Davy, & Soriano, 2005). EphrinA'lar, muhtemelen diğer membran protein kompleksleriyle birleştikleri glikosfingo-lipidler ve kolesterolden oluşan spesifik plazma membranı mikro alanları olan lipid raflarına lokalize olurlar. EphrinA'ların aktivasyonu, Src ailesi kinaz Fyn gibi hücre içi sinyal proteinlerinin lipid raflarına alınmasına yol açabilir ve bu da hücre iskeletinin yeniden düzenlenmesini ve hücre yapışmasını modüle etmek için aşağı akış proteinlerini düzenler (Davy ve ark., 1999). EphrinA ve B'lerin aktivasyonunun ortak bir aşağı akış etkisi, nöritlerin yapısal olarak yeniden düzenlenmesini takiben aktin hücre iskeletinin modülasyonudur (Gauthier, & Robbins, 2003). EphrinB2'nin fosforilasyonu hipokampal sinapslarda AMPA reseptörlerinin düzenlenmesine yol açtığı bildirilmektedir (Essmann ve ark., 2008).

2.5.4. Eph-ephrin sinyalleşmesinin biyolojik etkileri

Diğer RTK'ların aksine Eph'lerin temel işlevi mitogenezde değil, gelişimsel doku oluşumu sırasında hücrelerin navigasyonunda ve bağlanmasındadır. Hücresel düzeyde Eph'lerin çeşitli desenleme işlevleri, hücre morfolojisini ve hücre-hücre adezyonunu modüle eden sitoskeleton üzerindeki etkilerinin bir sonucudur. Ephrinler ayrıca membrana bağlı formda olmaları ve ephrin/Eph etkileşimlerini doğrudan hücre-hücre temas bölgeleriyle sınırlandırmaları bakımından oldukça sıradışıdır (Gale, & Yancopoulos, 1999).

2.5.4.1. Embriyogenez ve doku gelişimi

Genel olarak, gelişmekte olan omurgalı embriyolarında her dokuda Eph reseptörleri ve ephrinler yüksek oranda eksprese edilir (Gale ve ark., 1996; Murai, & Pasquale, 2003). Proliferasyon, hayatta kalma, adezyon ve hücresel itme gibi çeşitli hücresel süreçlerde rol alırlar (Pasquale, 2005). Eksprese edilen farklı formların sayısı

şaşırtıcı derecede yüksektir. Örneğin, Xenopus gastrula embriyolarında 8 ephrinden 7'sinin ve 14 Eph reseptöründen 11'inin ekspresyonunu tespit edilmiştir (Fagotto, Winklbauer, & Rohani, 2014). Eph reseptörleri ve ligandları olan ephrinler, embriyonik gelişim sırasında gastrulasyon, somitlerin ve arka beynin segmentasyonu, vasküler yeniden şekillendirme, nöral yol bulma ve topografik haritalama ve nöral krest hücrelerinin ve ekstremite kas öncüllerinin göçü dahil olmak üzere karmaşık çeşitli morfogenetik olaylara aracılık eder (Mellitzer, Xu, & Wilkinson, 1999).

2.5.4.2. Anjiogenez

Eph reseptörleri ve ephrinler, yeni kan damarlarının rehberliği ve gelişimi sırasında rol oynadıkları için mekanizmaları, anjiyogenezde en iyi karakterize edilmiştir (Gerety ve ark., 1999). Kan damarlarının (anjiyogenez) ve lenfatik vaskülatürün (lenfanjiogenez) gelişimi tek bir ligand-reseptör çiftine bağlıdır: ephrin B2 ve EphB4. Arteriyel bölgelerde ephrinB2'nin ve venöz bölgelerde EphB4'ün ekspresyonu, bu iki bölme arasında sınır oluşturmaya yardımcı olabilir ve farelerde bulunmamaları kan damarı büyümesinde ve yeniden şekillenmesinde ciddi kusurlara neden olur (Gerety ve ark.,1999; Gerety, & Anderson, 2002; Wang, Chen, & Anderson, 1998).

2.5.4.3. Gelişen MSS'inde eph/ephrin ekspresyonu

Eph reseptörlerinin ve ephrin ligandlarının ekspresyonu MSS gelişimi sırasında belirgin şekilde değişir. Eph-ephrin sinyali, sinir sisteminin gelişiminde ve homeostazında önemlidir. Genel olarak gelişen sinir sisteminde Eph-ephrin sinyali, nöronal progenitör proliferasyonu, hücre göçü ve aksonal büyüme konilerinin sinaptik hedeflerine doğru yönlendirilmesi ve sinaps oluşumu düzenlemek için sitoskeletonda değişikliklere yol açar. Ayrıca, hücre konumlandırmasında ve göçün yönünde olduğu kadar büyüme ve gelişme sırasında doku sınırlarının oluşumunda da rol oynarlar (Coulthard ve ark., 2008; Merlos-Suárez, & Batlle, 2012). Örneğin; EphB2, orta beyin boyunca komissural aksonların yönlendirilmesinde rol oynar (Henkemeyer, Itkis, Ngo, Hickmott, & Ethell, 1996), ephrinA2 ve ephrinA5 ekspresyonunun gradyanları, farklı EphA4 seviyelerini eksprese eden motor aksonları yönlendirir (Helmbacher, Schneider-Maunoury, Topilko, Tirey, & Charney, 2000).

2.5.5. Yetişkin MSS'inde Eph/ephrin sinyal sistemi

Eph reseptörleri ve ephrinler yetişkin MSS'de eksprese olmaya devam eder, çoğu bölgeye ve hücre tipine özgüdür. Çeşitli Eph reseptörleri ve ephrinler, amigdala ve hipokampus dahil olmak üzere morfolojik ve fizyolojik plastisiteye sahip yetişkin beyin bölgelerinde yüksek oranda ifade edilmeye devam etmektedir (Goldshmit, McLenachan, & Turnley, 2006). Bu fonksiyonel değişiklikler ekpresyon düzeylerindeki değişikliklere atfedilebilir. Yetişkin limbik sisteminde Eph reseptörleri nöronal plastisiteyi etkileyen hem adaptif hem de maladaptif mekanizmalarda yer alır. Bununla birlikte, bu sinapslarda EphB2 işlevi kinaz alanından bağımsızdır, bu da EphB2'nin hücre dışı kısmının ve 36 ligand bağlama yeteneklerinin işlevi yönlendirdiğini düşündürmektedir (Grunwald ve ark., 2001; Henderson ve ark., 2001). Buna ek olarak, EphB2 null fareler hipokampusa bağlı hafıza görevlerinde önemli bilişsel eksiklikler gösterir, bu da bu reseptörün sinaptik plastisite, öğrenme ve hafızadaki rolüyle tutarlıdır (Grunwald ve ark., 2001). Yosunlu lif sinapslarında LTP'nin NMDA'dan bağımsız olduğu bilinmektedir. EphB2'nin PDZ ile ilişkili aşağı yönlü sinyalizasyonunu bozmak veya EphB2'nin EphrinB'ye bağlanmasını engellemek, yosunlu lif LTP'sini inhibe eder (Contractor ve ark., 2002). Daha ileri çalışmalar, bu LTP formunda ters sinyalizasyonun önemini ve EphrinB3'ün bu süreçte özellikle kritik bir rolü olduğunu ortaya koymaktadır. Armstrong ve arkadaşları (2006) tarafından yapılan deneyler, EphrinB3'ün C-terminal sinyal alanının kesilmiş formuyla değiştirilmesinin LTP'yi önemli ölçüde bozduğunu göstermektedir. Ephrin aracılı ters sinyalleşmenin sinaptik plastisite, LTP ve LTD'deki önemi, diğer bölgelerin aksine Ephrinleri postsinaptik olarak ifade eden CA1 nöronlarında da gözlenmektedir (Grunwald ve ark., 2004).

EphA reseptörleri de hipokampüsteki nöronal plastisiteyi düzenler. EphA4, NMDA reseptörleriyle etkileşime girmemesine rağmen (Dalva ve ark., 2000), LTP'nin erken aşamalarına aracılık eder (Grunwald ve ark., 2004). Bu, EphA4 / EphrinA3 etkileşiminin LTP'nin astrositik modülasyonunu regüle etmesi yoluyla gerçekleşir. Astrositler hücre dışı glutamat seviyelerini kontrol ederek nöronal plastisiteyi düzenler. Nöronları eksitotoksisiteden korumak için astrositik glutamat taşıyıcıları, sinapstan fazla glutamatı uzaklaştırır. Dendritik CA1 EphA4 tarafından aktive edilen

astrositik EphrinA3, CA1-CA3 sinapsında LTP'yi düzenleyerek glutamat taşıyıcı seviyelerini azaltır (Filosa ve ark., 2009). EphA5 de mekanizması bilinmemekle birlikte hipokampal LTP'yi düzenler. Shaffer kollateral- CA1 sinapslarında, hipokampal dilimlere bir EphA5 inhibitörünün uygulanması LTP'yi bozar ve bir EphA5 agonistinin uygulanması bunu kısmen taklit eder (Gao ve ark., 1998; Gerlai *&* Clayton, 1999). Plastisitedeki rolünü daha fazla araştırmak için farelere bir EphA5 antagonisti infüze edilmiş ve hipokampal fonksiyona duyarlı davranış testlerine tabi tutulmuştur. Agonistin infüzyonu hem T-maze hem de bağlama bağlı korku koşullanmasında öğrenmeyi belirgin şekilde bozmuştur (Gerlai *&* Clayton, 1999). EphA5'in hipokampusa bağlı bellek üzerindeki etkisi, bağlama bağlı korku koşullanmasında eğitilen farelerde retrogradamnezi oluşturularak doğrulanmıştır. EphA5 agonistleri bu öğrenme paradigmasında hafıza kaybını önemli ölçüde iyileştirmiştir (Gerlai, & McNamara, 2000).

2.5.5.1.Morfolojik plastisitede eph-ephrin sinyali

Nöronal morfolojideki değişikliklerin, nöronal sinapsları modüle etmek için gerekli olabileceği gösterilmiştir (Bailey, *&* Kandel, 1993; Holtmaat, *&* Svoboda, 2009; Lamprecht, *&* LeDoux, 2004). Dendritik spinalar beyindeki uyarıcı sinaptik girdilerin çoğunu alır, lokal sinaptik sinyal yollarını bölümlere ayırır ve postsinaptik moleküllerin difüzyonunu kısıtlar (Lamprecht, *&* LeDoux, 2004; Newpher, *&* Ehlers, 2009; Nimchinsky ve ark., 2002). Eph proteinleri, sitoskeleton düzenleyici rolleri nedeniyle morfolojik plastisitede önemli reseptörlerin başında gelir. Büyüme konisi hareketliliğine benzer şekilde, dikenlerin oluşumu ve olgunlaşması hücre iskeletinin yeniden modellenmesini gerektirir ve bu süreçte Eph proteinleri rol oynar.

EphA4 ileri sinyalleşmesinin dendritik dallanmaların geri çekilmesine aracılık ettiği ve aktin sitoskeletonunu yeniden şekillendirerek ve yapışma reseptörlerinin özelliklerini değiştirerek sayılarını ve boyutlarını küçülttüğü gösterilmiştir (Goldshmit ve ark., 2004; McKinnell, Makarenkova, de Curtis, Turmaine, *&* Patel, 2004; Bouvier ve ark., 2008).

EphA4, spina oluşumu için EphB'ler kadar çok önemli olmasa da spina morfolojisini düzenler. EphA4-nakavt fareler, EphA4 kinaz aktivitesinin eksikliğine bağlı olan anormal spina anatomisi gösterir (Murai, Nguyen, Irie, Yamaguchi, *&*

Pasquale, 2003b). Ayrıca nöron ve glial hücreler arasındaki EphA4-EphrinA3 sinyalleşmesinin spina morfolojisini modüle etmesi de muhtemeldir; EphrinA3'ü kodlayan genin bozulduğu farelerde benzer spina anormallikleri görülür (Carmona, Murai, Wang, Roberts, & Pasquale, 2009).

Dendritik spinaların oluşumu ve morfolojisi EphB proteinlerine bağlıdır; EphB1, EphB2 ve EphB3 olgun spinaları oluşturmak için birlikte çalışırlar. Dendritik çıkıntıların oluşamaması, aktinin spinalarda birikememesinden kaynaklanmaktadır (Henkemeyer ve ark., 2003). Çoklu ligand ephrinB molekülleri de, hücre içi alanlarının fosforilasyonu yoluyla spina morfolojisini düzenler (Segura, Essman, Weinges, & Acker-Palmer, 2007).

2.5.5.2.Sinaptik plastisitede eph-ephrin sinyali

Postsinaptik membran; iyon kanalları, yapısal proteinler ve transmembran reseptörleri içeren yoğun bir şekilde paketlenmiş bir yapıdır. Birçok farklı bileşen, hem ekstrasellüler matriks (ECM) proteinleri hem de hücre ötesi iskele yapıları tarafından yüksek oranda organize edilir ve sıkı bir şekilde düzenlenir. Ortaya çıkan oluşumlar, organizmanın çevresel uyaranlara uyum sağlayabilmesi için hem morfolojik hem de içerik olarak hızlı bir şekilde yanıt verebilmelidir.

Eph reseptörleri ve ephrinler sadece dendrit omurga morfogenezini kontrol etmekle kalmaz, aynı zamanda fonksiyonel sinaptik plastisiteyi de modüle eder. (Klein, 2009). Özellikle EphB2, bu konuda en çok çalışılan reseptördür. EphB2'nin NMDAR'larla doğrudan etkileşime girdiği (Dalva ve ark. 2000; Grunwald ve ark., 2001) ve işlevlerini modüle ettiği gösterilmiştir. EphB2'nin aktivasyonu NMDAR'ların Src ailesi kinazlar tarafından fosforilasyonunu indükler ve böylece NMDAR'a bağlı kalsiyum akışını güçlendirir (Takasu ve ark., 2002). Bu olaylar NMDAR'a bağlı gen ifadesinin artmasıyla sonuçlanır ve EphB2 kinaz aktivitesi gerektirir. Ephb2 null mutant fareler CA3-CA1 sinapsında LTP ve LTD'de ve perforan yol-dentat granül sinapsında LTP'de bozulma gösterirler (Grunwald ve ark., 2001; Henderson ve ark., 2001). Ayrıca, postsinaptik bölmelerde azalmış NMDAR sinaptik akımları ve NMDAR yoğunluğu gösterirler (Henderson ve ark., 2001). Bununla birlikte, EphB2 kinaz aktivitesi uzun vadeli sinaptik plastisite modülasyonu için vazgeçilmezdir, bu da NMDAR'ların EphB2'ye bağlı kümelenmesinin işlevlerini düzenlemek için yeterli

olabileceğini düşündürmektedir. Alternatif olarak, postsinaptik ephrinB ters sinyalizasyonunu aktive etmek için presinaptik butonda EphB2 gerekli olabilir. Hipokampusta EphB2; dentat girus, CA3 ve CA1 sinapslarında LTP'yi düzenler. Mossy fibrilleri-CA3 sinapslarında, EphB2'nin pre-sinaptik EphrinB2'ye bağlanmasının bozulması LTP'yi inhibe eder (Contractor ve ark., 2002). EphB2-nakavt farelerde dentat girus sinapslarında ve CA1 sinapslarında LTP azalır (Grunwald ve ark., 2001; Henderson ve ark., 2001).

2.5.6. Eph/ephrin sisteminin patolojilerdeki rolleri

2.5.6.1.İnflamasyon ve nöroinflamasyonda Eph/ephrin sinyali

Doku yaralanması veya hasarını aşağıdakilerin indüklenmesini içeren düzenli bir süreç takip eder: i) akut inflamatuar süreç, ii) hücrelerin rejenerasyonu, iii) hem parankimal hem de bağ dokusu hücrelerinin göçü ve çoğalması ve iv) dokunun yeniden şekillenmesi (Diegelmann, & Evans, 2004). Doku onarımı ile embriyo morfogenezi arasında bir paralellik kurulmuştur (Martin, & Parkhurst, 2004) ve doku onarım gen profili embriyolojik gelişim sırasında ifade edilene benzerdir (Carmichael, 2003). Bu durum, model organlarda (örneğin Drosophila ve Caenorhabditis elegans) deneysel yaralarda (Martin, & Parkhurst, 2004), in vitro gastrointestinal hasarda (Hafner ve ark., 2005), ve omurilik yaralanmasında yapılan diferansiyel gen ekspresyonu çalışmalarıyla doğrulanmıştır. Bu da Eph ve ephrinlerin yaralanma (özellikle yara iyileşmesi, iskemi-reperfüzyon hasarı ve omurilik hasarı) ve inflamasyonda önemli bir rol oynadığını göstermektedir (Ivanov, & Romanovsky, 2006). Eph/ephrin proteinlerinin inflamasyondaki doğrudan etkisi nispeten belirsizliğini korumaktadır; ancak inflamasyon sırasında vasküler geçirgenliğin modüle edilmesindeki rollerini destekleyen kanıtlar mevcuttur (Larson, Schomberg, Schroeder, & Carpenter, 2008). TNF erken embriyogenez sırasında da anjiyojenik özelliklere sahipken (Cheng & Chen, 2001; Munthe & Aasheim, 2002), nörovasküler bozuklukların indüksiyonunda veya alevlenmesinde, TNF hem EphA2 hem de EphA4'ün aktivasyonu yoluyla yetişkin epitel dokularında damar geçirgenliğini tetikler (Jellinghaus ve diğerleri, 2013; Thundyil ve diğerleri, 2013; Ende ve diğerleri, 2014). Pro-inflamatuar sitokinlere bağlı olarak çeşitli Eph/ephrin proteinlerinin up-regülasyonu, inflamasyonda bir rol oynadıklarını düşündürmektedir (Ivanov, & Romanovsky,

2006).

Preklinik bulgular, Eph/ephrin sisteminin "A" üyeleri arasında özellikle EphA2 reseptörünün, nörovasküler bozuklukların çeşitli fare modellerinde yaralanma, iskemi ve diğer kronik inflamatuvar koşullar sırasında inflamasyona aracılık ettiğini göstermektedir (Jellinghaus, 2013; Thundyil; 2013; Ende ve diğerleri, 2014). EphA2 reseptör aktivasyonu beyin hasarından sonra meydana gelir ve kan beyin bariyerinin geçirgenliğini arttırarak nöroinflamasyona katkıda bulunur (Thundyil, 2013). Ayrıca, EphA2 için en yüksek afinite gösteren ligand olan ephrinA1'in promotörü, pro-inflamatuvar belirteç TNF'nin bir hedefidir (Ende ve diğerleri, 2014). EphA2/ephrinA1 çift yönlü sinyallemesinin araştırılmasının, inflamatuvar/nörovasküler/nöropsikiyatrik bozukluklar arasındaki komorbiditenin yeni moleküler tetikleyicilerini ortaya çıkarabileceğini ve terapötik müdahalelerin alternatif hedeflerini gösterebileceğini göstermektedir. Bir diğeri, astrositler üzerinde eksprese edilen ephrinA5 ile karşılık gelen EphA4 reseptörü arasındaki bağlanmanın, temporal lob epilepsisine sahip bir fare modelinin hipokampüsünde arttığı bulgusudur, EphA4 sinyalindeki artış beyin homeostazisi üzerinde zararlı sonuçları olan mikro damarların varlığı ile ilişkilendirilmiştir (Shu, 2016).

2.5.6.2.Nöropsikiyatrik hastalıklarda Eph/ephrin sinyali

Depresyonda (D'Sa, *&* Duman, 2002; Duman, *&* Duman, 2015; Duman, Aghajanian, Sanacora, *&* Krystal 2016) nöroplastisitenin bozulduğu iyi bilinmektedir. Depresyonda Eph-ephrin sinyallemesinin rolü, EphA4 ve EphB2 reseptör alt tiplerine odaklanılarak yakın zamanda literatüre dahil oldu. Depresyon ve bipolar bozukluğu olan hastaların korteksinde EphA4'ün artmış aktivasyonu gözlenmiştir, bu da EphA4'ün bu koşullarda tutulumunu düşündürmektedir. EphA4 sinyalinin baskılanmasının, dendritik spina yoğunluğunda normalleşme ile ilişkili bir fare depresyon modelinde anti-depresan benzeri bir etkiye sahip olduğu bildirilmiştir (Li ve ark., 2021). Bu nedenle, Eph-ephrin sinyali ile sinaptik ve morfolojik esneklik arasındaki bağlantı, Eph reseptörlerinin depresyon patogenezinde umut verici bir aday olmasını sağlar. Li ve ark. (2014), HIP'teki EphA4 reseptörünün erkek sıçanlarda depresyon benzeri bir fenotiple bağlantılı olduğuna dair ilk kanıtı rapor etmişlerdir. Bu araştırmacılar, strese maruz kalmanın toplam EphA4 reseptöründe bir azalmaya ve

ephrin-A3'te artışa neden olduğunu bildirmişlerdir. Ölüm sonrası örneklerden, depresyon tanılı deneklerin prefrontal korteksinde önemli ölçüde daha yüksek bir EphA4 reseptörü oranı bulunmuştur (Zhang ve ark., 2017). Ayrıca, EphA4 reseptör antagonisti rinkofilinin sistemik uygulanması, EphA4-efeksin-1 sinyallemesini normalleştirmiş ve bu, hızlı antidepresan etkilerle ilişkilendirilmiştir (Zhang ve ark., 2017). Bu nedenle, PFC ve hipokampusta gelişmiş EphA4 reseptörü aracılı sinyallemenin, potansiyel olarak ephexin-1 aktivasyonu ve genel olarak yukarıda tartışıldığı gibi artan dendritik omurga retraksiyonu ve bozulmuş plastisite yoluyla depresyon benzeri davranışlara aracılık ettiği savunulmaktadır.

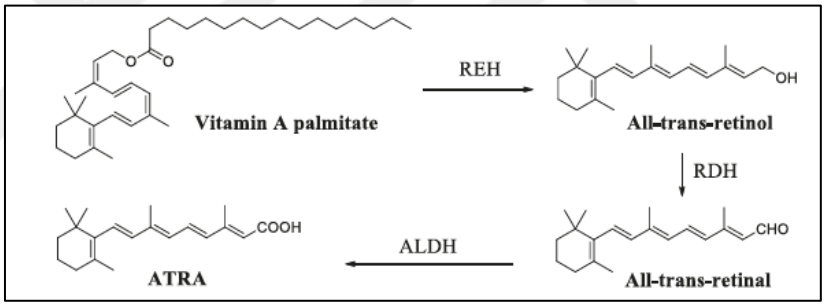
EphB2 reseptörünün depresyon patolojisine dahil olduğunu gösteren daha fazla kanıt mevcuttur. Strese yanıt olarak EphB2 reseptörlerinin ekspresyonunun azaldığı, anksiyete benzeri davranışlara aracılık etmek üzere NMDA reseptörleri ile etkileşime girdiği ve PFC'de dentritik spina sayılarını azalttığı bulunmuştur (Atwood ve ark., 2011; Zhang ve ark., 2019). Ayrıca, korku koşullandırması yapılan hayvanlarda, hipokampusta EphB2 ekspresyonunun azaldığı gösterilmiştir (Wu ve ark., 2019). EphB2 nakavt fareleri depresyon benzeri davranışların yanı sıra uzamsal hafıza ve bilişte eksiklikler göstermiştir. Davranışsal ve moleküler değişiklikler, NR2B antagonisti uygulamasıyla tersine çevrilmiş, bu da EphB2-NR2B sinyallemesinin plastisiteyi ve depresyon benzeri fenotipleri modüle ettiğini ortaya koymuştur (Zhen ve ark., 2018). Bazı araştırmacılar depresyon modellerinde EphB2'nin ekpresyonunun amigdala ve hipotalamusta yükseldiğini bulmuştur (Zhang ve ark., 2019; Wu ve ark., 2019). Birlikte ele alındığında, EphB2 reseptörünün depresyon bölgesine bağımlı patojenik rolünün (PFC'de ve hipokampusta down regülasyonu, hipotalamus ve amigdalada up regülasyonu) olduğu, aynı zamanda etkilerinin NMDA reseptörüne bağımlı mekanizmalar yoluyla değişen nöroplastisiteye dayandığı söylenebilir.

2.6. Retinoidler

2.6.1. Retinoidler (A vitamini)

Retinol (A vitamini), çok sayıda bileşik için kullanılır ve genel olarak retinoidler olarak isimlendirilir. β-karoten, retinol, retinal, izotretinoin, all-trans retinoik asit (*ATRA*, atRA), 9-cis retinoik asit ve 13-cis retinoik asit dahil olmak üzere retinoidler, hayvansal besin kaynaklarından (yumurta ve karaciğer) ve bitkilerden

(havuç ve ıspanak) emilen retinolün metabolize ürünleridir. Retinol, de novo sentezlenemediği için, bitkilerden (karotenoid formunda) veya hayvansal ürünlerden (retinil ester formunda) diyet yoluyla elde edilmesi gereken, yağda çözünen vitamindir (Maden, 2007; Theodosiou ve ark., 2010). Retinol, üç yapısal alana sahip küçük bir hidrofobik moleküldür: Bunlar, bir siklik halka, bir polien yan zincir ve bir polar uç gruptur. Vücut içinde retinol, retinoidler adı verilen ve esas olarak polar son grupları bakımından farklılık gösteren çeşitli metabolitlere dönüştürülür: Retinollerde bir hidroksil, retinallerde bir aldehit, retinoik asitlerde bir karboksilik asit ve retinil esterlerde bir ester bulunur. Retinol (All-trans Retinol) dolaşımdaki ana formudur, retinil ester karaciğerdeki depo formudur, retinoik asit ise ana aktif metabolitidir (Khalil ve ark., 2017). Genellikle hepatik sistem tarafından metabolize edilir ve safra yolları ya da böbrekler yoluyla elimine edilirler (Harrison 2012). Hücre proliferasyonu, hücre farklılaşması, apoptoz, bağışıklık, sinirsel fonksiyon ve embriyonik gelişimde önemli rolleri vardır (Tang, & Gudas, 2011) (Şekil 7).

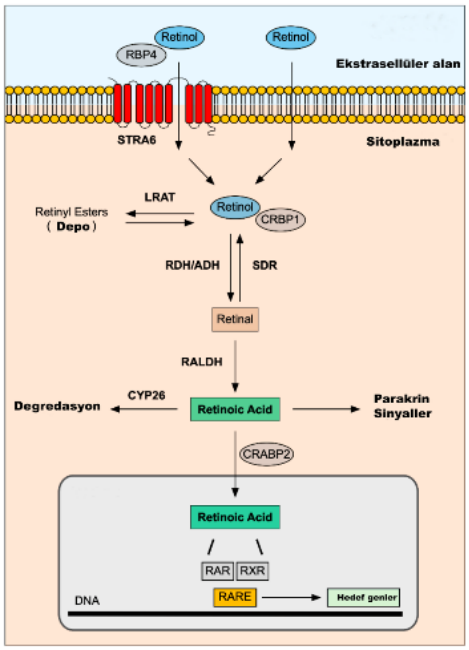


Şekil 7. Diyetle alınan A vitamininin (Vitamin A palmitat) *ATRA*'ya metabolizması ve genel biyokimyasal özellikleri şematize edilerek verilmiştir (Liang ve ark., 2021).

2.6.2. Retinoik asit metabolizması ve sinyali

Retinoidler, diyetten hayvan kaynaklı retinil esterleri veya bitki kaynaklı karoten formunda alınır. Sindirimle alınan retinol, vücuttaki ana retinoid depolama bölgesi olan karaciğerden, çeşitli hedef bölgelere taşınmak üzere kan dolaşımındaki retinol bağlayıcı proteinlere (RBP'ler) bağlanır. Ayrıca akciğerler, kemik iliği ve böbrekler dahil olmak üzere çeşitli ekstrahepatik bölgelerde (Blomhoff, & Blomhoff 2006) retinil esterler (retinoidler olarak da bilinir) olarak depolanır. Retinoidlerin bu depolama bölgelerinden diğer hücrelere taşınması, kan dolaşımına salınan retinol bağlayıcı protein 4 (RBP4) ile gerçekleştirilir. Retinol, serbest difüzyon veya omurgalı RBP reseptörü olan STRA6 (retinoik asit geni 6 tarafından stimüle edilen) aracılığıyla hedef hücrelere girer ve daha sonra transkripsiyonel yanıtları ortaya çıkarmak için hücresel retinoik asit bağlayıcı proteinler (CRABP'ler) olarak bilinen küçük taşıma proteinleri aracılığıyla sitoplazmadan hücre çekirdeğine taşınır (Majumdar, Petrescu, Xiong, & Noys, 2011). Retinol, hücre içinde iki aşamalı enzimatik reaksiyon ile aktif metabolit olan Retinoik Asit (RA)'e oksitlenir. İlk aşamada retinol, alkol dehidrojenaz (ADH) enzimi aracılığıyla retinale dönüştürülür. Bu basamak geri dönüşümlüdür, daha sonra bir retinaldehit dehidrojenaz (RALDH) enzimi ile geri dönüşümsüz bir oksidasyon reaksiyonu ile RA'ya dönüştürülür (Maden 2007; Theodosiou ve ark., 2010). CRABP'ler, RAR'ların/RXR'lerin ligand bağlanma alanına (LBD) bağlanmak için retinoidleri serbest bırakır ve bu da LBD içindeki retinoidi çevreleyen bir dizi konformasyonel değişikliği tetikler (Maden, 2007; Theodosiou ve ark., 2010).

Steroid/D vitamini/tiroid hormon reseptör ailesinin üyeleri olan nüklear retinoid reseptörler, retinoidlerin biyolojik işlevlerine katılan reseptörlerdir (Gudas 1994). Bilinen iki nüklear retinoid reseptör sınıfı vardır: Retinoik asit reseptörleri (RAR'lar) ve retinoid X reseptörleri (RXR'ler). Her bir reseptörün üç alt tipi (α, β, γ) ve her bir alt tipin birkaç izoformu bulunur (Chambon 1996; Mangelsdorf ve ark., 1995). *ATRA*, RAR'lara yüksek afinite ile bağlanırken, RXR'lere bağlanmaz (Mangelsdorf ve ark., 1992). *ATRA*'nın bir izomeri olan 9-cis retinoik asit, hem RAR'lara hem de RXR'lere bağlanır (Heyman ve ark., 1992). *ATRA*'nın bir başka izomeri olan 13-cis retinoik asit, sadece RXR için yüksek afiniteli bir liganddır (Connolly, Nguyen & Sukumar, 2013) (Şekil 8).



Şekil 8. Retinoik asit sinyali. Retinol kan dolaşımında RBP4'E bağlanarak hareket eder. Retinol hedef hücreye STRA6 veya difüzyon ile girebilir. Retinol hücre içinde CRBP1'e bağlanarak hareket eder. Retinol, LRAT tarafından Retinil esterlere (hücresel depolama) dönüştürülebilir veya RDH/ADH enzimleri tarafından retinale dönüştürülebilir. Daha sonra retinal, RALDH enzimleri tarafından retinoik aside oksitlenir. CYP26 degradatif enzimleri retinoik asidin hücre içi seviyelerini sıkı bir şekilde düzenler. Retinoik asit, parakrin bir şekilde hareket etmek için komşu hücrelere gidebilir veya CRABP2'ye bağlı olarak çekirdeğe taşınabilir. Çekirdekte retinoik asit, hedef genlerin promotör bölgesindeki RARE dizilerini tanıyan ve böylece transkripsiyonu modüle eden bir heterodimer oluşturan RAR ve RXR nükleer reseptörleri ile etkileşime girer. Kasawara ve ark.'ın (2016) orijinal çizimi Türkçeleştirilmiştir.

2.6.3. İmmun sistemde retinoik asit sinyalinin etkileri

A vitamininin bağışıklık sisteminin işlevindeki kritik rolü 20. yüzyılın başlarında tanımlanmıştır. Retinoik asidin öncelikle cilt hastalıklarında anti-inflamatuvar etkileri keşfedilmiştir. Daha sonra bağışıklık sisteminin çeşitli hücre tiplerinde sitokinler, kemokinler ve prostaglandinlerin üretimini etkilediği gösterilmiştir (van Neerven, & Mey, 2007). A vitamini eksikliği hücresel ve humoral immün yanıtlarda bozulmaya yol açar (Wiedermann, Hanson, Kahu, & Dahlgren, 1993). Retinoidler ve reseptörleri inflamatuvar yanıt üzerinde derin bir etkiye sahiptir. Cilt bariyer fonksiyonunu, nötrofillerin, makrofajların, doğal öldürücü hücrelerin, T ve B lenfositlerin fonksiyonunu ve sayılarını etkilerler (Kuenzli, Tran, & Saurat, 2004; Reifen, Nur, Ghebermeskel, Zaiger, Urizky, & Pines, 2002). Ayrıca makrofajların fagositoz yeteneğini düzenleyebilir (Stephensen 2001).

Retinoik asidin immünomodülatör mekanizmalarından biri, aktivatör protein-1 (AP-1) gibi transkripsiyon faktörlerinin aktivitesinin inhibisyonu yoluyla proinflamatuvar gen transkripsiyonunun baskılanmasıdır. AP-1'in retinoidler tarafından inhibisyonu, kollajenaz, metalloproteinazlar gibi inflamatuvar mediatörlerin üretiminin azalmasına neden olur (Thacher, Vasudevan, & Chandraratna, 2000). Bir diğer mekanizma, NF-κB'nin düzenlenmesidir. Bakteriler veya bakteri ürünleri tarafından proinflamatuvar sitokinlerin transkripsiyonu ile indüklenen inflamasyonu, A vitamininin ön tedavisi NF-κB'nin DNA bağlama aktivitesini azaltarak baskılar (Torii, Miyake, Morishita, Ito, Torii, & Sakamoto, 2004). Ayrıca sentetik retinoidler nötrofillerin dokuya alımını inhibe ederek de immünomodülatör işlev görebilir (Norris, Osborn, Rabinson, & Tonnesen, 1987). Hem AP-1 hem de NF-κB'nin negatif düzenlenmesi, A vitamininin anti-inflamatuvar etkisinin ana mekanizmalarından kabul edilmektedir. Bu mekanizmalara ek olarak, retinoidler TLR sinyalini de etkilemektedir (Liu, Krutzik, Kim, & Modlin, 2005). Çoğu çalışmada RA'in antiflamatuar etkisi gösterilirken (Austenaa, Carlsen, Hollung, Blomhoff, & Blomhoff, 2008; Mucida ve ark., 2007; Zimmerman, McGlinchey, Posternak, Friedman, Attiullah, & Boerescu, 2006), RA'nın farklı hücre tipleri üzerinde zıt etkileri olabileceği de belirtilmektedir. Örneğin LPS uygulaması ile kombinasyon halinde, nöroblastom hücrelerinde PGE2 üretimini arttırdığı (Alique, Herrero, & Lucio-Cazana, 2007), astrositlerde ise azalttığı ve sistemik prostaglandin seviyelerini in vivo yükselttiği bulunmuştur (Devaux ve ark., 2001).

2.6.4. Retinoidlerin klinik kullanımı

Bir retinoid türevi olan, 13-cis-retinoik asit (13-cis-RA, izotretinoin) şiddetli nodüler akne ve sedef tedavisi için sıklıkla reçete edilen bir ajandır (Norris ve ark., 1987; Starling & Koo, 2005). Ayrıca, *ATRA* bazlı kemoterapi klinikte akut promiyelositik lösemi (APL) tedavi etmek için uzun süredir kullanılmaktadır (Hanson, & Leachman, 2001; Mi, Li, Shen, Chen, & Chen, 2012). Bununla birlikte her iki ajanında kullanımı sonrası artan nöropsikiyatrik semptomlar bildirilmekte olup (Chia, Lane, Chibnall, Allen, & Siegfried, 2005; Efficace ve ark., 2021; Ferahbas, Turan, Esel, Utas, Kutlugun, & Kilic, 2004), bu da RA tedavisinin nöropsikiyatrik yan etkileri konusunda farkındalığı daha da arttırmaktadır.

2.6.5. Embriyonik dönemde retinoik asit sinyali: Embriyogenez ve MSS'nin gelişimindeki rolleri

Normal koşullar altında RA sentezi paraksiyal mezoderm ve lateral plaka mezoderminde gastrula aşamalarında başlar (Dobbs-McAuliffe, Zhao, & Linney, 2004, Duester, 2008, Niederreither, Subarrayan, Dolle, & Chambon, 1999; Swindell, Thaller, Sockanathan, Petkovich, Jessel, & Eichele, 1999) ve RA parçalayıcı enzimlerin aktivitesi ile anterior ve posterior olarak kısıtlanan morfojenin doğrusal gradyanını oluşturur (Shimozono, Iimura, Kitaguchi, Higashijima, & Miyawaki, 2013). Bu değişken RA konsantrasyonları, embriyonik dokuların eksenel paterni için gereklidir. Ayrıca, RA sinyali nöral tüpün dorsoventral modelini (Pera, Acosta, Goignard, Climent, & Arregi, 2014, Wilson, Gale, Chambers, & Maden, 2004), kalp ve visseral organ lateralitesini, somit oluşumu sırasında sol-sağ simetriyi (Samarut, Fraher, Laudet, & Gilbert, 2015, Vermot, & Pourquié, 2005) ve vücut ekseni uzantısının sonlandırılmasını etkiler (Denans, Iimura, & Pourquie, 2015; Lara-Ramírez, Zieger, & Schubert, 2013).

RA sinyalleri, hücresel kimlik kalıplarını belirtmenin yanı sıra, hücre döngüsü davranışının da önemli düzenleyicileridir ve örneğin, kök hücrelerin hem retinoid hem de diğer sinyal yollarına yanıt verme yeteneğini modüle eden gen ekspresyonunda kalıtsal epigenetik değişiklikler oluşturarak kök hücre farklılaşmasının kesin zamanlamasını belirleyebilir (Gudas, 2013; Ikami ve ark., 2015, Paschaki ve ark., 2013, Rochette-Egly, 2015, Urvalek, & Gudas, 2014).

Bununla birlikte, fertilizasyondan sonra, gelişmekte olan embriyonun ekzojen RA'ya maruz kalmasının çeşitli teratojenik etkilere neden olduğu bilinmektedir (Collins, & Mao, 1999). Gebelik sırasında fizyolojik retinoid seviyelerinin bozulması anormal morfolojik gelişime neden olabilir: A vitamini fazlalığı özellikle MSS kusurlarını da içeren, eksensefali, yarık damak, spina bifida, göz kusurları, hidrosefali ve mandibula ve maksillanın kısalmasına neden olabilirken, A vitamini eksikliği göz, ürogenital sistem, diyafram, kalp ve akciğerdeki malformasyonlarla ilişkilendirilmiştir (Collins, & Mao, 1999). Bu fonksiyonlar sadece embriyogenezi koordine etmek için değil, aynı zamanda RA sinyallerinin hücrelerin konumsal hafızasına daha fazla katkıda bulunduğu yetişkin dokularının yenilenmesi ve korunması için de çok önemli

bir molekül olduğunu ve RA dengesindeki bozulmanın yetişkinlikte de çeşitli kusurlara neden olabileceğini göstermektedir.

2.6.6. Yetişkin merkezi sinir sisteminde retinoik asit sinyali

RA daha önce çoğunlukla embriyonik ve erken postnatal gelişim bağlamında ele alınmış olsa da yetişkin beyninin sağlıklı işleyişindeki önemli rolü artık iyi bilinmektedir. Retinoidler, beyinde enzimler, nörotransmitter taşıyıcılar ve reseptörler, transkripsiyon faktörleri, hücre yüzeyi reseptörleri ve nöropeptid hormonları kodlayan birçok genin ekspresyonunu modüle etme kabiliyetleri nedeniyle oldukça ilgi görmektedir. (Goodman, 2006). *ATRA* ve diğer retionoik asitlerin sistemik uygulaması sonrasında, kan beyin bariyerini aşarak beyinde etki ederler (Jing ve ark. 2017; Wang ve ark., 1980). RA'ler, beyinde amigdala, prefrontal korteks ve hipokampus gibi limbik sisteme ait alanlarda yüksek oranda eksprese edildiği bilinen retinoik asit reseptörleri (RARα, β ve γ) ve retinoid X reseptörleri (RXRα, β ve γ) gibi retinoid reseptörleri ile etkileşim yoluyla hedef genlerinin transkripsiyonunu gerçekleştirir (Goodman, & Pardee, 2003).

Çalışmalar, RA'in homeostatik sinaptik plastisite için merkezi bir rol oynadığını göstermektedir. RA sinaptik uyarım veya inhibisyona aracılık eden reseptör proteinlerinin mRNA-translasyonunu etkileyerek sinaptik iletimi düzenler (Aoto, Nam, Poon, Ting, & Chen, 2008). RA sinyali, özellikle kısa süreli çalışma belleği ve uzun süreli bildirimsel belleğin kodlanmasına aracılık etmede (Chiang ve ark., 1998; Mingaud ve ark., 2008; Misner ve ark., 2001; Wietrzych ve ark., 2005) kritik olarak yer almıştır. RA sinyali, hipokampus bağımlı öğrenme ve hafızanın hücresel mekanizmalarının altında yatan sinaptik etkinliğin aktivitesine bağlı olan LTP'de değişikliklere neden olur (Chen, Lau, & Sarti, 2014). RARβ veya RARγ bulunmayan farelerde (Chiang ve ark., 1998) veya A vitamini eksikliği olan farelerde, (Misner ve ark., 2001) bozulmuş LTP veya LTD bulunmuştur. Ayrıca yaşlanma sırasında, retinoid sinyallemenin hipoaktivitesinin, A vitamini takviyesi veya RA ile kısa süreli tedavi yoluyla RAR aktivasyonu ile tersine çevrilen hipokampal disfonksiyon ve hafıza bozukluğu ile ilişkili olduğu bulunmuştur (Mingaud ve ark., 2008). RA'in için yakın zamanda doğrudan, nöral plastisite üzerindeki modüle edici etkiler tanımlanmıştır (Aoto ve ark., 2008). RA, otokrin ve parakrin bir şekilde hareket

eden ve bir dizi beyin fizyolojik sürecine dahil olan oldukça güçlü bir nöral düzenleyicidir.

Retinoik asidin embriyonik MSS'de nöronal farklılaşmanın bir düzenleyicisi olduğu göz önüne alındığında, beyinde de bu süreci de etkilemesi şaşırtıcı değildir (Crandall ve ark 2004; Jacobs ve ark. 2006; Wang, *&* Liu, 2005). Yeni nöronlar, dentat girus içindeki granül hücrelerini yeniler ve hipokampusta en güçlü RA sinyali granül nöronlarında bulunur (Misner ve ark. 2001; Sakai, Crandall, Brodsky, *&* McCaffery, 2004). Benzer şekilde, başka bir çalışma, RA tükenmesinin yetişkin farelerin dentat girusunda eksik nöronal farklılaşma ve hücre sağkalımının azalmasına neden olduğunu ve bu da RA'nın yetişkin hipokampal nörojenez sürecinin başlarında gerekli olduğunu düşündürdürdü (Jacobs ve ark., 2006). A vitamini eksikliği olan hayvanlarda, hem Morris su labirentinde hafıza eksiklikleri tespit edilmiş hem bozulmuş yetişkin nörogenezi bildirmiştir (Bonnet, Touyarot, Alfos, Pallet, Higueret, *&* Abrous, 2008; Etchamendy ve ark., 2001). Ayrıca yetişkin farelerde RA'in tükenmesi, SGZ'da nöronal farklılaşmanın ve hücre sağkalımının azalmasına yol açar (Jacobs ve ark., 2006). Benzer şekilde yenidoğan farelere disülfiram (RA sentez inhibitörü) uygulanması SVZ'da hücre çoğalmasını ve nöroblast göçünü azaltır, ayrıca nöral projenitörlerin morfolojisinin değişmesine neden olur (Wang ve ark., 2005). Bu nedenle, RA muhtemelen yetişkin hipokampal SGZ'nin kök hücre nişinde önemli bir faktördür.

2.6.7. Merkezi sinir sistemi patolojilerinde retinoik asit sinyali

RA seviyesinin hassas bir homeostatik kontrolü normal beyin fonksiyonu için gereklidir (McCaffery ve ark., 2003; Das ve ark., 2014). RA seviyelerinde bir dengesizlik ve normal paternin bozulması, gelişmekte olan veya olgun MSS için anormal değişikliklere neden olmaktadır.

2.6.7.1. Retinoik asit ve depresyon

Retinoik asit (RA) ve depresif benzeri davranışları birbirine bağlayan klinik öncesi kanıtlar, 6 hafta boyunca erkek DBA/2 J farelerine klinik kullanıma en yakın doz olan 1 mg/kg 13-cis-RA (ITTT) günlük intraperitoneal (i.p.) uygulaması, zorunlu yüzme testinde ve kuyruk süspansiyon testinde depresyonla ilgili davranışa neden

olduğu farelerde davranışsal çalışmalardan gelmiştir (Masia, Alverez, de Lera, & Barettino, 2007; O'Reilly, Shumake, Gonzalez-Lima, Lane, & Bailey, 2006). 6 haftalık isotretionin uygulaması Wistar sıçanlarında depresif benzeri davranışa neden olurken (Samuels ve ark., 2016), 8-10 haftalık genç yetişkin sıçanlarda 19 günlük kronik *ATRA* uygulamasının, azalan sükroz tercihinin yansıttığı gibi depresif benzeri davranışa neden olduğu bulunmuştur (Hu ve ark., 2013; Hu ve ark., 2016). Ek olarak, juvenil (4 haftalık) sıçanlarda 6 haftalık kronik *ATRA* uygulaması, EPM ve açık alanda anksiyete benzeri davranış eşliğinde HPA ekseni hiperaktivitesini indüklemiştir (Cai ve ark., 2010; Cai, Li, & Zhou, 2015). Yakın zamanda yapılan bir başka çalışmada, RA sinyal enzimlerinin, çekirdek accumbens'te (NAc) RA bozunma enzimi Cyp26b1 ve RA bağlayıcı protein CRABP2'nin seçici olarak yıkılmasıyla manipüle edilmesinin, depresyon- ile ilgili davranışı da artırdığı bulunmuştur (Song, Huang, Yu, Lang, Ding, & Zhang, 2017). Bunun tersine, yüksek doz (7 veya 15 mg/kg/gün) ITT veya *ATRA*'nın yetişkin sıçanlarda (12-19 haftalık yaş) zorunlu yüzme testinde depresyonla ilgili davranışı etkilemediği de bildirilmiştir (Ferguson, Cisneros, Gough, Hanig, & Berry, 2005; Ferguson, Cisneros, Hanig, & Berry, 2007).

RA sinyalizasyonu depresyonla ilişkili bölgeler olan yetişkin hipokampusü, hipotalamus ve prefrontal kortekste yüksektir (Fragoso, Shearer, Sementilli, de Carvalho, & McCaffery, 2012) ve mRNA ifade profilleri duygudurum bozukluğu olan hastalar ile kontrol denekleri arasında farklılık gösterir (Chen, Meng, Bao, Swaab, Wang, & Zhou, 2009; Qi, Zhao, Liu, Fang, Swaab, & Zhou, 2015). RA homeostazındaki düzensizlik ile depresyon arasındaki nedensel bir bağlantı, sistemik retinoidlerle dermatolojik tedavide ve kemoteröpatik tedavilerde sıklıkla görüldüğü gibi (Chia, ve ark., 2005; Efficace ve ark., 2021; Ferahbas, ve ark., 2004), ekzojen RA'nın depresojenik etkilerine ilişkin bulgularla da bildirilmektedir (Bremner, Sheare, & McCaffery, 2012). Dolayısıyla genel olarak bahsedilen sonuçların çoğu, RA kullanımı ile depresyon arasında potansiyel bir ilişki olduğu ve bu açıdan RA tedavilerini bir risk oluşturabileceği yönündedir. Bunu açıklığa kavuşturmak için daha fazla sayıda deneysel çalışma ve klinik verilere ihtiyaç vardır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Etik Onay

Deneylerimizi gerçekleştirmek için, Bursa Uludağ Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan 07.11.2023 tarihli, 2023-12/09 karar numaralı etik onay alındı. Tüm deney prosedürleri Bursa Uludağ Üniversitesi Deney Hayvanları Yetiştirme Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde (DEHYUAM) ve Bursa Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'ndaki araştırma laboratuvarlarında gerçekleştirildi.

3.2. Deney Hayvanları

Çalışmada kullanılan 62 adet Wistar albino ırkı deney hayvanı Bursa Uludağ Üniversitesi DEHYUAM'den temin edildi. 31 adet 10-12 aylık, orta yaşlı 225-275 gr ağırlığında damızlıktan ayrılmış dişi sıçanlar ve 31 adet 4 aylık dişi 200-225 gr ağırlığında dişi sıçanlar kullanıldı.

Tüm süreçlerde sıçanlar 12 saat karanlık/12 saat aydınlık döngüsünde kafes başına 2/3 sıçan olacak şekilde DEHYUAM'de standart sıçan kafeslerde takip edildi. Sıçanların deneysel davranış testleri dışında, sınırsız standart sıçan yemine ve suya erişimi sağlandı.

3.3. Deney Grupları

Deneylere başlanmadan önce tüm hayvanlara, 5-7 gün alıştırma ve uyum dönemi uygulandı. Sıçanların östrüs siklüsu takip edilerek metöstrus/diöstrus dönemlerinde deneylere devam edilmek üzere sıçanlar davranış analizleri ve histopatolojik analizler için kullanıldı.

2 ayrı kohort planlandı:

1. Akut sistemik inflamasyon kaynaklı nöroinflamasyonun oluşturulması ve akut *ATRA* uygulaması
2. Kronik sistemik inflamasyon kaynaklı nöroinflamasyonun oluşturulması ve kronik *ATRA* uygulamaları

Buna göre, grup özellikleri aşağıda kısaca özetlenen, toplam 10 farklı deney grubu oluşturuldu.

3.3.1. Akut nöroinflamasyon

(1) Salin Grubu (n=7): Bu grupta bulunan sıçanlara intraperitoneal (ip.) tek doz %0,9'luk NaCl enjeksiyonu yapıldı.

(2) Akut LPS Grubu (n=7): Sıçanlara, 5mg/kg LPS ip. enjeksiyon uygulananarak akut endotoksemi oluşturuldu.

(3) Akut LPS + *ATRA* Grubu (n=7): Akut ip. LPS enjeksiyonunu takiben zeytinyağı içerisinde hazırlanmış toplam 50 mg/kg dozunda *ATRA* (25 mg/kg + 25 mg/kg) oral gavaj yolu ile uygulandı.

(4) Akut *ATRA* Grubu (n=7): Bu grupta bulunan sıçanlara tek doz ip. %0,9'luk NaCl enjeksiyonu yapılmasını takiben, zeytinyağında hazırlanmış toplam 50 mg/kg dozunda *ATRA* (25 mg/kg + 25 mg/kg) oral gavaj yolu ile uygulandı.

(5) Akut LPS + Zeytinyağı (Taşıt Madde Grubu) (n=3): Bu grup 3. gruba uygulanan *ATRA*'in hazırlandığı taşıt maddesinin etkinliğinin değerlendirildiği gruptur LPS enjeksiyonu ile endotoksemi oluşturulduktan sonra iki doz oral gavaj ile 5 ml/kg zeytinyağı uygulanmıştır.

3.3.2. Kronik nöroinflamasyon

(6) Salin Grubu (n=7): Bu grupta bulunan sıçanlara deney planındaki enjeksiyon günlerinde ip. %0,9'luk NaCl enjeksiyonu yapıldı.

(7) Kronik LPS Grubu (n=7): Bu grupta bulunan deneklere 0,5 mg/kg/gün dozda ip. LPS enjeksiyonu 7 gün süre ile uygulananarak endotoksemi oluşturuldu.

(8) Kronik LPS + *ATRA* Grubu (n=7): 7 gün süre ile 0,5 mg/kg/gün dozda ip. LPS enjeksiyonu ile endotoksemi oluşturulduktan sonra, sıçanlara 28 gün boyunca gavaj ile 6mg/kg dozunda zeytinyağı içerisinde hazırlanmış *ATRA* gavaj yoluyla verildi.

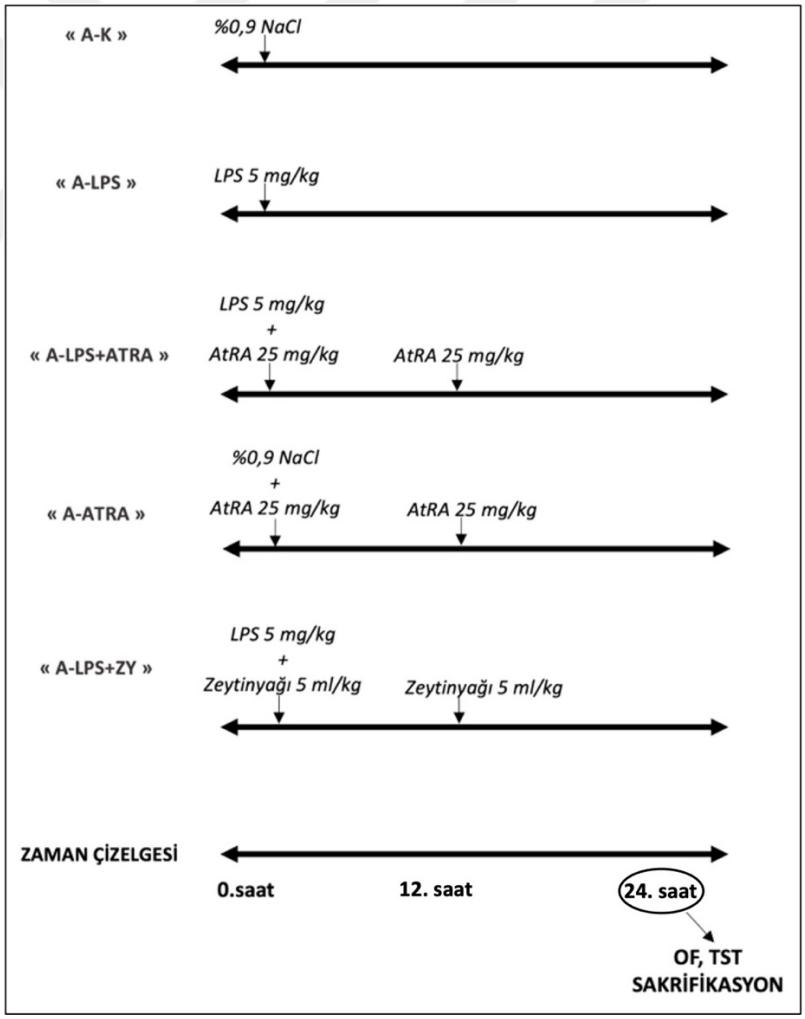
(9) Kronik *ATRA* Grubu (n=7): Bu grupta bulunan deneklere deney planındaki enjeksiyon günlerinde ip. %0,9'luk NaCl enjeksiyonu yapıldı ve 28 gün boyunca gavaj yolu ile 6 mg/kg dozunda *ATRA* uygulaması yapıldı.

(10) LPS + Zeytinyağı (Taşıt Madde Grubu) (n=3): Bu grup 3. gruba uygulanan *ATRA*'nın hazırlandığı taşıt maddesinin etkinliğinin değerlendirildiği gruptur. Sıçanlara LPS enjeksiyonu ile endotoksemi oluşturulduktan sonra 28 gün boyunca oral gavaj yolu ile zeytinyağı verildi.

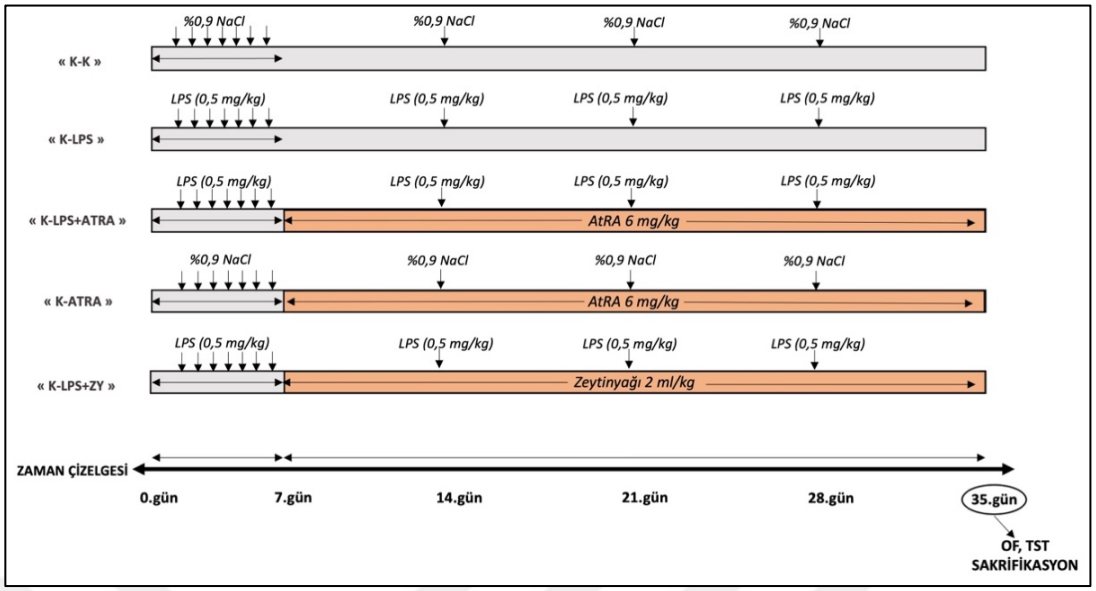
3.4. Deneysel Tasarım

Akut nöroinflamasyon gruplarında; yüksek tek bir doz (5 mg/kg) ip. LPS enjeksiyonu ile birlikte 25 mg/kg *ATRA* intragastrik gavaj ile uygulandı. Ardından 12. saatte 25 mg/kg *ATRA* uygulanması tekrarlandı ve 24. saatte davranış testleri yapıldıktan sonra deney hayvanları sakrifiye edilerek dokular toplandı (Şekil 9).

Kronik nöroinflamasyon gruplarında; 7 günlük düşük doz (0,5 mg/kg) ip. LPS enjeksiyonu ile kronik nöroinflamasyonun indüklenmesini, 28 günlük oral 6 mg/kg *ATRA* intragastrik gavaj uygulaması izledi. Kronik inflamasyonun devamlılığını sağlamak amacıyla takiben 7 günlük aralıklarla 3 idame doz (0,5 mg/kg) LPS enjeksiyonlarını içeren toplam 35 günlük süreç uygulandı. Son deney günü, davranış testleri yapıldıktan sonra deney hayvanları sakrifiye edilerek dokular toplandı (Şekil 10).



Şekil 9. Akut sistemik inflamasyon ve akut *ATRA* uygulamasını içeren deney protokolü. A-K: Akut Kontrol Grubu, A-LPS: Akut LPS Grubu, A-LPS+*ATRA*: Akut LPS ve Akut *ATRA* Grubu, A-*ATRA*: Akut Sistemik *ATRA* Grubu, A-LPS-ZY: Akut LPS +Zeytinyağı (Taşıt) Grubu.



Şekil 10. Kronik sistemik inflamasyon ve kronik *ATRA* uygulamasını içeren deney protokolü. K-K: Kronik Kontrol Grubu, K-LPS: Kronik LPS Grubu, K-LPS+*ATRA*: Kronik LPS ve *ATRA* Grubu, K-*ATRA*: Kronik Sistemik *ATRA* Grubu, K-LPS-ZY: Kronik LPS + Zeytinyağı (Taşıt madde) Grubu.

3.5. Sistemik İnflamatuvar Yanıt Üzerinden Nöroinflamasyonun İndüklenmesi

Sistemik inflamasyon, akut ve kronik sürelerde E. coli kaynaklı Lipopolisakkarit kullanılarak indüklendi. LPS kaynaklı sistemik inflamasyonun nöroinflamasyonu indüklemesi için doz seçimi, literatürde önerilen doz ve suş kullanıldı (Bossù ve ark., 2012).

3.5.1. LPS'nin hazırlanması

Akut doz için**:** Steril koşullar altında sıçan başına 5 mg/kg dozda %0,9 NaCl içersinde LPS O55: B5 (L2880, Sigma Aldrich, Almanya) 70ºC'de ısıtma ve vorteksleme yardımıyla çözdürülerek hazırlandı. Ortalama 250 gram sıçan ağırlığına 0,2 ml hacimde 1,25 mg LPS içerecek şekilde, stok solüsyonları halinde ependorflar hazırlandı ve enjeksiyona kadar -20ºC'de saklandı.

Kronik doz için: Steril koşullar altında sıçan başına 0,5 mg/kg dozda %0,9 NaCl içersinde LPS O55: B5 (L2880, Sigma Aldrich, Almanya) 70ºC'de ısıtma ve vorteksleme yardımıyla çözdürüldü ve ortalama 250 gram sıçan ağırlığına 0,1 ml hacimde 125 µg LPS içerecek şekilde stok solüsyonlar bölünerek -20ºC'de saklandı.

Stok LPS solüsyonları, -20ºC'de enjeksiyonlar için saklandı. Enjeksiyondan önce ependorf içindeki LPS karışımları oda sıcaklığına getirildi, vortekslenerek karıştırıldı.

3.5.2. Akut nöroinflamasyon ve hastalık davranışının indüklenmesi

1 haftalık uyum süreci ve handling uygulanan sıçanlara, akut hastalık davranışını indüklemek için orta-septik dozda; 5 mg/kg LPS enjeksiyonu ip. olarak (Bossù ve ark., 2012) yapıldı.

3.5.3. Kronik nöroinflamasyon ve depresyon benzeri davranışın indüklenmesi

Sıçanlarda deneysel nöroinflamatuvar mekanizma üzerinden depresyon modeli oluşturmak amacıyla LPS indüksiyonu; aydınlık döngüde, sabah 9:00-10:00 saatleri arasında 0,5 mg/kg/gün dozda ip. 7 gün süre olarak uygulandı. LPS dozu, bariz iltihaplanmaya neden olmadan sıçanlarda depresif benzeri davranışları indükleyebilmesi nedeniyle seçilmiştir (Leng ve ark., 2018). LPS, hipokampusta proinflamatuvar sitokinleri ve NF-κB aktivitesini arttırmaktadır ve en yüksek değerler 7. günde gözlenir (Qun Fu ve ark., 2014). Nöroinflamasyon kaynaklı nörodejenerasyonun devamlılığı için 7 günlük aralıklarla 0,5 mg/kg/gün tek dozluk hatırlatma dozu LPS ip. uygulanarak sistemik inflamasyonun devamlılığı sağlandı.

3.6. All Trans Retinoik Asit (*ATRA*) Uygulaması

All trans retinoik asidin akut dozu; toplamda 50 mg/kg olacak şekilde seçildi. Akut LPS indüksiyonu amacıyla ip enjeksiyon yapılırken, ilk akut *ATRA* (Galenik Kimya, İzmir) 25 mg/kg dozda oral gastrik gavaj yoluyla uygulandı. *ATRA*'in farmakokinetik özelliklerinden, uygulama sonrası serum *ATRA* konstantrasyonlarının 4.saate ciddi düşüşü nedeniyle (Jing ve ark., 2017), enjeksiyonun 12. saatinde 25 mg/kg dozda 2. *ATRA* uygulandı. Akut LPS+*ATRA* grubunun kontrolü olarak, LPS indüksiyonu yapılan ve sadece 1 ml zeytinyağı verilen sıçanlar "Akut LPS + ZY" grubu olarak belirlendi.

ATRA'nın kronik uygulaması için 7 günlük kronik inflamasyonun indüklenmesinin ardından, 28 günlük tedavi sürecinde kronik oral *ATRA* uygulama dozu 6 mg/kg olarak seçildi. *ATRA* yaklaşık 0,5 ml zeytinyağına 1,5 mg *ATRA* olacak şekilde hazırlandı. 28 gün boyunca kronik *ATRA* gruplarına ait sıçanlara oral gastrik gavaj yolu ile uygulandı. Kronik LPS+*ATRA* grubunun kontrolü olarak, LPS indüksiyonu sonrası 28 gün boyunca 0,5 ml zeytinyağı verilen sıçanlar "Kronik LPS + ZY" olarak değerlendirildi.

3.7. Davranış Testleri

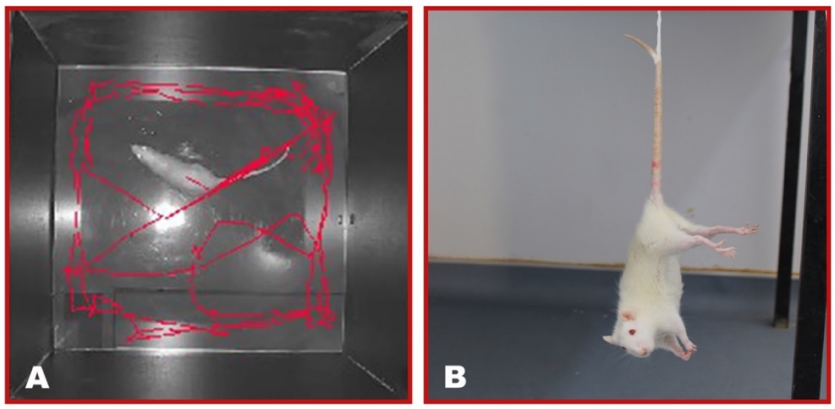
Tüm gruplara lokomotor aktivite ve anksiyete değerlendirilmesi amacıyla Açık Alan Testi, umutsuzluk davranışının değerlendirilmesi için ise Kuyruk Süspansiyon Testi uygulandı. Davranış testleri, DEHYUAM davranış labaratuvarında gerçekleştirildi. Davranış testleri sırasında koku ve ses uyaranları minimize edildi ve tüm hayvanlar aynı kişiler tarafından teste tabi tutuldu.

3.7.1. Açık alan testi (Open Field Test - OFT)

Açık AlanTesti; kemirgenlerin kaygı, depresyon, keşif davranışlarını ve genel lokomotor aktivitelerini test etmek için yaygın olarak kullanılmaktadır. Açık alan, siyah plastik duvarlarla çevrili plastik kabinden (57x57x47cm^3) oluşur. Sıçanlar kabinin merkezine yerleştirildi ve 5 dakika boyunca açık alan arenasını keşfetmelerine izin verildi (Şekil 11-A). Deneyler arasında kabin %70'lik etanol ile temizlendi. Arenanın merkezinde, periferinde ve köşelerinde geçirilen zaman ve hareketler, video takip sistemi (EthoVision XT, Noldus) tarafından kaydedildi. Güvenli olmayan alanları gönüllü olarak keşfetme durumunu değerlendirmek için kabinin orta ve periferik kısmında harcanan zaman değerlendirildi. Test kabinin köşelerinde geçirilen zaman ve köşelere giriş sayısı; depresyon ve anksiyete davranışı olarak kabul edildi (Feyissa, Aher, Engidawork, Höger, Lubec, & Korz 2017).

3.7.2. Kuyruk süspansiyon testi (Tail Suspention Test - TST)

Deney prosedüründe sıçan, yerden yaklaşık 70 cm yükseklikte bulunan bir tüpe 6 dakika boyunca kuyruğun distal 1/3'lük kısmından plaster yardımı ile asıldı (Şekil 11-B). Deneyin son 4 dakikasındaki deneklerin kaçma ve yere uzanma davranışı ile hareketsizlik davranışları kamera yardımı ile kaydedildi ve süreleri hesaplandı. Hareketsiz olarak geçirilen toplam süre ölçüldü. Deneyin gerçekleştiği ortam sessiz ve diğer hayvanların görüş açısı dışındaydı. Kuyruk süspansiyon testindeki hareketsizlik, depresyon hastalarının yaşadığı umutsuzluğun bir modeli olarak kabul edilir. Yani hayvanın kaçma çabasından vazgeçmesi, davranışsal umutsuzluk olarak yorumlandı (Cryan, Mombereaui, & Vassout, 2005; McDonald, 2015).



Şekil 11. Video takip sistemi ile tespit edilen sıçanın, 5 dakika süreyle serbest dolaşmasına izin verilerek kaydedilmesi, *Open Field Test* (A). Sıçanın yerden yaklaşık 70 cm yukarıdaki bir metal boruya plaster yardımı ile 6 dakika süre ile asılması ve kamera yardımıyla kaydedilmesi ile gerçekleştirilen, *Kuyruk Süspansiyon Testi* (B).

3.8. Kan Eldesi

Deneklerden kan örnekleri, transkardiyak yöntem ile sakrifikasyon ve perfüzyonun hemen öncesinde yaklaşık 1 ml hacimde hemositometrik yöntemle lökosit sayımı yapmak ve periferal kan yayması örnekleri hazırlamak amacıyla ependorflara alındı.

3.9. Hemositometri

Lökosit sayımı için deneklerden alınan kan örnekleri hızlıca lökosit pipeti yardımı ile 1 çizgisine kadar çekildi. Daha sonra 11 çizgisine kadar Türk eriyiği çekilerek pipetin iki açık ucu parmak yardımı ile kapatılarak nazikçe karıştırıldı. Yaklaşık 1 dakika boyunca karıştırılan kan ile Türk eriyiği karışımının ilk 3 damlası boş bir kaba akıtılarak 4. damla lamel ile kapatılmış Fuch-Rosenthal hemositometri lamının üzerine aktarıldı. Işık mikroskobunda, 10x objektifte, mikroskobun diyaframı kısılarak sayılacak alandaki çizgilerin görülmesi sağlandı. Daha sonra eşitlik olması için 5 büyük kare ve her bir büyük karenin içinde ise 16 küçük kare olacak şekilde, toplam 80 küçük karede sayım işlemi gerçekleştirildi. Sayım için seçilen her bir karenin her örnekte tek tip olması için sağ üst, sağ alt, sol üst, sol alt ve tüm karelerin tam ortasındaki kare olacak şekilde belirlendi. Büyük karelerin en içerisindeki karenin üstündeki hücreler karenin içinde kabul edilirken, en dıştaki 2. ve 3. çizginin üstündeki hücreler dışarıda olarak kabul edildi. Bu 5 alan sayıldıktan sonra elde edilen sayısal değer ilgili formülde yerine yerleştirildi ve toplam lökosit sayısı belirlendi.

3.10. Periferik Kan Yayma

Lökositlerin alt tiplerinin yüzde olarak değerlerinin belirlenmesi için deneklerden elde edilen kanlardan kan frotisi çekildi. Bu işlem için hayvandan alınan bir damla kan lam üzerine damlatıldı. Daha sonra lamel yardımı ile 45°'lik bir açı yardımıyla kan, lam üzerine yayıldı. Daha sonra kuruma işlemine bırakılan lamlar havada ve takiben metanolde tespit edildikten sonra Diff Quick boyama yapıldı.

Protokol:

- "Diff-Quik çözeltisi I" olan Eosin Y de, 15 defa daldır çıkar işlemi (boyanın fazla olan kısmı kurutma kağıdında süzülür)
- "Diff-Quik çözeltisi II" olan Metilen Mavisinde, 10 defa daldır çıkar işlemi
- Akan çeşme suyu altında hafifçe yıkama, 3 dakika
- Kurutma, takiben ksilende şeffaflaştırma ve DPX sürülerek lamel ile kapatma.

Kapatılan lamlar mikroskopta incelendi. Bu işlem için mikroskobun 40x objektifi kullanıldı. Önceden ayarlanan objektifteki mikroskoba boyanan lam yerleştirilerek üzerine immersiyon yağı damlatıldı. Daha sonra mikroskop altında, rastgele alanlardan seçilen 100 adet lökosit sayıldı. Sayılan lökositlerden nötrofil, lenfosit, monositlerin toplam sayısı belirlenerek, yüzdesel olarak bir değer verildi.

3.11. Kardiyak Perfüzyon ve Doku Eldesi

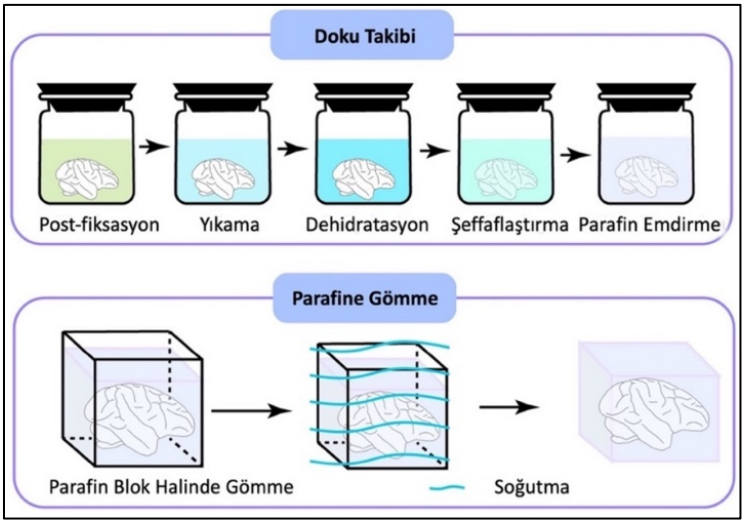
Son davranış testinin akabinde, sıçanlar yüksek doz eter inhalasyonuna maruz bırakılarak anesteziye alındı. Abdominal boşluktan başlatılan kesi genişletilerek göğüs kafesi açıldı. Peristaltik pompaya bağlı bir kanül sol ventrikülden geçilerek aortaya yerleştirildi ve sağ aurikulaya kesi yapıldı. Sıçanların transkardiyak yoldan dolaşım sistemlerine ulaşılarak, serum fizyolojik ile (%0,9 NaCI), perfüzyon pompası yardımı ile kandan arındırıldıktan sonra tamponlanmış soğuk %4 paraformaldehit (PFA) ile perfüzyon fiksasyonu uygulandı. Fiksasyon sonrası sıçanların kafatası dikkatle açıldı ve çıkarılan beyinler +4ºC'de 24 saat süreyle %4 paraformaldehit içinde postfiksasyona bırakıldı.

3.11.1. Doku takibi

+4ºC'de % 4'lük PFA solüsyonunda post-fiksasyona bırakılan beyin dokuları, çeşme suyunda yıkandı. İlgili beyin bölgeleri koronal yönde trimlendi. Ardından dokular takip kasetlerine yerleştirildi ve parafin takibine alındı. Dokuların dehidratasyonu artan dereceli etil alkol serilerinden geçirilerek, şeffaflaştırılması ksilenlerde ve parafin impregnasyonu işlemi 55ºC etüvde parafin serilerinde gerçekleştirildi. Ardından dokular rostro-kaudal yönde parafin döküm cihazı (Diapath) yardımıyla parafine gömülerek parafin blokları hazırlandı. Soğutulan bloklar, döküm kasetinden çıkarıldı. Doku takibi prosedürü Şekil 12'de özetlendi.

Protokol:

- %50'lik etil alkolde, 2 saat
- %70'lik etil alkolde, 2 saat
- %90'lık etil alkolde, 2 saat
- Absolü etil alkol I'de, 2 saat
- Absolü etil alkol II'de, gece boyu
- Ksilen I solüsyonunda, 1.5 saat
- Ksilen II solüsyonunda, 1.5 saat
- Parafin I'de, 1.5 saat
- Parafin II'de, 1.5 saat
- Parafin III'te, 1 saat



Şekil 12. Tez çalışmasında kullanılan beyin dokularının parafin blok kesitler elde edilmek amacıyla uygulanan doku takibi protokolünün grafiksel özeti. Prosedürü anlatan orijinal çizim Türkçeleştirilmiştir (Zhanmu ve ark., 2020).

3.11.2. Kesitlerin alınması

Paxinos sıçan beyin atlasındaki koordinatlara göre, hipokampusun bulunduğu yaklaşık Bregma +2,80 mm ve Bregma +4.30 mm alanlarından parafin koronal beyin kesitleri alındı. Bunun için, 1,5-1,6 mm'lik hipokampal beyin alanını değerlendirmek amacıyla mikrotom (Leica RM2245) yardımı ile 5 µm kalınlığında 10'lu seri parafin kesitler alındı ve toplam 3 adet 10'lu seri oluşturuldu. Her 10 kesit ardışık alındı, 10. kesitin sonunda 200 µm'lik alan trimlenerek atıldı. Böylelikle 10'lu seri, yaklaşık 250 µm'lik aralıklarla alınmış oldu. Krezil viyole boyaması için kullanılacak kesitler herhangi bir adhezyon özelliği olmayan normal lamlara, immünohistokimyasal analizler için kullanılacak kesitler Poly-L-lizinli lamlara alınarak, 1 gece boyunca yatay düzlemde kurumaya bırakıldı.

3.11.3. Krezil viyole metodu

Krezil viyole, nöronların sitoplazmasındaki Nissl granüllerini (poliribozomların oluşturduğu yapı) koyu mavi-mor tonlarda boyayan ve genellikle nöronların yapısal özelliklerini göstermek için kullanılan bir histokimyasal boyadır. Sıçanlara ait beyin dokusu kesitleri, krezil viyole boyama prosedürüne (100 ml distile suda 0,5 gr krezil viyole) göre boyandı. Tüm gruplardaki kesitler boyamaya dahil edilmeden önce, ön deneme kesitlerinde pilot çalışmalar yapılarak boyanın dokuya nüfuz etme süresi belirlendi.

Protokol:

- 56^{o}C etüvde, deparafinizasyon, 40 dk
- Ksilen serilerinde kesitlerin deparafinizasyonu (ksilen-I 20 dk, ksilen-II 20 dk)
- %100, %90 ve %70'lik etil alkol serilerinden geçirme, her biri 3'er dakika
- Distile suda yıkama, 3 dakika
- %0.5 lik krezil viyole'de bekletme, 2 dakika
- Distile suda yıkama, 2 dakika
- %90 lık alkolde 10 defa daldır çıkar işlemi
- Absolü alkolde 10 defa daldır çıkar işlemi
- Kesitlerin kurutulması, ksilende bekletilmesi, DPX damlatılması ve lamel ile kapatılması.

Değerlendirme:

Hipokampusun rostral, medial ve kaudal alanlarında nöron dejenerasyonunu belirlemek amacıyla Nissl boyaması yapılan kesitlerde koyu boyalı "Karanlık Nöron" olarak adlandırılan (Naseri ve ark., 2022) dejenere nöronların sayıları değerlendirildi. CA1 alanından 20x objektifte rastgele 2 eş alanda, DG için 40x objektifte 2 alan değerlendirilerek koyu boyalı nöronlar belirlendi.

3.12. İmmünohistokimyasal Analizler

3.12.1. Avidin-Biyotin Peroksidaz metodu

Tüm deney hayvanlarından poli-L-lizinli lamlara alınan hipokampal alanları içeren koronal seri beyin kesitleri, Avidin-Biyotin Peroksidaz metodu ile aşağıda belirtilen protokole uygun olarak işaretlendi. Hipokampusta mikroglia belirteci olan Iba-1'e uygun primer antikorlar kullanılarak, ilgili proteinlerin ekspresyonları immünohistokimyasal olarak belirlendi.

Protokol:

- 56ºC etüvde 40 dk ve ksilen serilerinde (ksilen-I 20 dk, ksilen-II 20 dk) kesitlerin deparafinizasyonu
- Kesitlerin kurutularak pap-pen ile sınırlandırılması
- %100, %90, %70'lik etil alkol serilerinden geçirilmesi, sırası ile 3'er dakika
- Distile suda yıkama, 3 dakika
- PBS tamponu ile yıkama, 2x5 dakika
- pH 6.0 sodyum sitrat tamponunda 98ºC'de etüvde, antijen retrieval, 30 dakika (ardından kesitler oda ısısına getirilir)
- PBS tamponu ile yıkama, 2x5 dakika
- Endojen peroksidaz aktivitesini baskılamak için, %3 hidrojen peroksit inkübasyonu, 10 dakika
- PBS tamponu ile yıkama, 2x5 dakika
- Non-spesifik bağlanmanın engellenmesi amacıyla oda sıcaklığında "Blocking Serum" uygulaması için %10'luk At serumu ile inkübasyon, 2 saat
- Primer antikor uygulaması: Tavşan-anti-Iba-1 (Cell signaling tech, ABD), 1/1000 dilüsyonda PBS-T tamponda hazırlanmış, +4ºC'de 2 gece boyunca inkübasyon
- PBS-T tamponu ile yıkama, 2x5 dakika

- PBS tamponu ile yıkama, 1x 5 dakika
- Biyotin ile konjuge sekonder antikor uygulaması: Biyotin ile konjuge eşek anti-tavşan sekonder antikor (Jackson Immunoresearch, İngiltere) ile 1/400 dilüsyonda oda sıcaklığında 2 saat inkübasyon
- PBS-T tamponu ile yıkama, 2x5 dakika
- PBS tamponu ile yıkama, 1x5 dakika
- ABC kompleksi ile oda sıcaklığında inkübasyon, 1 saat (ABC kompleksi en az yarım saat önce hazırlanarak çalkalanır.)
- PBS-T tamponu ile yıkama, 2x5 dakika
- PBS tamponu ile yıkama, 1x5 dakika
- DAB ile protein işaretlemelerinin görselleştirilmesi
- PBS tamponu ile yıkama, 2x5 dakika Metyl green ile zıt boyama, 2 dakika
- Distile suda fazla boyanın akıtılması, 10 defa daldır çıkar işlemi
- Absolü alkolden geçirme, 10 defa daldır çıkar işlemi
- Kurutma, ksilende şeffaflantırma ve DPX ile kapatma

3.12.1.1. Iba-1 İmmünohistokimyası ve Değerlendirmeleri

Hipokampal dokudaki mikroglia sayıları ve mikroglial aktivasyonun morfolojik belirtilerini değerlendirmek için, Iba-1 antikoruna bağlı kompleks ile işaretlenen kesitler fotoğraflandı. Her denekte 2 kesit/4 hipokampal alan değerlendirildi. DG ve CA1'in içine alacak şekilde 8800 piksel çevresi olan dairenin içindeki Iba-1 pozitif boyanan hücreleri ölçmek için Qupath 0.4.4 yazılımı kullanıldı. Otomatik hücre sayımı için, DAB için kullanılan eşik değer standardize edildikten sonra pozitif hücreler belirlendi ve kaydedildi.

3.12.2. İmmünofloresans işaretleme metodu

Poli-L-lizinli lamlara alınan koronal seri beyin kesitlerinde, immünofloresans işaretleme metodu ile hipokampal alanlarda EphA4 ve EphB2 reseptör proteinlerin ekspresyonları belirlendi.

Protokol:

- 56ºC etüvde 40 dk ve ksilen serilerinde (ksilen-I 20 dk, ksilen-II 20 dk) kesitlerin deparafinizasyonu

- Kesitlerin kurutularak pap-pen ile sınırlandırılması
- %100, %90, %70'lik etil alkol serilerinden geçirilmesi, sırası ile 3'er dakika
- Distile suda yıkama, 3 dakika
- pH 6.0 sodyum sitrat tamponunda 98^{o}C etüvde antijen retrieval, 30 dakika (ardından kesitler oda ısısına getirilir.)
- PBS tamponu ile yıkama, 2x5 dakika
- Non-spesifik bağlanmanın engellenmesi amacıyla oda sıcaklığında "Blocking Serum" uygulaması için %10'luk at serumu ile inkübasyon, 2 saat
- Primer antikor uygulaması (Detaylar bölüm 3.12.2.1 de verilmiştir.)
- PBS-T tamponu ile yıkama, 2x5 dakika
- Floresan konjuge sekonder antikor uygulaması (Detaylar bölüm 3.12.2.1 de verilmiştir.)
- PBS-T tamponu ile yıkama, 2x5 dakika
- PBS tamponu ile yıkama, 1x5 dakika
- Kurutulan kesitlerin, DAPI içeren kapatma materyeli uygulanarak lamel ile kapatılması

3.12.2.1. EphA4 ve EphB2 immünohistokimyası ve değerlendirmeler

Hipokampal dokuda EphA4 ekspresyonunu değerlendirmek için, primer antikor olarak fare-anti-EphA4 antikoru (sc-365503, Santa Cruz Biotechnology, ABD) 1/200 dilüsyonda PBS tampon içerisinde hazırlanarak kullanıldı. 2 gece boyunca kesitler +4^{o}C'de primer antikor ile inkübe edildi. Sekonder antikor olarak; Alexa flour 594 eşek anti-fare sekonder antikoru (Thermo Fisher Scientific, ABD) 1/800 dilüsyonda PBS tampon içerisinde hazırlandı ve oda sıcaklığında 2 saat süreyle inkübasyon uygulandı.

Hipokampal dokuda EphB2 ekspresyonunu değerlendirmek için, primer antikor olarak fare-anti-EphB2 antikoru (sc-130752, Santa Cruz Biotechnology, ABD) 1/200 dilüsyonda PBS tampon içerisinde hazırlanarak kullanıldı. 2 gece boyunca kesitler +4^{o}C'de primer antikor ile inkübe edildi. Sekonder antikor olarak; FITC-konjuge eşek anti-fare sekonder antikoru (Jackson Immunoresearch, İngiltere) PBS içerisinde 1/800 dilüsyonda hazırlanarak, oda sıcaklığında 2 saat inkübasyon uygulandı.

Değerlendirme:

EphA4 ve EphB2 değerlendirmeleri birbirine ardışık kesitlerde immünuofloresans işaretlemeler yapılarak gerçekleştirildi. Değerlendirmeler Eph reseptörlerinin ekspresyonlarının bildirildiği hipokampusun CA ve DG alanlarında hücresel ve uzantıları içeren alt katmanlarında gerçekleştirildi (Murai ve ark., 2003; Murai ve ark., 2003; Wu ve ark., 2020). İşaretlenen hipokampusun CA1, CA3 ve DG'un histolojik katmanlarında reseptör ekspresyonunun kantitatif değerlendirmesi için kesitler floresan ataçmanlı fotomikroskopla (Olympus BX–50, mikroskop ve Olympus DP71 CCD color camera) fotoğraflandı. Tüm resimler her büyütme için, veri varyasyonunu en aza indirmek için ISO ve pozlama değeri (Exposure time) standardize edilerek, eş değerde fotoğraflandı. Fotoğraflar Image-J yazılımına aktarıldı ve 8 bit gri tonlamalı görüntüye dönüştürüldü. Her denekten 2 kesit analiz edildi, hipokampusun her histolojik katmanı için Image-J yazılımıyla rastgele 5 eş alan seçilerek floresans ışıma yoğunluğu ölçüldü ve kaydedildi

3.13. TUNEL Metodu

Poli-L-lizinli lamlara alınan koronal seri beyin kesitlerinde hipokampal alanlardaki apoptozun değerlendirmesi amacıyla APOPTAG kiti (s7100, Merck Millipore, Almanya) kullanıldı. TUNEL pozitif hücre işaretlemeleri için metot, ticari firmanın önerdiği protokole uygun olarak gerçekleştirildi.

Protokol:

- Parafin beyin kesitlerinin 56^{o}C'de etüv ile deparafinizasyonu, 40 dakika
- Ksilen-I ve Ksilen- II'de deparafinizasyon işleminin tamamlanması, her birinde 20 dakika
- Kesitlerin kurutulması, pap-pen ile sınırlandırılması
- %70, %90, %96'lık etil alkol serilerinde bekletme, sırası ile 3'er dakika
- PBS tamponu ile yıkama, 2x5 dakika
- 1/9 dilüsyonda hazırlanan Proteinaz K damlatılarak enzimatik antijen retrieval, oda sıcaklığında 15 dakika
- Distile su ile yıkama, 2x5 dakika
- %3 H_2O_2 ile endojen peroksidaz baskılanması, 10 dakika

- PBS tamponu ile yıkama, 2x5 dakika
- Ticari kit içeriğindeki *"Equlibriation* tampon" da oda sıcaklığında inkübasyon, 5 dakika
- Kesitlerin aspire edilmesi sonrası 3/7 oranında "*TdT* enzim"/"Reaksiyon tampon" hazırlanarak ve 37^{o}C etüvde inkübasyon, 1 saat
- PBS tamponu ile yıkama, 3x1 dakika
- Ticari kit içeriğindeki "*Anti- Digoxigenin*" ile oda sıcaklığında inkübasyon, 30 dakika
- PBS tamponu ile yıkama, 2x5 dakika
- İşaretlemelerin DAB ile görselleştirilmesi, 4 dakika
- PBS tamponu ile yıkama, 2x5 dakika
- Distile suda bekletme, 5 dakika
- Metyl green ile zıt boyama, 2 dakika
- Distile suda fazla boyanın akıtılması, 10 defa daldır çıkar işlemi
- Absolü alkolden geçirme, 10 defa daldır çıkar işlemi
- Kesitler kurutulması, ksilenlerde bekletildikten sonra DPX ile kapatılması

Değerlendirme:

TUNEL pozitif hücreleri değerlendirmek için hipokampusun Dentat girusun apeksine yakın, alanından ışık mikroskobunda 40x objektifte değerlendirme yapıldı, TUNEL pozitif hücreler belirlenerek sayıldı.

3.14. İstatistiksel Analizler

Sonuçların anlamlı olup olmadıklarının belirlenmesi, verilerin ortalama ± ortalama standart sapmaları hesaplanarak ve gruplar arasındaki istatistiksel fark, SPSS 23.0 programı kullanılarak (IBM) hesaplandı.

Öncelikle, gruplara ait verilerin normal dağılımda olup olmadığı Shapiro-Wilk Testi ile değerlendirildi. Shapiro-Wilk testi ile elde edilen değerin p değeri 0,05'ten büyük olması durumunda, veriler normal dağılıma uygun olarak kabul edildi. Normal dağılım gösterenler arasındaki farklılıkların değerlendirmesi için One Way ANOVA testi, normal dağılıma uymayanlar için Kruskal Wallis testi kullanıldı. Ardından gruplarda varyansların homojen dağılım gösterip göstermediği Levene's test ile analiz edildi, eğer homojen dağılım gösteriyorlarsa One Way ANOVA testi uygulandı,

homojen dağılım göstermiyorsa Kruskal Wallis testi ile değerlendirme yapıldı. Her iki test için Bonferroni düzeltmesi uygulandı. İstatistiksel anlamlılık için $p < 0,05$ değeri kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. LPS ile İndüklenen Sistemik İnflamatuvar Yanıtın ve *ATRA* Uygulamalarının Toplam Lökosit Sayılarına ve Formül Lökosite Etkisi

Toplam lökosit sayıları (WBC), son deney gününde sakrifikasyon öncesi intrakardiyak ponksiyonla alınan kan kan örneklerinden hesaplanarak değerlendirildi. Gruplara ait ortalama ve standart sapma verileri, Tablo 1'de sunulmuştur.

Akut LPS uygulanan tüm gruplarda, toplam lökosit sayıları salin ve *ATRA* uygulanan her iki gruba kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azaldı. Kronik LPS uygulanan grupların (LPS ve LPS+Zy), salin verilen kontrol grubuna kıyasla toplam lökosit sayısı anlamlı ölçüde artarken, kronik LPS ile birlikte 28 günlük *ATRA* uygulaması (LPS + *ATRA*), toplam lökosit sayısını yalnızca LPS uygulanan gruba kıyasla anlamlı bir şekilde düşürdü. Bununla birlikte, salin enjeksiyonlarını takiben 28 günlük *ATRA* uygulanan grubun toplam lökosit sayıları salin grubuna benzer olmakla birlikte, kronik LPS grubundan istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksek bulundu (Şekil 13-A).

Deneklerden elde edilen kandan, formül lökosit hesaplaması ışık mikroskobunda toplam 100 lökösit (monosit, lenfosit ve nötrofil) sayılarak yüzdeleri ölçüldü. Lökositler tipik morfolojilerine göre belirlendi: Böbrek şekilli mononükleer yapıdaki çekirdeği ile monosit (Şekil 13-Bı), diğer lökositlere oranla daha küçük olan ve sitoplazması seçilmeden yoğun bazofilik boyanan çekirdeği ile lenfosit (Şekil 13-Cı), segmentli çekirdeği ile tipik olan ve granül içeren sitoplazması ile matür nötrofil (Şekil 13- Dı), segmente olmayan C şekilli çekirdeği ile gözlenen band nötrofil (Şekil 13-F, mavi ok). Matür ve band nötrofiller birlikte sayılarak mutlak nötrofilin yüzdesi belirlendi.

Monosit yüzdesi değerlendirildiğinde, akut grupların monosit yüzdeleri birbirine benzer bulundu ve gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı. Periferik kandaki toplam monosit yüzdesinin kronik LPS uygulanan (LPS, LPS+*ATRA* ve LPS+Zy) gruplarda, salin grubu ile karşılaştırıldığında belirgin bir şekilde arttığı gözlendi ve bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulundu. Sadece *ATRA* verilen kronik grupta salin grubu ile karşılaştırıldığında monosit yüzdesinin azaldığı gözlendi, fakat bu azalma istatistiksel olarak anlamlı değildi. Kronik LPS

verilen gruplarda (LPS, LPS+*ATRA* ve LPS+Zy) monosit yüzdesi bakımından gözlenen artış, kronik sadece *ATRA* verilen gruba göre istatistiksel olarak anlamlı bulundu (Şekil 13-B).

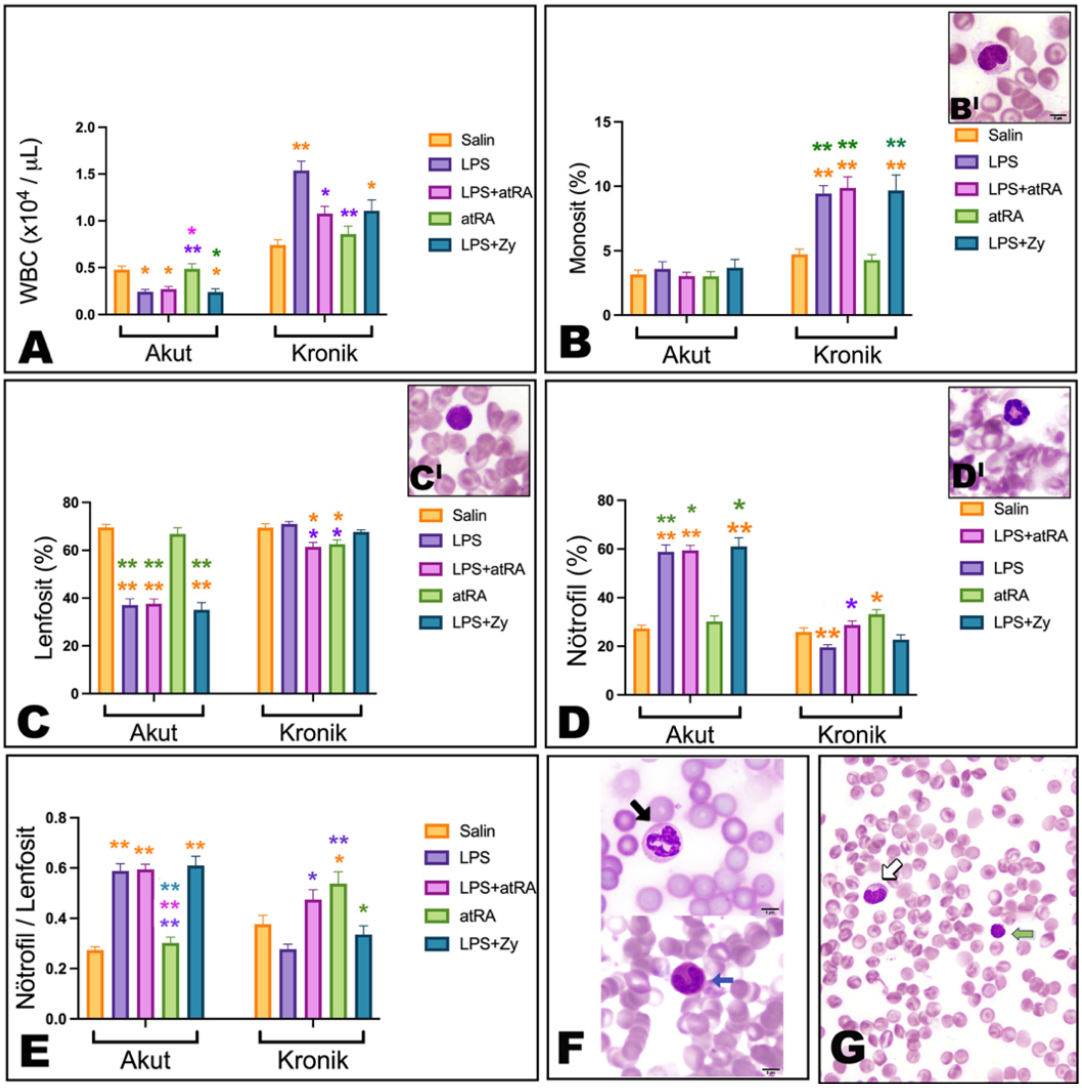
Lenfosit yüzde değerlendirmesinde; LPS verilen akut gruplarda (LPS, LPS+*ATRA* ve LPS+Zy), akut salin grubuna göre lenfosit yüzdelerinde istatistiksel anlamlılığın olduğu belirgin bir azalma saptandı. *ATRA* verilen kronik gruplar (LPS+*ATRA* ve *ATRA*), salin grubu ve kronik LPS grupları ile karşılaştırıldığında lenfosit yüzdesi bakımından istatistiksel olarak anlamlı bulunan belirgin bir azalış belirlendi (Şekil 13-C).

Nötrofil oranı açısından; akut salin grubu ve akut *ATRA* grubu birbirine benzer bulunmakla birlikte, LPS verilen tüm gruplarda (LPS, LPS+*ATRA*, LPS+Zy) akut salin ve akut *ATRA* gruplarına kıyasla, nötrofil oranında belirgin bir artış saptandı ve bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulundu. Genel anlamda, akut LPS uygulanan hayvanların çoğunluğunda, lökosit yüzdesini büyük oranda band ve matür nötrofillerin oluşturduğu dikkati çekti (Şekil 13-F). Kronik grupların değerlendirmesinde, kronik salin grubu ile diğer kronik gruplar karşılaştırıldığında sadece *ATRA* verilen grupta nötrofil yüzdesindeki artış istatistiksel olarak anlamlı bulundu. *ATRA* verilen her iki grupta (LPS+*ATRA* ve *ATRA*) kronik LPS grubuna kıyasla nötrofil oranında istatistiksel olarak da anlamlı bulunan artış belirlendi. Benzer şekilde *ATRA* grubunda LPS+Zy grubuna kıyasla gözlenen nötrofil sayısındaki artış, istatistiksel olarak anlamlıydı (Şekil 13-D).

Nötrofil ve lenfosit yüzdelerinin birbirine oranlanması ile hesaplanan N/L oranı akut gruplar arasında değerlendirildiğinde; artmış nötrofil yüzdesine bağlı bir şekilde akut LPS verilen grupların tamamında (LPS, LPS+*ATRA* ve LPS+Zy) salin kontrollerine kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir artış saptandı. Nötrofil/lenfosit oranı, kronik LPS grubunda kronik salin grubuna göre azalma eğilimi göstermiş olsa da bu azalış istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. Kronik *ATRA* uygulamaları, nötrofil yüzdelerinin artışına bağımlı olarak kronik grup içerisinde en yüksek N/L oranlarına neden oldu. Salin grubu ile karşılaştırıldığında kronik *ATRA* grubunda N/L oranı, LPS grubuyla karşılaştırıldığında kronik LPS+*ATRA* grubu istatistiksel olarak anlamlı N/L oranı gösterdiler (Şekil 13-E).

Tablo 1: Toplam lökosit sayısı ve formül lökosit sayılarının ortalama değerleri ve standart sapma değerleri

		Salin	LPS	LPS+ATRA	ATRA	LPS+ZY
Akut Gruplar	**WBC**	0,47 ± 0,039	0,24 ± 0,02	0,27 ± 0,02	0,48 ± 0,05	0,24 ± 0,03
	Lenfosit	69,57 ± 1,26	37 ± 2,68	37,57 ± 2,09	66,85 ± 2,55	35 ± 3,05
	Nötrofil	27,28 ± 1,35	58,85 ± 2,84	59,42 ± 2,08	30,14 ±2,28	61 ± 3,60.
	Monosit	3,14 ± 0,34	3,57 ± 0,57	3 ± 0,30	3 ± 0,36	3,66 ± 0,66
	N/L	0,27 ± 0,01	0,58 ± 0,02	0,59 ± 0,02	0,30 ± 0,02	0,61 ± 0,03
Kronik Gruplar	**WBC**	0,74 ± 0,05	1,53 ± 0,09	1,07 ± 0,07	0,85 ± 0,08	1,20 ± 0,09
	Lenfosit	69,42 ± 1,67	71 ± 1,02	61,42 ± 1,87	62,57 ± 1,78	67,66 ± 0,88
	Nötrofil	25,85 ± 1,71	19,57 ± 1,08	28,71 ± 1,65	33,14 ±1,92	22,66 ± 2,02
	Monosit	4,71 ± 0,42	9,42 ± 0,61	9,85 ± 0,85	4,28 ± 0,42	9,66 ± 1,20
	N/L	0,37 ± 0,03	0,27 ± 0,01	0,47 ± 0,03	0,53 ± 0,04	0,33 ± 0,03



Şekil 13. Sistemik LPS ve *ATRA* uygulamalarının periferik lökositlere etkisi. Deney gruplarına ait total lökosit sayıları (A), monosit (B), lenfosit (C), nötrofil yüzdeleri (D) ve nötrofil/lenfosit oranlarının (E) istatistiksel değerlendirme grafikleri. Kan yayma analizlerinden değerlendirilen lökositlere ait temsili mikrograflar: monosit, B'; lenfosit, C'; nötrofil, D'. Akut gruplara ait kan yayma örnekleri, siyah ok matür nötrofil ve mavi ok band nötrofil (F). Kronik gruplara ait kan yayma örneği, beyaz ok monosit, yeşil ok lenfosit (G). Veriler ortalama ± standart sapma olarak sunulmuştur. *p <0,05; ** p <0,001.

4.2. Davranış Testlerinin Sonuçları

Tüm gruplarda sakrifikasyon öncesi, anksiyete benzeri davranışların değerlendirilmesi için OFT'de merkezde geçirilen süre, merkeze giriş sıklığı, merkeze ilk giriş gecikmesi ve lokomotor aktivitenin değerlendirilmesi amacıyla, katedilen toplam mesafe ve hayvanın hızı değerlendirildi. Depresyon değerlendirmesi için de "umutsuzluk" testi olan TST'de, toplam immobilizasyon süresi ile değerlendirildi.

4.2.1. Akut sistemik inflamasyonun ve *ATRA*'in anksiyete ve depresyon davranışına etkisi

Akut sistemik LPS enjeksiyonundan 24 saat sonra ve son *ATRA* uygulamasından 12 saat sonra davranış testleri gerçekleştirildi. Açık alan arenasındaki toplam 5 dakika sürenin tüm gruplara ait temsili fotoğrafları olarak, hareketin video kayıt sistemindeki çizimleri ve arenanın bölgelerinde bulunma süresini temsil eden ısı haritaları verilmiştir (Şekil 14A,B,C,E).

TST'nin son 4 dakikasında LPS grubunun immobilizasyon süresinde, salin grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir artış izlendi. LPS verilen grupta *ATRA* verilen gruba göre hareketsiz kalım süresinde gözlenen artış da istatistiksel olarak anlamlı bulundu. LPS+ *ATRA* uygulaması, immobilizasyon süresini kısmen düşürdü. Yüksek doz *ATRA*'in 12 saat ara ile ardışık uygulanması, LPS'nin indüklediği hastalık davranışını hafifleterek immobilizasyon süresini azaltmıştır. Bununla birlikte LPS+Zy uygulamasının, LPS uygulanan gruba göre TST'de hareketsizlik üzerinde anlamlı bir etkisinin olmadığı görülmüştür (Şekil 14D).

Açık alan testlerinde merkeze giriş sıklığının; salin grubuna göre tüm gruplarda (LPS, LPS+*ATRA*, *ATRA* ve LPS+Zy) belirgin bir azalma gösterdiği dikkati çekti. En belirgin azalma LPS+Zy grubunda gözlenirken salin grubuna en yakın grup, sadece *ATRA* verilen grup olduğu görüldü. Tüm gruplarda gözlenen bu azalma, istatistiksel olarak anlamlı bulundu. Bu bulgu, hastalık davranışında 5 mg/kg LPS'nin hastalık davranışında gözlenen tipik bulguları sağladığını göstermektedir (Şekil 14F).

Açık alan testlerinde merkezde geçirilen zaman açısından; LPS, LPS+*ATRA* ve LPS-Zy gruplarının salin kontrollerine kıyasla daha az vakit geçirdikleri gözlendi ve istatistiksel olarak anlamlı bulundu. Sadece *ATRA* verilen grupta salin grubuna göre azalış görülse de bu azalış istatistiksel olarak anlamlı değildi. LPS grupları kendi arasında istatistiksel olarak karşılaştırıldığında, her üç grup arasında gözlenen farklar istatistiksel olarak anlamsızdı. LPS grubuna göre LPS+*ATRA* grubunda az miktarda bir artış gözlendi ancak istatistiksel olarak anlamlı değildi. Bu sonuçlara göre; LPS gruplarında gözlenen merkezde zaman geçirme süresindeki belirgin azalma, LPS'nin hastalık davranışlarında belirgin bir değişikliğe neden olduğunu göstermiştir. Ayrıca LPS+*ATRA* grubunda ve sadece *ATRA* grubundaki sürelerin LPS ve LPS+Zy grubuna göre yüksek olması, *ATRA*'nın akut inflamasyon sürecinde az da olsa olumlu bir etkisi

olduğunu göstermiştir (Şekil 14G).

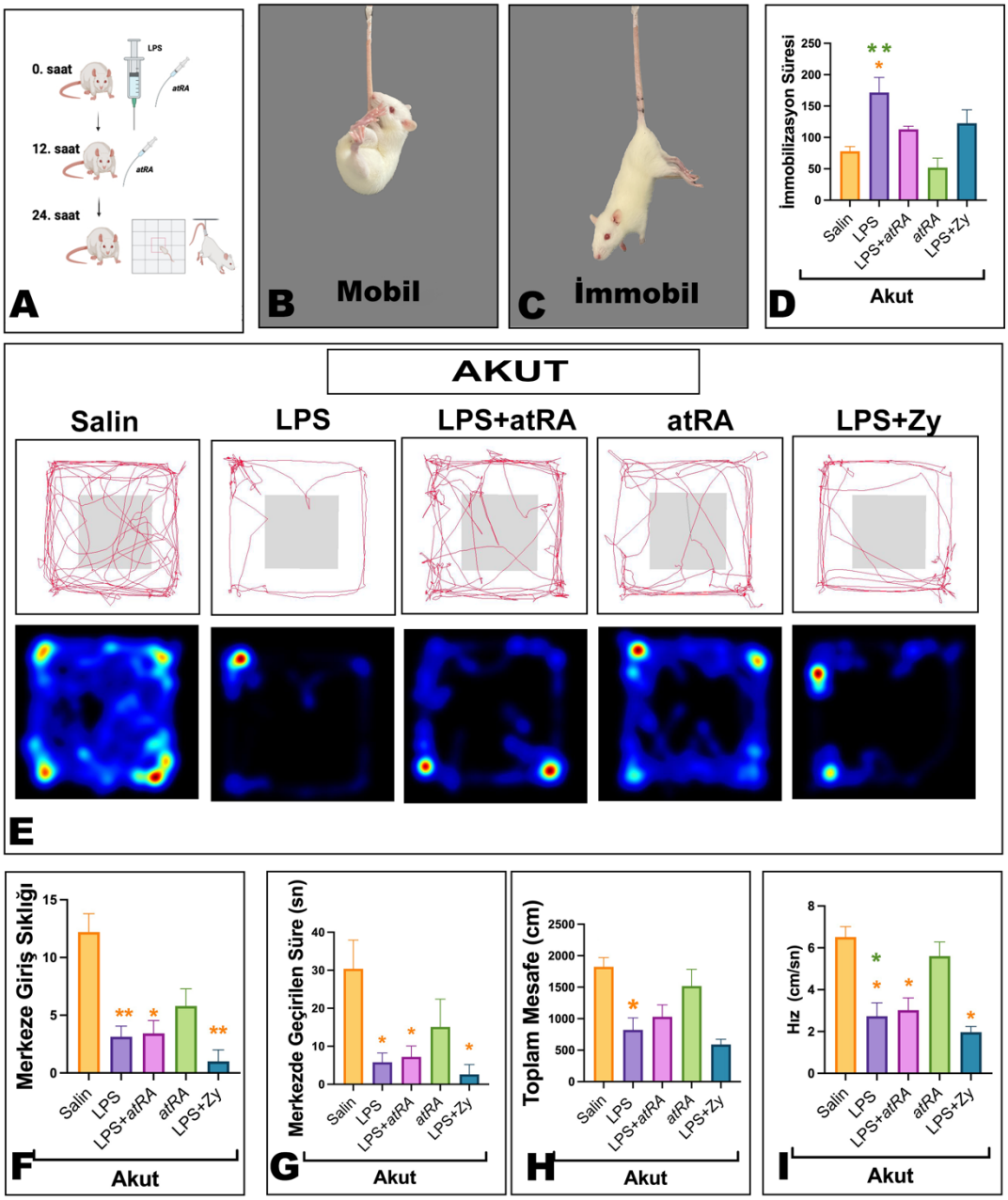
Açık alan testlerinde incelenen toplam mesafe (cm) açısından; salin grubuna göre diğer tüm gruplarda azalma saptandı. Ancak salin grubu ile sadece LPS verilen grup arasında gözlenen azalma, istatistiksel olarak anlamlı bulundu. LPS ve LPS+Zy grupları, *ATRA* verilen gruplar (LPS+*ATRA* ve *ATRA*) ile kıyaslandığında; LPS gruplarının daha az mesafe kat ettiği fakat bu farkın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı dikkati çekti. Yine de *ATRA* uygulamasının akut inflamasyon üzerinde az da olsa olumlu etkisi olduğu düşünüldü (Şekil 14H).

Açık alan testlerinde ortalama hız incelendiğinde; salin grubuna göre LPS verilen gruplarda (LPS, LPS+*ATRA* ve LPS+Zy) belirgin bir azalma gözlendi ve istatistiksel olarak anlamlı bulundu. Salin grubuna göre *ATRA* grubunda gözlenen hızdaki azalma, istatistiksel olarak anlamlı değildi. LPS enjeksiyonu yapılan akut grup ile *ATRA* uygulaması yapılan akut grup karşılaştırıldığında, LPS grubunda hız bakımından belirgin bir azalma dikkati çekti ve bu azalma istatistiksel olarak anlamlıydı (Şekil 14I).

Akut gruplara ait davranış testlerinin değerlendirme sonuçları, ortalama ve standart sapma şeklinde Tablo 2'de sunulmuştur.

Tablo 2: Akut gruplara ait davranış testlerininin ortalama değer ve standart sapma değerler tablosu

Akut Gruplar		**Salin**	**LPS**	**LPS+ATRA**	**ATRA**	**LPS+ZY**
OFT	**Merkezde geçirilen zaman**	30,4 ± 7,53	5,8 ± 2,43	7,22 ± 2,86	15,1 ± 7,31	2,56 ± 0,59
	Merkeze giriş sıklığı	12,2 ± 1,59	3,14 ± 0,9	3,42 ± 1,1	5,8 ± 1,49	1 ± 1
	Toplam Mesafe	1822,43 ± 148,65	819,25 ± 191,66	1030,63 ± 189,50	1517,36 ± 266,75	589,99 ± 82,24
	Hız	6,51 ± 0,49	2,72 ± 0,63	3,02 ± 0,58	5,6 ± 0,67	1,97 ± 0,26
TST	**İmmobilizasyon süresi**	78 ± 7,518	171,6 ± 23,89	113 ± 4,88	51,8 ± 5,22	122,5 ± 21,5



Şekil 14. Sistemik akut LPS enjeksiyonunun davranışsal sonuçları. Akut grupların, deneysel tasarımı (A). Kuyruk süspansiyon testi, mobil sıçan (B), immobil sıçan (C) ve test sonucundaki grupların istatistiksel değerlendirme sonuçları (D). Akut Salin, LPS ve *ATRA* gruplarında açık alan testinde tipik keşif davranışını gösteren temsili görüntüler (E, üst panel) ve ısı haritası görselleştirmeleri (E-alt panel). Açık alan testi davranış bulgularının gruplar arasındaki karşılaştırılmaları (F, G, H, I). Veriler ortalama ± standart sapma olarak sunulmuştur. * p <0,05; ** p <0,001. Grafiksel çizim, yazar tarafından, https://www.biorender.com üzerinden oluşturulmuştur.

4.2.2. Uzun süreli kronik sistemik inflamasyonun ve *ATRA*'in anksiyete ve depresyon davranışına etkisi

Kronik dönem nöroinflamasyonun anksiyete ve depresyon davranışı üzerine etkilerini değerlendirmek amacıyla davranış testleri gerçekleştirildi. Açık alan arenasındaki toplam 5 dakika sürenin tüm gruplara ait temsili fotoğrafları olarak, hareketin video kayıt sistemindeki çizimleri ve arenanın bölgelerinde bulunma süresini temsil eden ısı haritaları verilmiştir (Şekil 15A,B,C,E). Gruplara ait sonuçlar ortalama ve standart sapma değerleri olarak, Tablo 3'te verilmiştir.

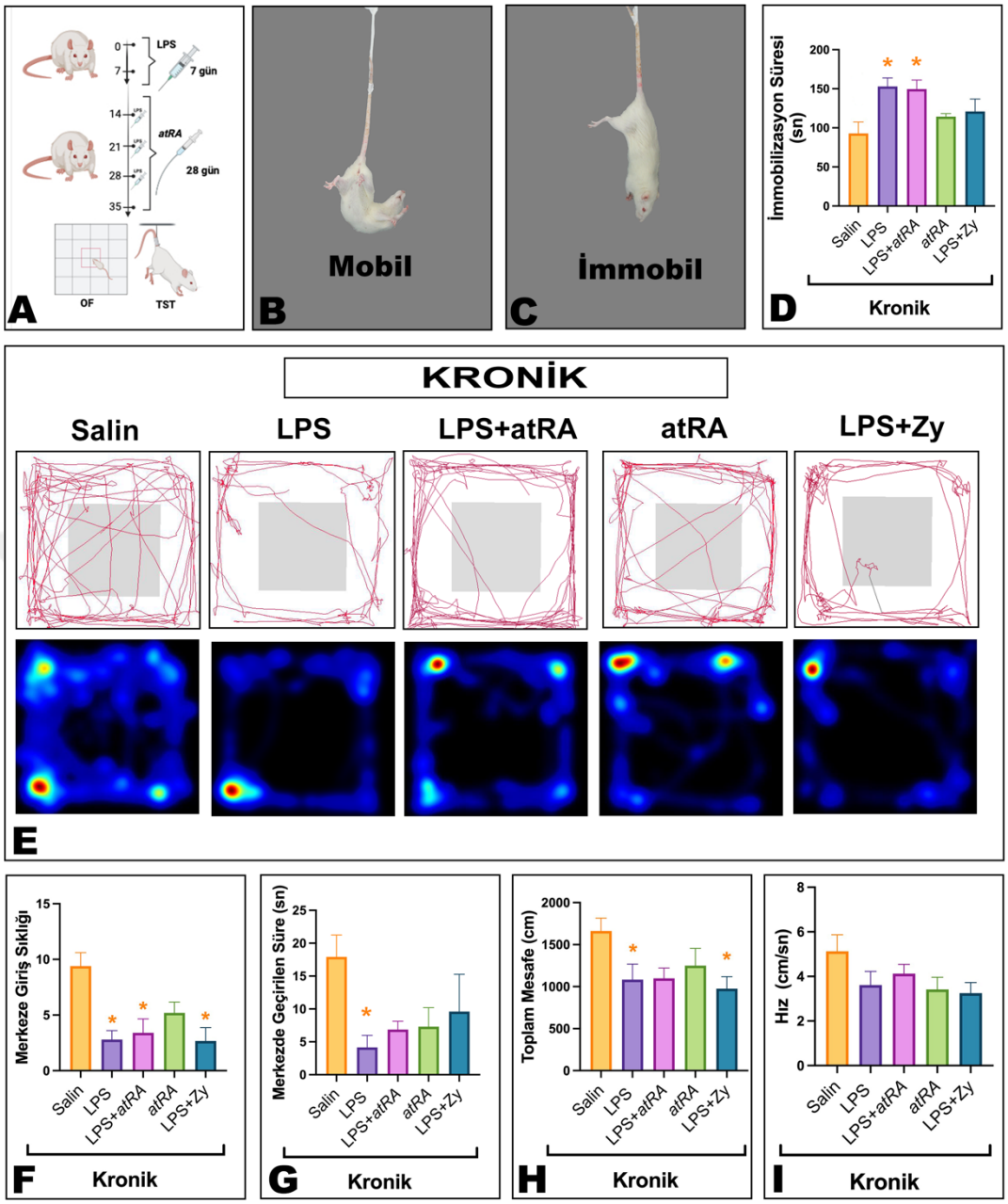
LPS ve LPS+*ATRA* gruplarında kontrole göre immobilizasyon süresinde görülen artış, 0,5 mg/kg dozda LPS'nin kronik uygulanmasında hastalık davranışında gözlenen tipik bulguları sağladığını göstermektedir. Uygulanan dozda *ATRA*'nın bu süreçte kontrol grubuna yakın değer gösterdiği, ancak LPS'nin indüklediği hastalık davranışında umutsuzluğu düzeltmediği gözlenmiştir (Şekil 15D).

Açık alan testinde merkeze giriş sıklığında; LPS verilen tüm kronik gruplarda (LPS, LPS+*ATRA* ve LPS+Zy) kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir azalma gözlendi (Şekil 15F). Merkezde geçirilen sürenin LPS grubunda kontrol grubuna göre anlamlı olarak azaldığı görüldü (Şekil 15G). Kronik *ATRA* uygulamasının merkeze giriş sıklığını ve merkezde geçirilen süreyi kontrol grubuna göre azalttığı görülmekle birlikte istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı (Şekil 15F,G). Açık alan testinden elde edilen bu bulgular, kronik LPS ve LPS-*ATRA* kombinasyon uygulamalarının orta yaşlı dişi sıçanlarda anksiyete benzeri fenotipi indüklediğini göstermekle birlikte, kronik *ATRA* uygulamasının inflamasyonun olmadığı sağlıklı koşullarda da sıçanlarda anksiyeteyi arttırabileceğini düşündürmektedir. Açık alan testinde toplam katedilen mesafe incelendiğinde; salin grubuna göre diğer tüm gruplarda azalma olmakla birlikte, LPS ve LPS+Zy gruplarındaki azalmalar istatistiksel olarak anlamlı bulundu (Şekil 15H).

Açık alan testlerinde ortalama hız incelendiğinde; salin grubuna göre diğer tüm gruplarda (LPS, LPS+*ATRA* ve LPS+Zy) azalma gözlenmekle birlikte istatistiksel olarak anlamlılık bulunmadı (Şekil 15I).

Tablo 3: Kronik gruplara ait davranış testlerininin ortalama değeri ile standart sapma tablosu.

Kronik Gruplar		Salin	LPS	LPS+ATRA	ATRA	LPS+ZY
OFT	Merkezde geçirilen zaman	17,92 ± 3,32	4,16 ± 1,83	6,86 ± 1,26	7,32 ± 2,87	9,6 ± 5,66
	Merkeze giriş sıklığı	9,4 ± 1,2	2,8 ± 0,8	3,4 ± 1,24	5,2 ± 0,96	2,66 ± 1,2
	Toplam Mesafe	1662,3 ± 153,14	1083,56 ± 184,12	1098,59 ± 123,43	1250,47 ± 204,25	975,67 ± 143,10
	Hız	5,12 ± 0,74	3,60 ± 0,61	4,12 ± 0,42	3,41 ± 0,54	3,25 ± 0,47
TST	İmmobilizasyon süresi	92,8 ± 14,75	153 ± 10,83	149,5 ± 11,72	114,4 ± 3,84	121 ± 16



Şekil 15. Sistemik kronik LPS'nin ve *ATRA*'nın davranışsal sonuçları. Kronik grupların, deneysel tasarımı (A). Kuyruk süspansiyon testi, mobil sıçan (B), immobil sıçan (C) ve grupların istatistiksel değerlendirme sonuçları (D). Kronik Salin, LPS ve *ATRA* gruplarında açık alan testinde tipik keşif davranışını gösteren temsili görüntüler (E, üst panel) ve ısı haritası görselleştirmeleri (E-alt panel). Açık alan testi davranış bulgularının gruplar arasındaki karşılaştırılmaları (F, G, H, I). Veriler ortalama ± standart sapma olarak sunulmuştur. * p <0,05; ** p <0,001. Grafiksel çizim, yazar tarafından, https://www.biorender.com üzerinden oluşturulmuştur.

4.3.Hipokampusun Histopatolojik Değerlendirmeleri

4.3.1. Akut gruplardaki histopatolojik değişiklikler

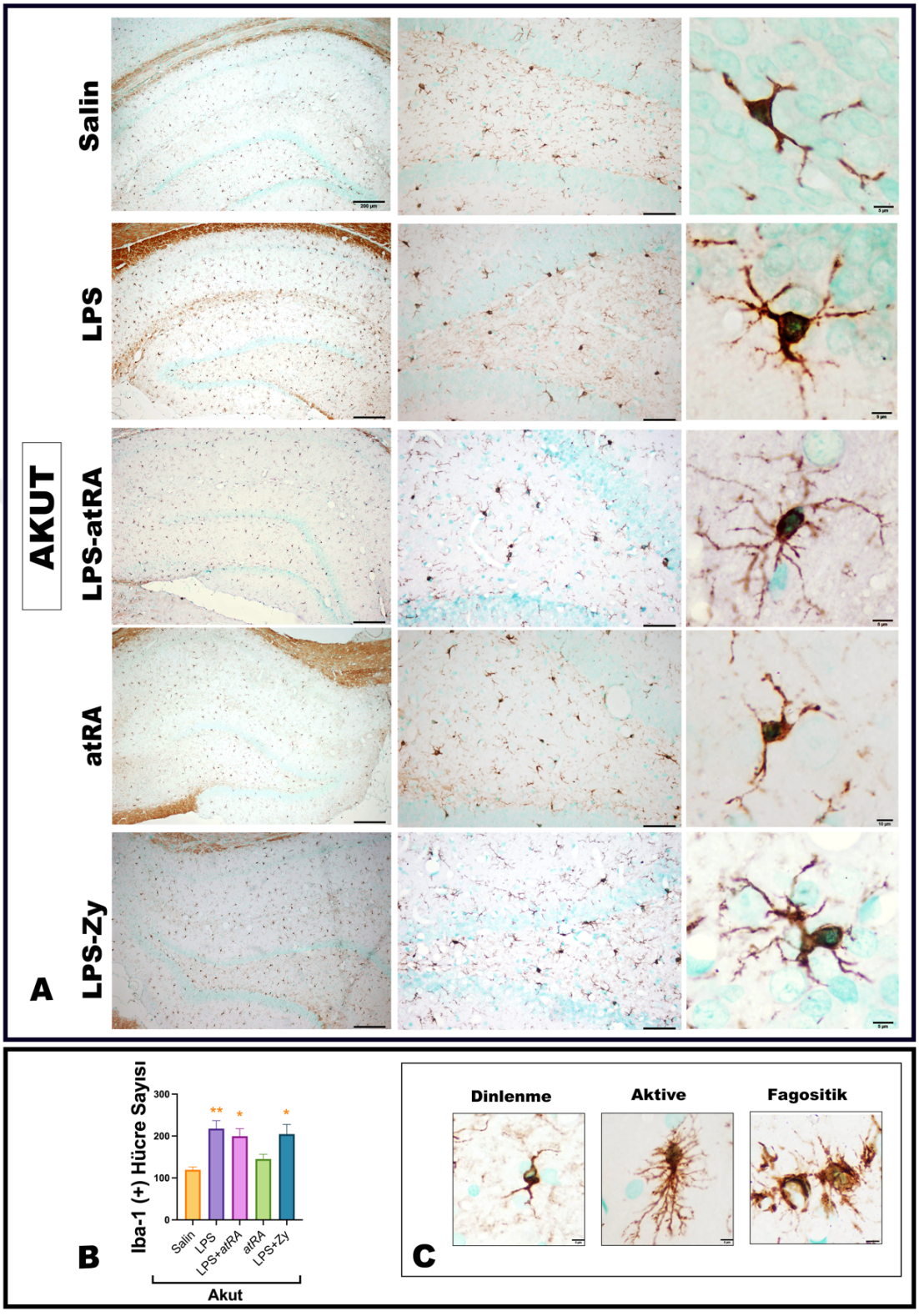
4.3.1.1. Akut sistemik LPS'in ve *ATRA*'nın hipokampal mikroglialara etkisi

Sistemik 5 mg/kg dozda LPS ve 50 mg/kg *ATRA* uygulamalarının, hipokampusta mikroglial yanıt ile ilgili nöroinflamatuvar değişiklikleri incelendi. Mikroglial yanıtın histopatolojik değerlendirmesi için, Iba-1 immünohistokimyası ile mikroglialar işaretlenerek elde edilen boyamalar fotoğraflandı. Kesitlere ait fotoğraflarda, hipokampusun dentat girus ve CA1 alanlarını içine alacak şekilde her kesit için eş alanda ölçülerek mikrogliaların sayıları gruplar arasında değerlendirildi. Aynı zamanda mikrogliaların morfolojik değişiklikleri yorumlandı. Gruplara ait değerlendirme sonuçları, ortalama ve standart sapma şeklinde, Tablo 4'de verilmiştir.

Yapılan değerlendirmelerde (Şekil 16A-B) salin grubunda; hipokampusta tipik mikroglia morfolojisi -az dallanmış ve birkaç uzantısı olan, küçük ve uzun hücre gövdeleri (Şekil 16C) izlendi. Sistemik akut LPS uygulaması ile Iba-1 (+) mikrogliaların arttığı, kontrole kıyasla ağırlıklı olarak daha uzun kaba dallanmalara -aktive (Şekil 16C) morfolojiyi yansıtan- sahip oldukları görüldü. Aktive mikrogliaların çok küçük bir kısmının daha kaba, daha kalın ve kısa dallanmaları olan, ameboid morfolojideki fagositik mikroglialar (Şekil 16C) olduğu gözlendi. LPS verilen tüm grupların (LPS, LPS+*ATRA* ve LPS+Zy) mikroglia sayılarının kontrol grubuna kıyasla artmış olduğu saptandı ve bu artış istatiksel olarak anlamlı bulundu. LPS+*ATRA* grubunda, mikrogliaların yoğunluğunda çok az da olsa ve morfoloji ile tespit edilebilen aktivasyon formunda kısmen azalma eğilimi gözlendi, ancak istatistiksel olarak anlamlı değildi. Aktive ve ameboid benzeri mikroglialar kontrol grubunda da az olmakla birlikte saptandığı için, bu durumun aktivasyonun bir göstergesi olmaktan ziyade mikrogliaların fizyolojik rollerine özgü olduklarını düşündürdü.

Tablo 4: Akut gruplardaki Iba-1 ekspresyonunun ortalama değer ve standart değer tablosu

Akut Gruplar	Salin	LPS	LPS+ATRA	ATRA	LPS+ZY
Iba-1	119,5 ± 6,83	217,7 ± 19,14	199,5 ± 17,96	145,4 ± 11,27	204,57 ± 23,34



Şekil 16. Sistemik akut LPS'nin ve *ATRA*'nın hipokampal mikroglialar üzerindeki etkileri. Akut dönem gruplarına ait Iba-1 ile işaretli hipokampusta konumlanmış mikroglialar ve gruplara mikrogliaların morfolojileri (A). Akut grupların Iba-1 (+) mikroglia sayılarının ortalama ve standart sapma grafiği ile istatistiksel olarak karşılaştırılması (B). İmmunohistokimyasal analizlerde saptanan, örnek mikroglia morfolojileri (C). Veriler ortalama ± standart sapma olarak sunulmuştur. * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$. Metil green v Anti-Iba-1, Avidin Biyotin Peroksidaz, DAB.

4.3.1.2. Akut nöroinflamasyonun ve *ATRA*'nın hipokampal nörodejenerasyona ve nöron sağkalımına etkisi

Sistemik 5 mg/kg dozda LPS ve 50 mg/kg *ATRA* uygulama sonrasında nöronal apoptoz TUNEL metodu ile, nöronal morfoloji Nissl metodu ile değerlendirildi. Gruplar arasında nöronal sağkalım ve apoptoz, TUNEL metoduyla işaretlenen hücre çekirdekleri ile, nöronal dejenerasyon Nissl boyamasında küçük, büzüşmüş ve koyu boyanan dejenere nöronları temsil eden karanlık nöronların sayılması yoluyla değerlendirildi (Şekil 17A-E).

Salin grubunda hipokampusun cornu ammonisin alanları, dentat girus ve subikular alanlarda normal histolojik yapıyı yansıttığı görüldü. CA1 bölgesinin değerlendirilmesinde, piramidal hücrelerin küresel, yan yana dizilmiş hücre gövdeleri, ökromatik çekirdek ve belirgin çekirdekçik görüldü. Benzer şekilde salin grubuna ait hipokampusun dentat girusunda, sıkıca paketlenmiş şekilde gözlenen granüler hücreler ökromatik çekirdekleri ve belirgin çekirdekçikleriyle çok katmanlı granüler hücre tabakasını oluşturduğu görüldü. CA1 ve dentat girusun değerlendirmelerinde, az sayıda koyu bazofilik sitoplazmalı "karanlık nöronlar" a rastlandı.

Akut LPS gruplarında (LPS, LPS+*ATRA*, LPS+Zy) CA1 piramidal nöronlarının değerlendirmesinde; salin grubuna ve *ATRA* grubuna kıyasla istatistiksel olarak da anlamlı artmış, koyu bazofilik sitoplazmalı, kısmen nöropilden ayrılmış ve büzüşmüş gözüken koyu ve küçük piramidal nöronların (Şekil 17B, ok) varlığı dikkati çekti. Bu koyu boyalı nöronlar dejenere nöronlar olarak tanımlandı. Dentat girusun değerlendirmesinde de benzer şekilde, LPS gruplarında salin grubuna kıyasla karanlık nöronlarda artış saptandı. *ATRA* grubundaki koyu boyalı nöron sayıları salin grubuna benzerdi ve LPS gruplarına göre daha azdı. LPS grubuna göre belirlenen azalış, istatistiksel olarak da anlamlıydı. Genel anlamda dentat girustaki değerlendirmelerde; dejenere olarak tanımlanan bu hücrelerin granül hücre katmanı boyunca genel dağılım göstermiş olsa da, kısmen hilusa komşu olan iç granüler tabakasında daha yoğunlaştıkları dikkati çekti.

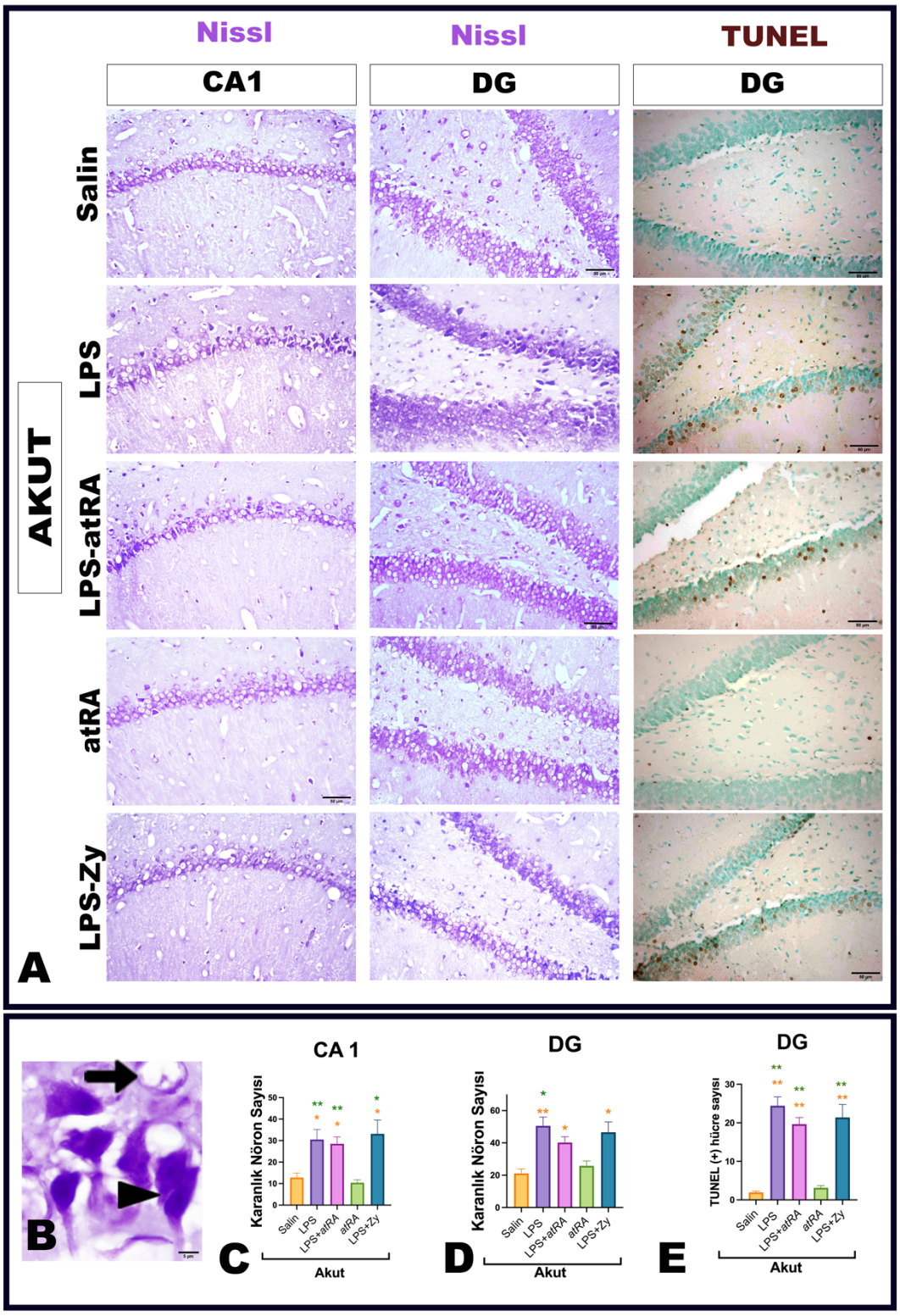
Akut deney gruplarının tümünde (LPS, LPS+*ATRA* ve LPS+Zy) salin grubuna kıyasla apoptotik hücrelerin oldukça yüksek olduğu tespit edildi. Apoptotik hücrelerde saptanan bu artış istatistiksel olarak anlamlıydı. En yüksek apoptotik hücre sayısı sadece LPS verilen grupta gözlenirken, bu grubu LPS+Zy grubu takip etti ve

LPS+*ATRA* grubunda LPS grubuna kıyasla (istatistiksel bir değeri olmasa da) daha az apoptotik hücre saptandı. Apoptotik hücrelerin dağılımının genellikle, dentat girusun anatomik olarak infrapiramidal ve suprapiramidal dalında dağılmış bir şekilde, ve dentat girusun apeksine daha yakın oldukları dikkati çekti (Şekil 17A). LPS indüksiyonu ile birlikte yüksek doz *ATRA* uygulaması, apoptotik hücre sayısında kısmen düşüşe neden oldu. *ATRA* uygulaması yapılan grupta, LPS verilen gruplara oranla apoptotik hücrelerin oldukça düşük sayıda olduğu gözlendi. LPS verilen gruplarda gözlenen bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulundu. LPS+*ATRA* grubunun zeytinyağı kontrolüne kıyasla apoptoz açısından benzer sonuçlara neden olması, zeytinyağı taşıt maddesinin hipokampal apoptozda, akut etkisinin olmadığını ve yalnızca *ATRA* uygulanan gruplarda apoptotik hücrelerde dikkate değer farklılığın bulunmamasının, akut yüksek doz *ATRA*'nın hipokampusta apoptotik etkisinin olmadığını/kısıtlı olabileceğini düşündürdü.

Akut gruplara ait Nissl ve TUNEL değerlendirme sonuçları, ortalama ve standart sapma şeklinde Tablo 5'te verilmiştir.

Tablo 5: Akut grupların Nissl ve TUNEL boyama sonuçlarının ortalama ve standart sapma değerleri tablosu.

Akut Gruplar	Salin	LPS	LPS+ATRA	ATRA	LPS+ZY
Nissl CA1	12,8 ± 2,08	30,5 ± 4,65	28,5 ± 3,22	10,4 ± 1,41	33,14 ± 6,41
Nissl DG	21,06 ± 2,82	50,5 ± 5,48	40,18 ± 3,62	25,8 ± 2,99	46,57 ± 6,43
TUNEL	1,92 ± 0,30	24,42 ± 2,33	19,65 ± 1,73	3,15 ± 0,58	21,4 ± 3,39



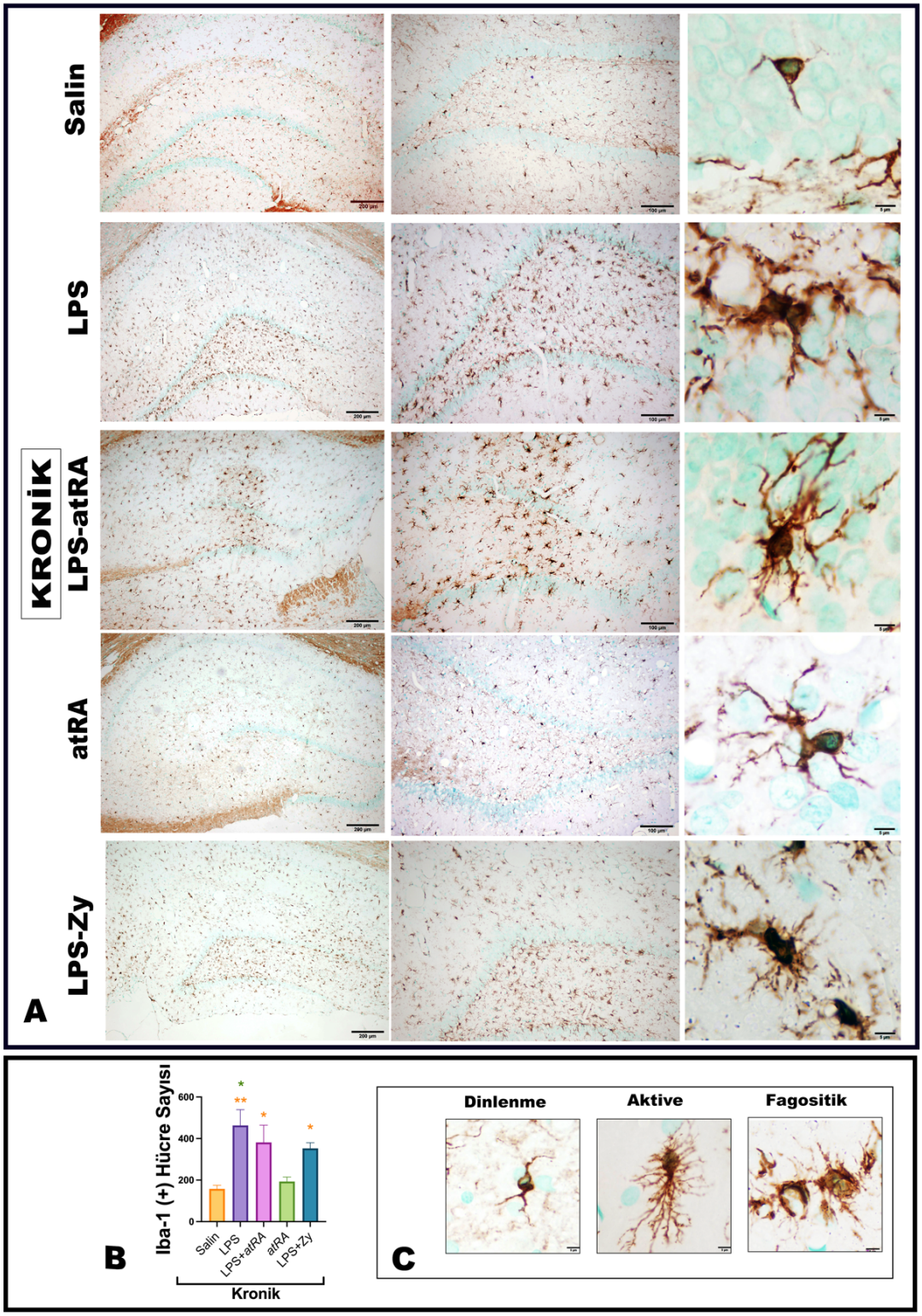
Şekil 17. Sistemik akut LPS'nin ve *ATRA*'nın hipokampal nöronlar üzerinde dejeneratif ve apoptotik etkileri. Akut gruplara ait CA1 ve DG'un Nissl ve TUNEL metoduyla boyanan temsili fotomikrografları (A). Sağlıklı (ok) ve dejenere morfolojideki (okbaşı) hipokampal nöronlar (B). Gruplara ait istatistiksel analizler, CA1 karanlık nöron sayısı (C), Dentat girus karanlık nöron sayısı (D), Dentat girus TUNEL (+) nöron sayısı (E). Veriler ortalama ± standart sapma olarak sunulmuştur. * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$. Krezil viyole, Metil green ve TUNEL, DAB.

4.3.2. Kronik dönem gruplarındaki histolopatolojik değişiklikler

4.3.2.1. Kronik sistemik LPS'in ve *ATRA*'nın hipokampal mikroglialara etkisi

Sistemik kronik düşük doz LPS enjeksiyonlarının ve 28 günlük *ATRA* uygulamalarının, hipokampusta mikroglial yanıt ile ilgili nöroinflamatuvar değişiklikleri incelendi. Iba-1 immünohistokimyası ile mikroglialar işaretlenerek, mikroglial yanıtın değerlendirilmesi için boyanan kesitler fotoğraflandı. Dentat girus ve CA1 alanlarını içine alacak şekilde her kesit için eş alanda ölçülerek mikrogliaların sayıları gruplar arasında değerlendirildi. Mikrogliaların morfolojik değişiklikleri kronik gruplar için de yorumlandı (Şekil 18A-B). Kronik grupların Iba-1 ekspresyon ortalama değerlerinin ve standart sapma değerleri Tablo 6'da verilmiştir.

Kronik salin grubunda, hipokampusta bulunan tipik mikroglia, deney gruplarına göre çok daha az dallaşmış, az uzantıları ile karakterize (Şekil 18C) olarak görüldü ve bu morfoloji genel mikroglia popülasyonuna hakimdi, bununla birlikte aktive morfolojideki mikroglialar da gözlendi. Kronik LPS uygulaması, morfolojik dönüşümün de yanı sıra Iba-1 pozitif mikroglial popülasyonda belirgin bir artışa yol açtı. LPS'nin mikroglia aktivasyonu üzerindeki etkisi hipokampusta genel olarak artsa da, DG'un hilusunda yoğunlaşmış bölgesel bir heterojenlik şeklinde dikkati çekti. Salin grubu ile LPS verilen gruplar (LPS, LPS+*ATRA* ve LPS+Zy) kıyaslandığında; LPS verilen gruplarda mikroglia sayısının salin grubuna göre çok fazla arttığı gözlendi. Bu artış istatiksel olarak anlamlı bulundu. LPS indüksiyonu ile birlikte *ATRA* uygulamasının, kısmen mikroglia sayısını azalttığı, bu gruplarda aktive ve fagositik mikroglialarn sıklığı (Şekil 18C) dikkati çekti. LPS grubundaki artış, *ATRA* uygulanan grubuna göre de istatistiksel olarak anlamlı bulundu. Bununla birlikte, LPS+Zy grubunda LPS grubuna göre az da olsa düşük mikroglia yoğunluğu gözlendi. *ATRA* uygulanan grupta, mikroglialarn aktive morfolojide olduğu ve kısmen arttığı gözlendi. Kronik LPS indüksiyonu yapılan sıçanlardaki çoğu Iba-1 (+) mikroglianın daha büyük hücre gövdesi, kısa ve kaba uzantılarla karakterize ameboid (Şekil 18C) görünümlü fagositik aktive morfoloji sergilediği gözlendi. Hipokampüsteki immünohistokimyasal analizler ve hücre sayımları, kronik LPS uygulamasının toplam mikroglia sayısını yaklaşık 3 kat kadar arttırarak, morfolojik değişikliğe neden olduğunu gösterdi.



Şekil 18. Sistemik kronik LPS'nin ve *ATRA*'nın hipokampal mikroglialar üzerindeki etkileri. Kronik dönem gruplarına ait Iba-1 ile işaretli hipokampusta konumlanmış mikroglialar ve gruplara mikrogliaların morfolojileri (A). Kronik grupların Iba-1 (+) mikroglia sayılarının ortalama ve standart sapma grafiği ile istatistiksel olarak karşılaştırılması (B). İmmunohistokimyasal analizlerde saptanan, örnek mikroglia morfolojileri (C). Veriler ortalama ± standart sapma olarak sunulmuştur. * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$. Metil green v Anti-Iba-1, Avidin Biyotin Peroksidaz, DAB.

Tablo 6: Kronik grup Iba-1 ekspresyon ortalama değerleri ile standart sapma tablosu.

Kronik Gruplar	Salin	LPS	LPS+ATRA	ATRA	LPS+ZY
Iba-1	157,8 ± 17,30	463,3 ± 75,65	381,8 ± 82,43	193,4 ± 21,37	353 ± 27,13

4.3.2.2. Kronik nöroinflamasyonun ve *ATRA*'nın hipokampal nörodejenerasyona ve nöron sağkalımına etkisi

Kronik gruplar arasında nöronal sağkalımı değerlendirmek için de apoptoz değerlendirmesi TUNEL metoduyla işaretlenen hücre çekirdekleri işaretlenerek saptandı. (Şekil 19A-E). Nöronal dejenerasyon Nissl boyamasında küçük, büzüşmüş ve koyu boyanan dejenere nöronları temsil eden karanlık nöronların sayılması ile analiz edildi Gruplara ait sonuçlar, ortalama ve standart sapma verileri olarak, Tablo 7'de yer almaktadır.

Kronik salin grubunda akut salin grubuna benzer şekilde, hipokampusun cornu ammonis alanları, dentat girus ve subikular alanlarında normal histolojik yapıyı yansıttığı görüldü. CA1 ve DG bölgelerinde bulunan piramidal ve granüler nöronların çok büyük çoğunluğu ökromatik çekirdek ve belirgin çekirdekçiği ile sağlıklı morfolojide izlenirken, kısmen az sayıda koyu bazofilik sitoplazmalı "karanlık nöronlar"a da rastlandı.

Kronik grupların hipokampüsü CA1 katmanında koyu boyanan nöronlar açısından değerlendirildiğinde; LPS, LPS+*ATRA* ve LPS+Zy gruplarında karanlık nöronların sayısında, salin grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı artış tespit edildi. LPS+*ATRA* grubunun LPS grubuna kıyasla dejenere nöron oranında kısmen azalmaya neden olduğu gözlendi. İstatistiksel olarak bir değeri olmasa da yalnızca 28 gün *ATRA* uygulanan sıçanlarda da CA1 piramidal nöronlarında Nissl ile koyu boyanan bir dejenerasyonun varlığı dikkati çekti. LPS grubundaki koyu boyalı nöron sayısındaki artış, *ATRA* grubuna kıyasla da anlamlı bulundu. Koyu boyanan dejenere nöron varlığının en fazla gözlendiği grup, LPS grubu olarak belirlendi.

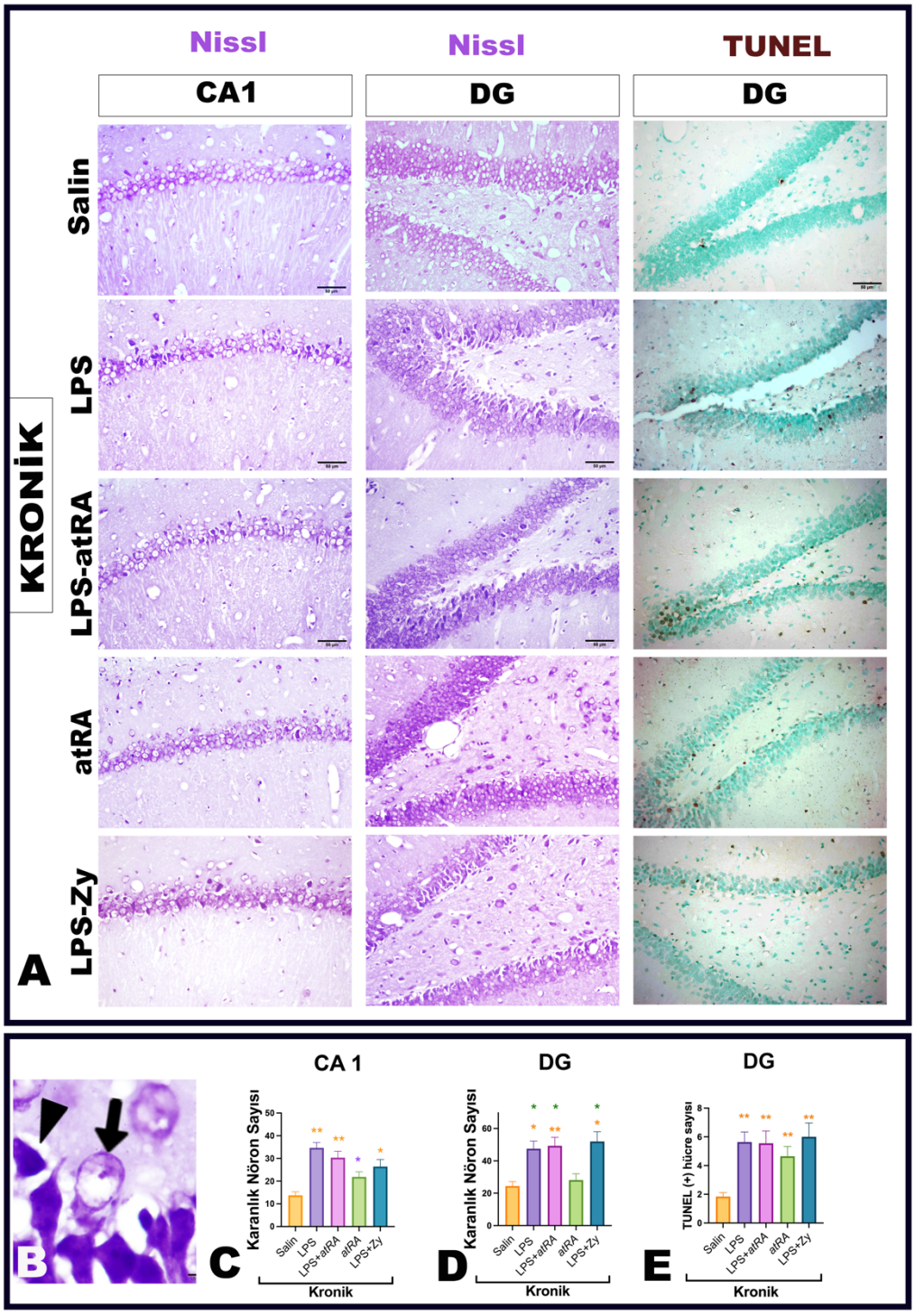
Dentat girus'ta karanlık nöronlar incelendiğinde, LPS verilen tüm gruplarda (LPS, LPS+*ATRA* ve LPS+Zy) salin grubuna göre belirgin bir artış gözlendi ve bu artış istatistiksel olarak anlamlıydı. DG'da da *ATRA* verilen grupta salin grubuna göre karanlık nöronlarda artış gözlensede bu artış istatistiksel olarak anlamlı değildi .*ATRA* grubuna göre LPS gruplarında karanlık nöron açısından istatistiksel olarak anlamlı

artışlar gözlendi. Dentat girus'ta en yüksek karanlık nöron sayısına sahip grup LPS+Zy olarak belirlendi.

Kronik LPS ve LPS+Zy gruplarında apoptotik hücre sayılarında salin kontrolüne kıyasla, akut gruplardaki kadar dramatik olmasa da artış söz konusuydu. Apoptotik hücrelerin dağılımı yine dentat girusun anatomik olarak infrapiramidal ve suprapiramidal dalında dağılmış ve dentat girusun apeksine daha yakındı. LPS+*ATRA* uygulamasının, LPS gruplarına kıyasla (LPS ve LPS+Zy) apoptotik hücre sayısında değişikliğe neden olmadığı görüldü. *ATRA* uygulanan gruptaki sıçanlarda apoptotik hücrelerde artış gözlendi. Salin grubuna göre diğer 4 grup (LPS, LPS+*ATRA*, *ATRA* ve LPS+Zy) arasında apoptotik hücre bakımından kıyaslama yapıldığında istatistiksel olarak anlamlı artış bulundu. Gruplar birbirlerine göre değerlendirildiğinde; en fazla apoptotik hücre sayısı LPS ve LPS+Zy verilen grupta gözlendi. Salin grubu dışındaki diğer gruplar apoptoz açısından kendi aralarında değerlendirildiğinde, istatistiksel olarak bir fark gözlenmedi.

Tablo 7: Kronik gruplarda Nissl ve TUNEL boyamalarında ortalama ve standart sapma değer tablosu

Kronik Gruplar	Salin	LPS	LPS+ATRA	ATRA	LPS+ZY
Nissl CA1	13,73 ± 1,55	34,64 ± 2,38	30,31 ± 2,88	21,86 ± 2,26	27,25 ± 3,58
Nissl DG	24,4 ± 2,81	47,5 ± 4,71	49,31 ± 5,22	28,13 ± 3,90	52 ± 5,99.
TUNEL	1,84 ± 0,27	5,64 ± 0,70	5,55 ± 0,85	4,65 ± 0,67	6 ± 0,96



Şekil 19. Sistemik kronik LPS'nin ve *ATRA*'nın hipokampal nöronlar üzerinde dejeneratif ve apoptotik etkileri. Kronik gruplara ait CA1 ve DG'un Nissl ve TUNEL metoduyla boyanan temsili fotomikrografları (A). Sağlıklı (ok) ve dejenere morfolojideki (okbaşı) hipokampal nöronlar (B). Gruplara ait istatistiksel analizler, CA1 karanlık nöron sayısı (C), Dentat girus karanlık nöron sayısı (D), Dentat girus TUNEL (+) nöron sayısı (E). Veriler ortalama ± standart sapma olarak sunulmuştur. * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$. Krezil viyole, Metil green ve TUNEL, DAB.

4.4. EphA4 ve EphB2 Reseptör Ekspresyonu Değerlendirmeleri

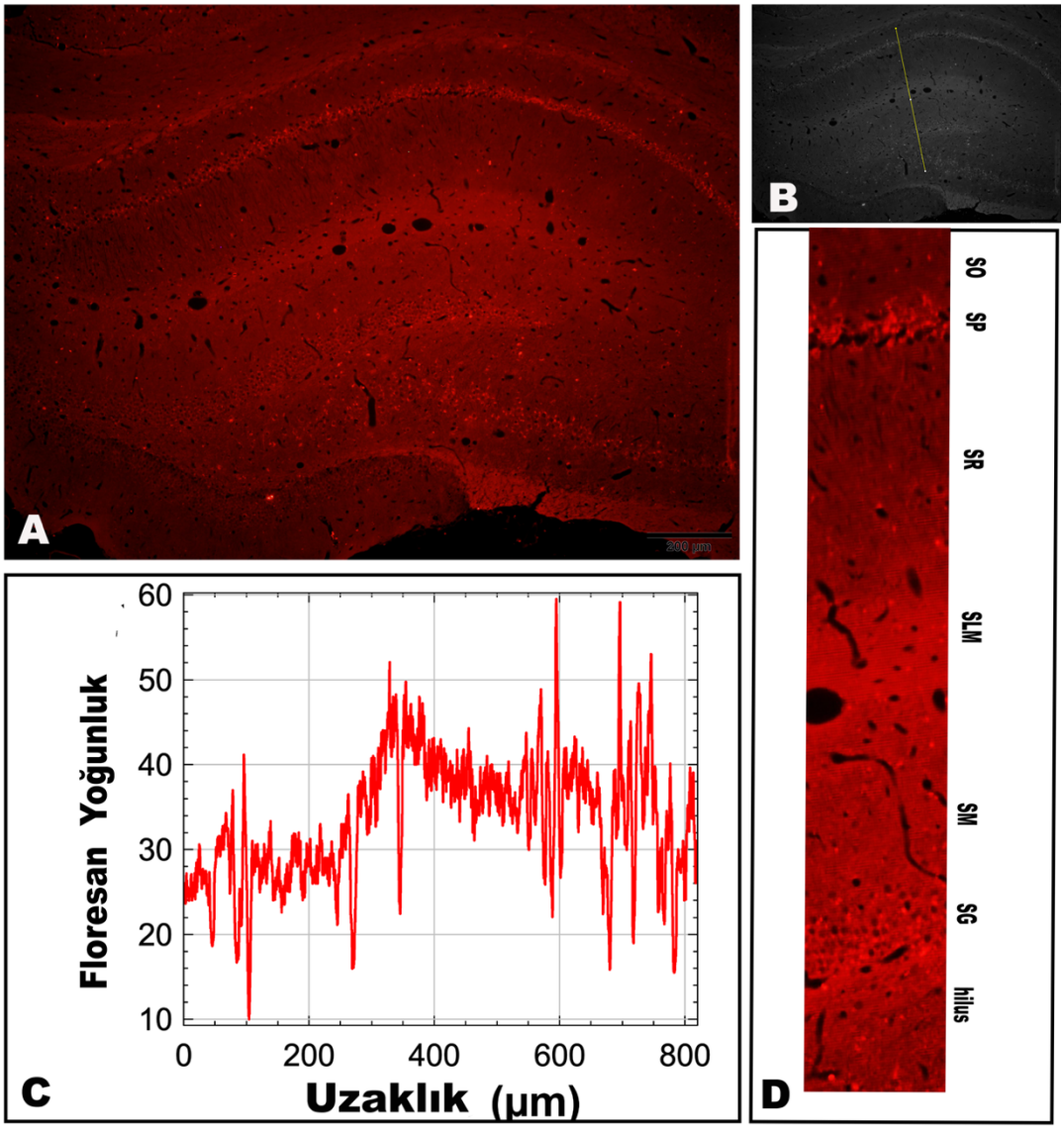
4.4.1. Hipokampal EphA4 ve EphB2'nin laminer ekspresyon paterni

Eph reseptör immünofloresan boyamalarında, sıçan hipokampüsünde hem EphA4 hem de EphB2 için heterojen ekspresyon gözlendi (Şekil 20-21). Her iki reseptörün de ekspresyonu, hipokampüsün laminer organizasyon modelini izledi ve ekspresyon seviyeleri histolojik katmanlar arasında önemli ölçüde farklılık gösterdi. EphA4 reseptörünün ekspresyonu hipokampusun anatomik bölgelerinden, genel anlamda DG'da maksimumken, bunu CA3 ve CA1 alanları takip etti. EphB2 ekspresyonu anatomik bölgelere göre en yüksek DG'da saptandı, ancak CA1'de CA3 alanına oranla daha yüksek seviyelerde bulundu.

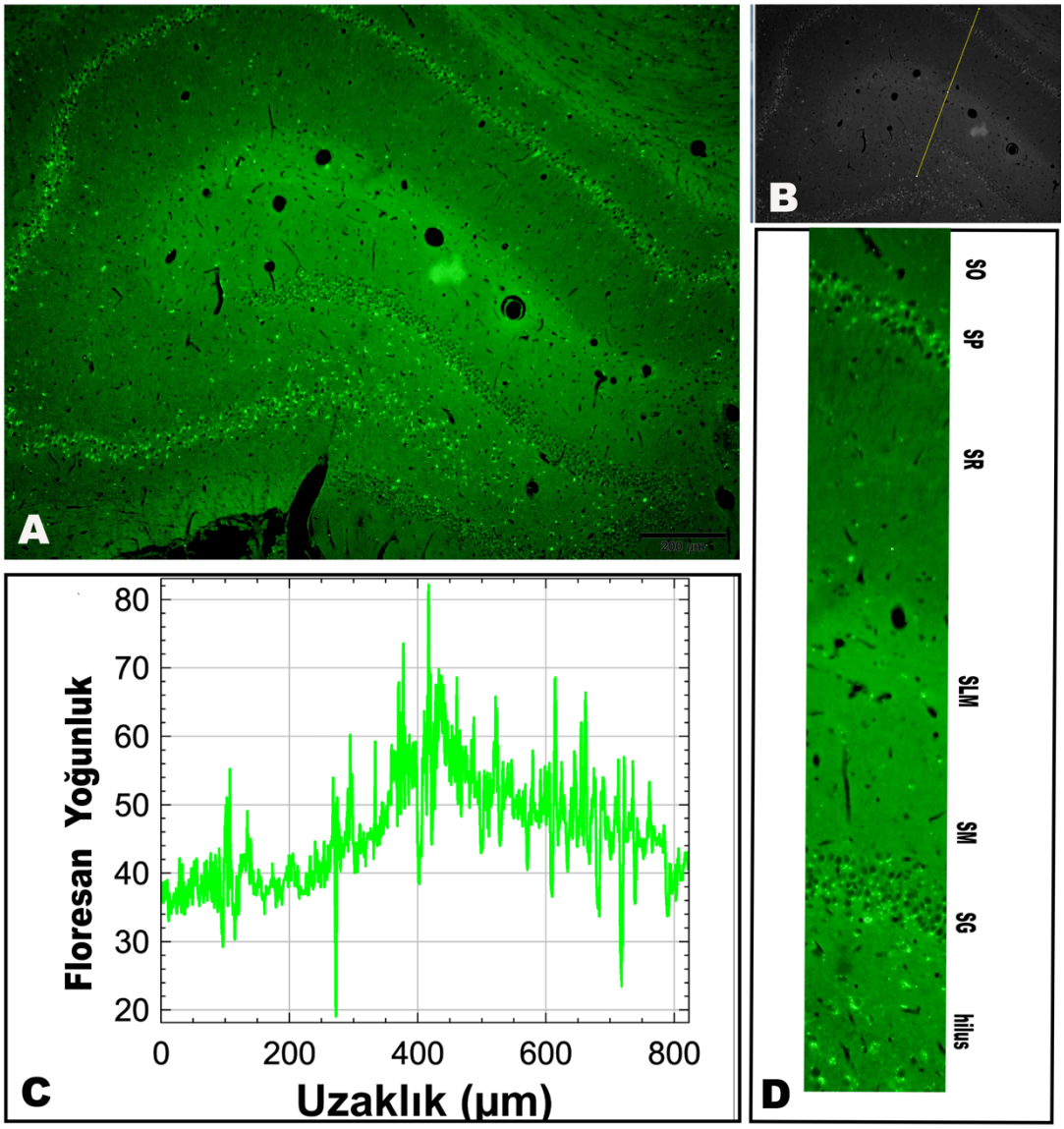
Hipokampusun CA1 alanında, tüm gruplar için genel anlamda, hem EphA4'ün hem de EphB2'nin ekspresyonunda en yüksek floresan yoğunluk; stratum piramidale (nöron somalarındaki reseptör kümelenmelerinin tüm alana ortalamaları ile birlikte) ile piramidal hücrelerin distal, apikal dendritleri ve bunlarla sinaps yapan Schaffer kollateralleri ve perforan yol liflerini içeren stratum lacunosum-moleculare'de gözlendi. Bu iki katmana oranla radiatum ve oriens katmanlarında (CA1 piramidal hücrelerinin diğer dendritik alt alanları) daha düşük bulundu.

CA3 alanının alt katmanları değerlendirildiğinde; EphA4'ün ekspresyonu incelenen üç histolojik katmanda CA3 piramidal nöronlarındaki reseptör kümelenmelerinde yüksek ışıma verse de, her üç katmanın ışıma yoğunluğu ortalamaları birbirine benzer değerlerde bulundu. EphB2 reseptörünün CA3 alanında histolojik katman bazında en yüksek ışıma piramidal hücre somalarını içeren stratum piramidale'de saptanırken, bunu diğer katmanlar olan stratum lucidum ve stratum radiatum izledi.

Dentat girusta moleküler tabaka ve granüler tabakalar değerlendirildi. EphA4 ekspresyonu moleküler tabakada granüler tabakaya kıyasla daha düşük veya eşit floresan ışıma yoğunluğu gözlenirken, EphB2 ekspresyonu kısmen iki tabakada birbirine daha yakın derecede yüksekti.



Şekil 20. Image J çizgi profili kullanarak, EphA4'ün hipokampusta floresan yoğunluk profillerinin oluşturulması. Genç dişi sıçan hipokampusunun EphA4 ile immünofloresan işaretli genel görüntüsü (A). Gri tonlamaya dönüştürelen görüntü, çizgi aracı (sarı çizgi) ile stratum oriensten, DG'un hilusuna doğru çizildi (B). Çizgi profili, çizgi boyunca mesafenin floresan piksel yoğunluğunu oluşturmak için kullanıldı (C). Yaklaşık olarak 800 mikrometre mesafeyi temsil eden, yüksek büyütmede hipokampusun histolojik katmanları (D). Anti-EphA4 (Alexa flour 594). *SO, Stratum Oriens; SP, Stratum Piramidale; SLM, Stratum Lacunosum-Moleculare; SM, Stratum Moleculare; SG, Stratum Granulare.*



Şekil 21. Image J çizgi profili kullanarak, EphB2'nin hipokampusta floresan yoğunluk profillerinin oluşturulması. Genç dişi sıçan hipokampusunun EphB2 ile immünofloresan işaretli genel görüntüsü (A). Gri tonlamaya dönüştürelen görüntü, çizgi aracı (sarı çizgi) ile stratum oriensten, DG'un hilusuna doğru çizildi (B). Çizgi çizgi boyunca mesafenin floresan piksel yoğunluğunu oluşturmak için kullanıldı (C). Yaklaşık 800 mikrometre mesafenin yüksek büyütmede yansıttığı hipokampusun histolojik katmanları (D). Anti-EphB2 (FITC), *SO, Stratum Oriens; SP, Stratum Piramidale; SLM, Stratum Lacunosum-Moleculare;SM, Stratum Moleculare; SG, Stratum Granulare.*

4.4.2. Akut sistemik LPS ve *ATRA*'nın hipokampal EphA4 ve EphB2 ekpresyonuna etkisi

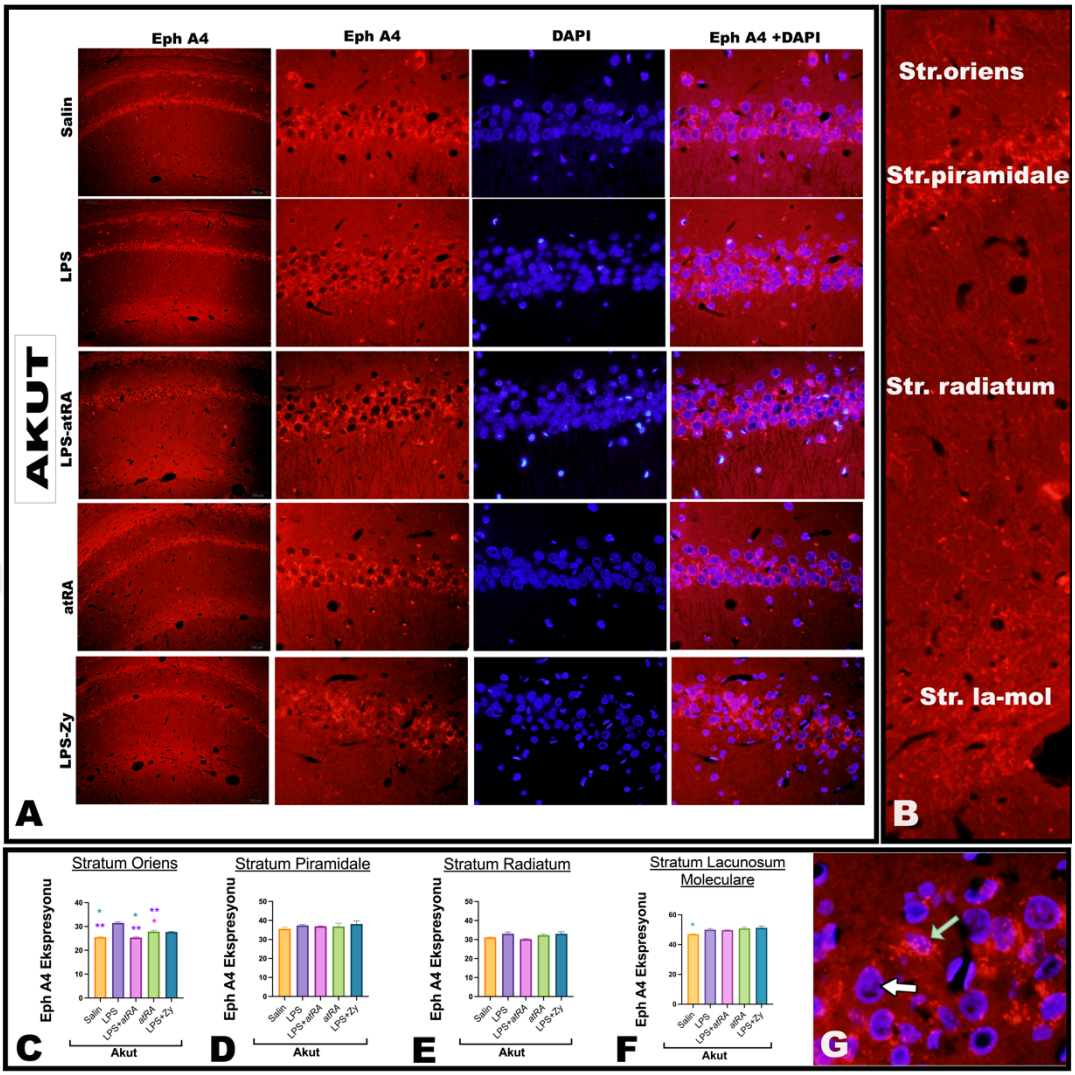
Sistemik inflamasyon kaynaklı oluşturulan akut nöroinflamasyonun ve *ATRA*'nın hipokampal nöronlardaki nöroplastisiteye etkileri, EphA4 ve EphB2'nin hipokampustaki protein seviyeleri ve bölgesel dağılımları immünofloresan yöntem sonrası ölçülerek değerlendirildi.

4.4.2.1. Akut nöroinflamasyon ve *ATRA* gruplarında hipokampal EphA4 protein ekspresyonu

Hipokampus kesitleri EphA4 için immünofloresan olarak işaretlendi ve EphA4 reseptör ekspresyonları hipokampusun CA1 bölgesinde stratum oriens, stratum piramidale, stratum stratum lacunosum- moleculare ve stratum radiatum analiz edildi (Şekil 22A-G).

CA1 alanında; stratum oriens tabakasında salin grubu ile diğer gruplar arasında EphA4 ekspresyonları açısından karşılaştırma yapıldığında, LPS ve LPS+Zy gruplarında artış gözlendi ve bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulundu. LPS+*ATRA* verilen grup ile LPS grubu, *ATRA* grubu ve LPS+Zy grubu karşılaştırıldığında; LPS+*ATRA* grubunda EphA4 ekspresyonunun azaldığı, diğer üç grupta arttığı dikkati çekti. Bu artışlar istatistiksel olarak anlamlıydı. LPS uygulanan grupta *ATRA* uygulanan gruba göre EphA4 ekspresyonunda istatistiksel olarak anlamlı artış saptandı. Bu sonuçlar, *ATRA* uygulamalarının EphA4 ekspresyonlarını düşürdüğünü ortaya koydu. Stratum piramidale tabakasında EphA4 ekspresyonları tüm gruplarda birbirine yakın çıktı ve istatistiksel olarak bir anlamlılık saptanmadı. Stratum lacunosum moleculare tabakasında; salin grubuna göre tüm deney gruplarında EphA4 ekspresyonu yüksek bulunsa da istatistiksel olarak anlamlı fark, salin ile LPS+Zy grubu arasında bulundu.

Akut gruplarda EphA4 ekpresyonunun CA1 alanındaki ortalama ve standart sapma değerleri, Tablo 8'de verilmiştir.



Şekil 22. Hipokampal CA1 bölgesinde, akut deney gruplarında EphA4 ekspresyonu. Sistemik akut LPS'nin ve *ATRA*'nın hipokampusta EphA4 ekspresyonuna etkisi (A). CA1'in histolojik katmanlarında Eph A4'ün laminer ekpresyon paterni (B). CA1'in histolojik katmanlarında EphA4 reseptörü ekspresyonunun akut gruplar arasındaki istatistiksel değerlendirme grafikleri (C, D, E, F). CA 1 piramidal nöronlarındaki Eph A4 kümelenmesi, yeşil ok yüksek derecede kümelenme, beyaz ok düşük derecede Eph A4 reseptör kümelenmesi (G). Veriler ortalama ± standart sapma olarak sunulmuştur. * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$. Anti-EphA4 (Alexa flour 594), DAPI.

Tablo 8. Akut gruplarda Eph A4 ekpresyonunun CA1 alanındaki ortalama ve standart sapma değerleri

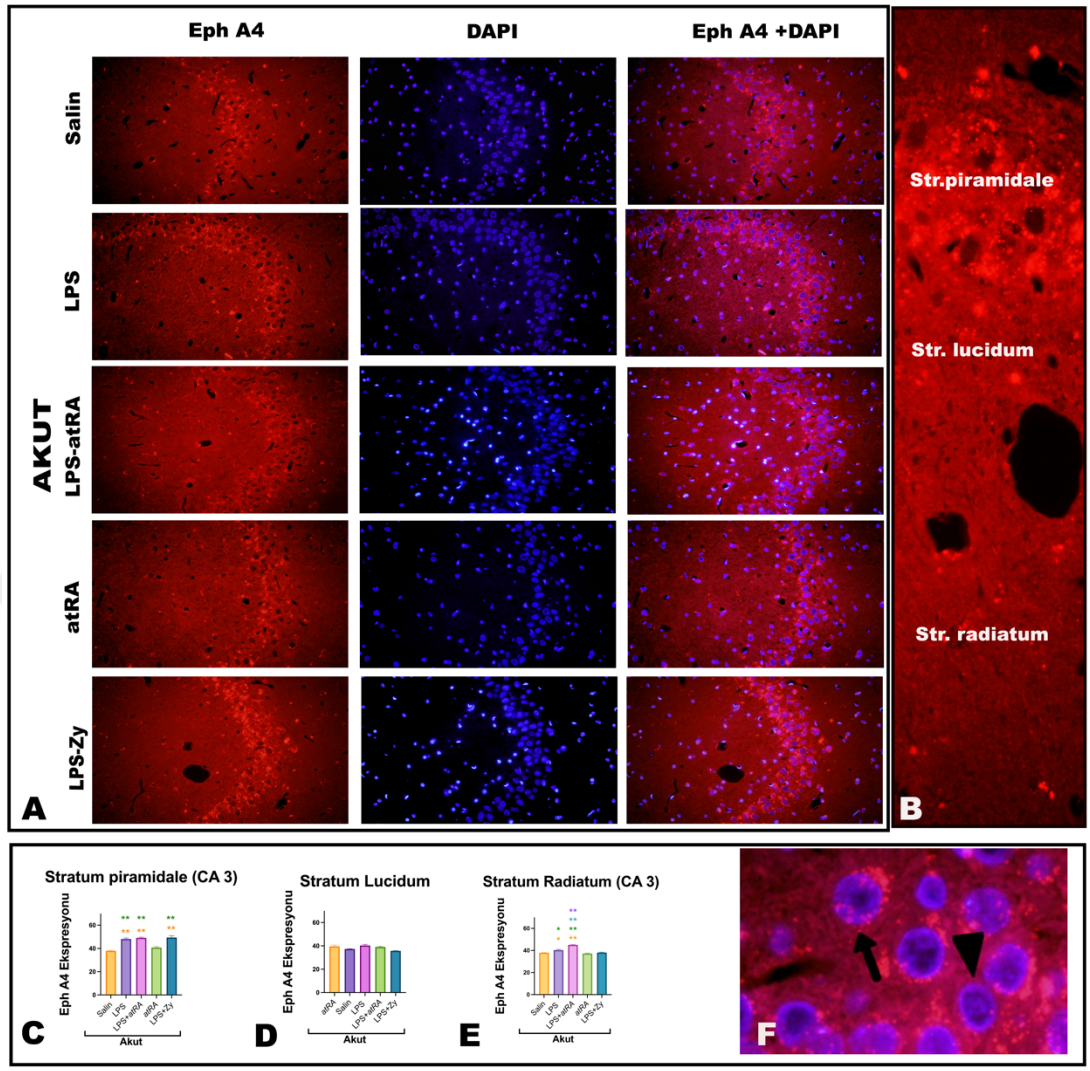
Akut Gruplar	Salin	LPS	LPS+ATRA	ATRA	LPS+ZY
Str. Oriens	25,51 ± 0,24	31,51 ± 0,49	25,33 ± 0,27	27,85 ± 0,58	27,68 ± 0,21
Str. Radiatum	31,10 ± 0,27	33,06 ± 0,92	30,17 ± 0,36	32,30 ± 0,63	33,04 ± 1,07
Str. Piramidale	35,60 ± 0,86	37,36 ± 0,54	36,88 ± 0,15	36,80 ± 1,72	38,12 ± 1,66
Str. Lacunosum/molekulare:	46,99 ± 0,25	50,00 ± 0,79	49,73 ± 0,15	50,89 ± 0,93	51,29 ± 1,22

Akut gruplarda hipokampüsün CA3 bölgesinde stratum piramidale tabakasında EphA4 ekspresyonları karşılaştırıldığında; salin grubuna göre LPS gruplarında belirgin bir artış gözlendi ve bu artışlar istatistiksel olarak anlamlı bulundu. Stratum lucidum tabakasında EphA4 ekspresyonu açısından sonuçlar birbirlerine yakın gözlendi, istatistiksel olarak anlamlılık saptanmadı. Stratum radiatum tabakasında en yüksek EphA4 ekspresyonu LPS+*ATRA* grubunda belirlendi ve istatistiksel olarak anlamlıydı.LPS verilen grup ikinci en yüksek ekspresyon gösteren grup oldu. İstatistiksel olarak salin ve *ATRA* grubu arasındaki fark anlamlı çıktı (Şekil 23A-F).

Akut gruplarda EphA4 ekpresyonunun CA3 alanındaki ortalama ve standart sapma değerleri, Tablo 9'da verilmiştir.

Tablo 9. Akut gruplarda Eph A4 ekpresyonunun CA3 alanındaki ortalama ve standart sapma değerleri tablosu

Akut Gruplar	Salin	LPS	LPS+ATRA	ATRA	LPS+ZY
Str. Piramidale	37,92 ± 0,41	48,08 ± 0,87	49,10 ± 0,57	40,70 ± 0,78	49,38 ± 1,55
Str. Lucidum	37,34 ± 0,24	40,33 ± 0,94	39,06 ± 0,56	39,56 ± 1,11	35,75 ± 0,25
Str. Radiatum	37,91 ± 0,19	40,34 ± 0,62	45,06 ± 0,34	37,20 ± 0,45	38,11 ± 0,41



Şekil 23. Hipokampal CA3 bölgesinde, akut deney gruplarında EphA4'ün ekspresyonu. Sistemik akut LPS'nin ve *ATRA*'nın CA3 alanında Eph A4 ekspresyonuna etkisi (A). CA3'ün histolojik katmanlarında Eph A4'ün laminer ekpresyon paterni (B). CA3 piramidal nöronlarındaki Eph A4 kümelenmesi, siyah ok yüksek derecede kümelenme, siyah okbaşı düşük derecede Eph A4 reseptör kümelenmesi. CA3'ün histolojik katmanlarında EphA4 reseptörü ekspresyonunun kronik gruplar arasındaki istatistiksel değerlendirme grafikleri (C, D, E). CA3 piramidal nöronlarındaki siyah ok yüksek derecede, siyah okbaşı düşük derecede Eph A4 reseptör kümelenmesi (F). *p <0,05; ** p <0,001. Anti-EphA4 (Alexa flour 594), DAPI.

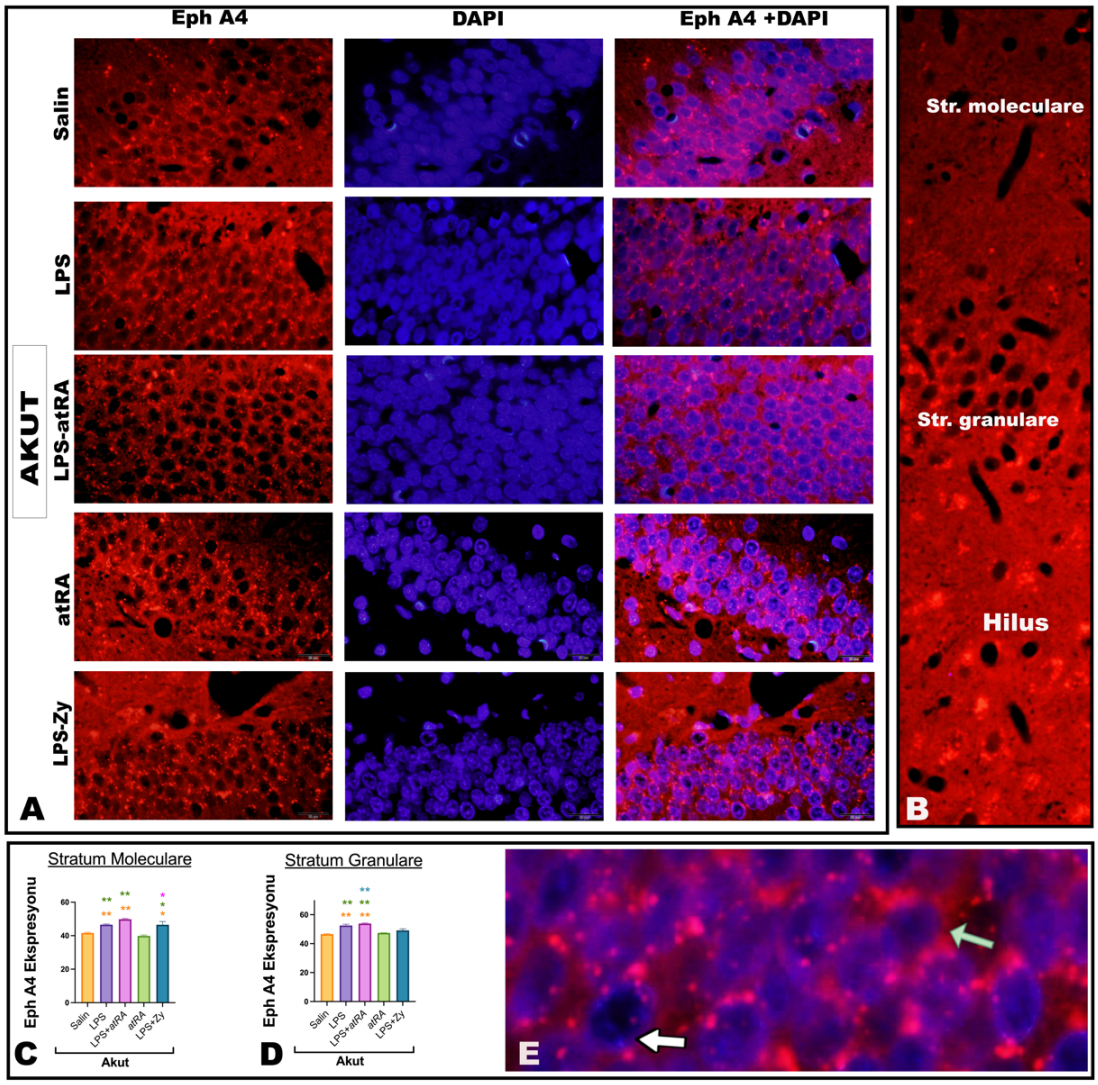
Dentat girus'un stratum moleküläre katmanında EphA4 ekspresyonuna bakıldığında; en yüksek EphA4 değeri LPS+*ATRA* grubunda görüldü. Salin grubuna göre LPS verilen gruplarda belirgin bir artış gözlendi ve bu artışlar istatistiksel olarak anlamlı bulundu. *ATRA* verilen grup ile LPS verilen gruplar arasında kıyaslama yapıldığında, EphA4 ekspresyonu LPS verilen gruplarda istatistiksel olarak anlamlı artış gösterdi. LPS+*ATRA* grubundaki EphA4 ekspresyonu, LPS+Zy grubuna göre anlamlı olarak daha yüksek olarak bulundu.

Dentat girus'un stratum granulare katmanında EphA4 değeri en yüksek olan grup LPS+*ATRA* grubu olarak belirlendi. LPS+*ATRA* grubundan sonraki en yüksek değer LPS grubunda gözlendi ve bu iki grupta gözlenen artış, salin grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bulundu. Salin grubundan sonra EphA4 ekspresyon değeri en düşük çıkan grup *ATRA* grubu oldu. Bu gruba göre LPS ve LPS+*ATRA* gruplarındaki artış istatistiksel olarak anlamlıydı. LPS+Zy verilen grup ile LPS ve LPS+*ATRA* grubu arasında EphA4 bakımından kıyaslama yapıldığında ise; LPS grubundaki artış istatistiksel olarak anlamlı değil iken, LPS+*ATRA* grubundaki artış istatistiksel olarak anlamlı bulundu (Şekil 24A-E).

Akut gruplarda EphA4 ekpresyonunun dentat girus alanındaki ortalama ve standart sapma değerleri, Tablo 10'da verilmiştir.

Tablo 10. Akut gruplarda EphA4 ekpresyonunun DG alanındaki ortalama ve standart sapma değerleri tablosu

Akut Gruplar	Salin	LPS	LPS+ATRA	ATRA	LPS+ZY
Str. Molekulare	41,61 ± 0,35	46,58 ± 0,39	49,82 ± 0,42	39,89 ± 0,53	46,52 ± 1,94
Str. Granulare	46,57 ± 0,38	52,50 ± 0,91	53,90 ± 0,37	47,40 ± 0,14	49,41 ± 1,09



Şekil 24. Hipokampal DG bölgesinde, akut deney gruplarında EphA4'ün ekspresyonu. Sistemik akut LPS'nin ve *ATRA*'nın DG'da EphA4 ekspresyonuna etkisi (A). DG'un histolojik katmanlarında Eph A4'ün laminer ekpresyon paterni (B). DG'un 'in histolojik katmanlarında EphA4 reseptörü ekspresyonunun akut gruplar arasındaki istatistiksel değerlendirme grafikleri (C, D). DG'un granuler nöronlarındaki Eph A4 kümelenmesi, yeşil ok yüksek derecede kümelenme, beyaz ok düşük derecede Eph A4 reseptör kümelenmesi (E). *p <0,05; ** p <0,001. Anti-EphA4 (Alexa flour 594), DAPI.

4.4.2.2. Akut nöroinflamasyon ve *ATRA* gruplarında hipokampal EphB2 protein ekspresyonu

EphB2 ekspresyonu açısından yapılan değerlendirmelerde, hipokampüsün CA1 katmanında stratum orienste; salin grubuna göre LPS verilen gruplarda (LPS, LPS+*ATRA* ve LPS+Zy) belirgin bir azalma gözlendi ve bu azalma istatistiksel olarak anlamlı bulundu. *ATRA* verilen grup ile LPS verilen gruplar EphB2 açısından karşılaştırıldığında; LPS verilen gruplarda istatistiksel olarak anlamlı belirgin bir

azalma gözlendi. Stratum orienste en düşük EphB2 ekspresyonuna sahip grup LPS verilen grup oldu. LPS verilen tüm gruplarda EphB2 seviyesinin düşmesi, nöroinflamasyonun EphB2 seviyesinde azalmalara neden olduğunu düşündürdü (Şekil 25C).

Stratum piramidale'de EphB2 ekspresyon seviyeleri gruplar arasında karşılaştırıldığında; salin grubunda göre LPS verilen gruplarda belirgin ve istatistiksel olarak anlamlı azalma dikkati çekti. EphB2 ekspresyonu en düşük gruplar LPS ve LPS+Zy grupları olarak dikkati çekti (Şekil 25D).

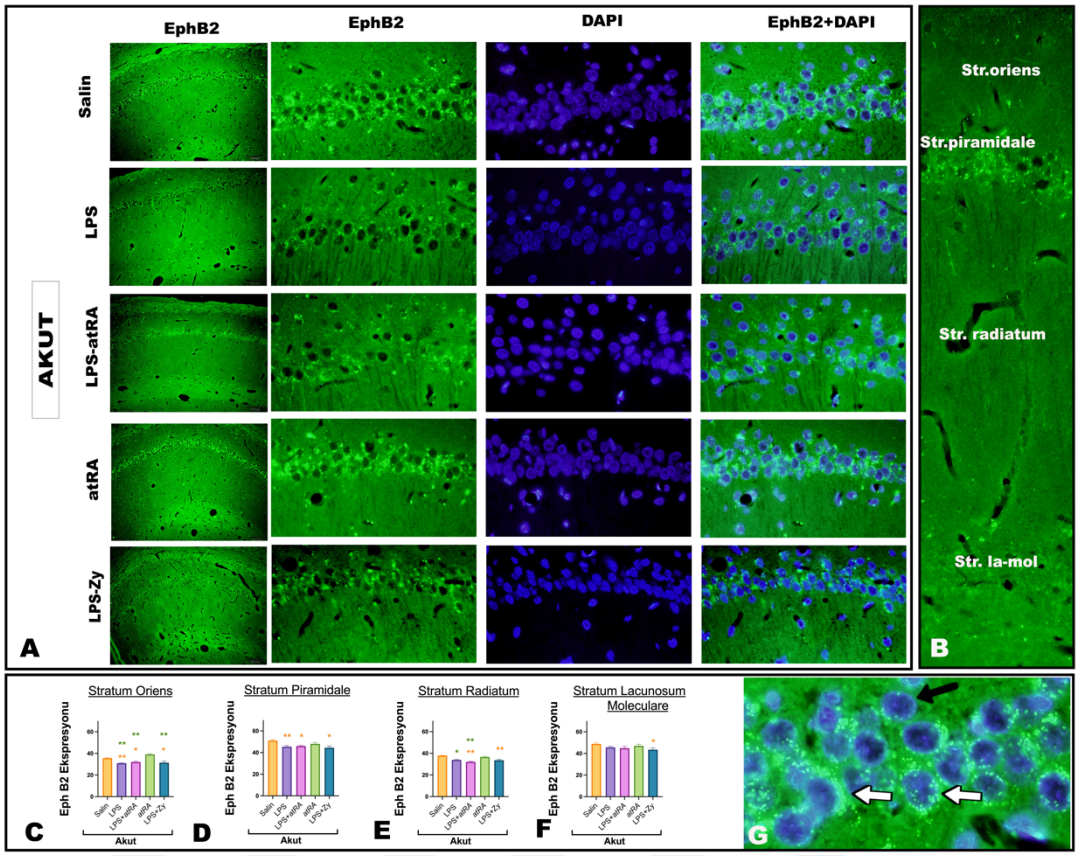
Stratum radiatum'da EphB2 ekspresyonu değerlendirildiğinde; tüm LPS gruplarında salin grubuna göre belirgin bir azalma gözlendi ve bu azalma istatistiksel olarak anlamlı bulundu. *ATRA* verilen grup ile LPS grupları arasında karşılaştırma yapıldığında, LPS ve LPS+*ATRA* grubunda anlamlı bir azalma saptandı. LPS+Zy grubunda *ATRA* grubuna göre EphB2 ekspresyon düzeyinde azalma gözlense de istatistiksel olarak bu azalma anlamı değildi. Bu katmanda EphB düzeyinde en çok azalma LPS+*ATRA* grubunda gözlendi (Şekil 25E).

Stratum lacunosum molekulare katmanında, salin grubuna göre tüm gruplarda EphB2 ekspresyonu azalmış gözükse de, sadece salin grubu ile LPS+Zy grubu arasında anlamlılık bulundu (Şekil 25F).

Akut gruplarda EphB2 ekpresyonunun CA1 alanındaki ortalama ve standart sapma değerleri, Tablo 11'de verilmiştir.

Tablo 11. Akut gruplarda EphB2 ekpresyonunun CA1 alanındaki ortalama ve standart sapma değerleri.

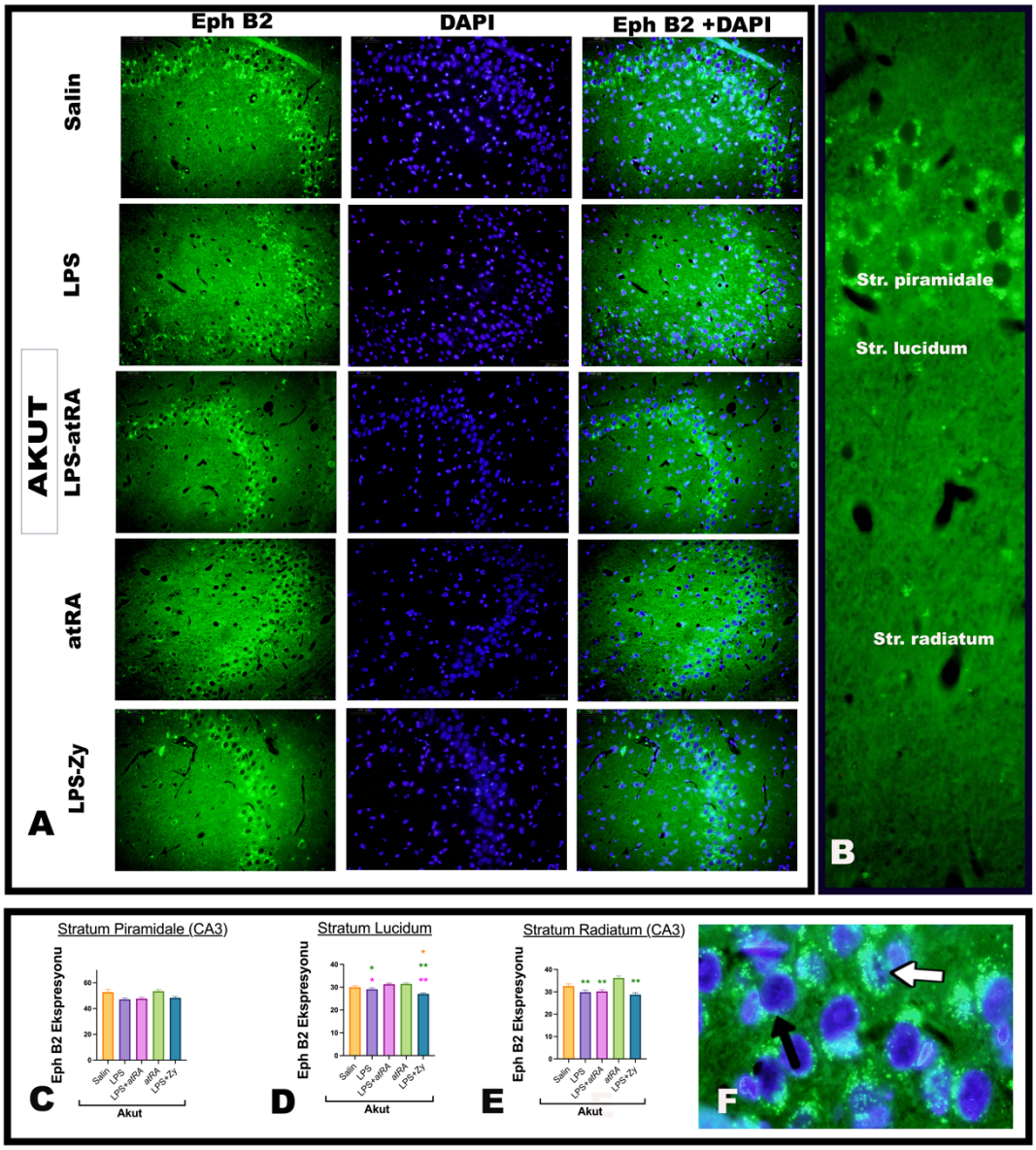
Akut Gruplar	Salin	LPS	LPS+ATRA	ATRA	LPS+ZY
Str. Oriens	35.63 ± 0,44	30,87 ± 0,46	32,04 ± 0,70	39,04 ± 0,64	31,43 ± 1,37
Str. Radiatum	37,83 ± 0,23	33,86 ± 0,44	32,05 ± 0,64	36,55 ± 0,59	33,53 ± 0,85
Str. Piramidale	51,08 ± 0,94	45,32 ± 1,15	46,01 ± 0,66	48,04 ± 1,31	44,47 ± 1,59
Str. Lacunosum/molekulare	48,80 ± 1,04	45,63 ± 1,02	44,85 ± 1,54	47,06 ± 1,45	43,42 ± 1,74



Şekil 25. Hipokampal CA1 bölgesinde, akut deney gruplarında EphB2'nin ekspresyonu. Sistemik akut LPS'nin ve *ATRA*'nın CA1'de EphB2 ekspresyonuna etkisi ve gruplara ait temsili mikrograflar (A). CA1'in histolojik katmanlarında Eph B2'ün laminer ekpresyon paterni (B). CA1'in 'in histolojik katmanlarında EphB2 reseptörü ekspresyonunun akut gruplar arasındaki istatistiksel değerlendirme grafikleri (C, D, E, F). CA1'in piramidal nöronlarındaki Eph B2 kümelenmesi, beyaz ok yüksek derecede kümelenme, siyah ok düşük derecede Eph B2 reseptör kümelenmesi (G). *p <0,05; ** p <0,001. Anti-EphB2 (FITC), DAPI.

CA3 tabakasındaki stratum piramidale'de EphB2 ekspresyonu tüm gruplarda salin grubuna göre azalma göstersede bu azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. Stratum lucidum katmanında LPS ve LPS+Zy verilen gruplarda EphB2 ekspresyonunda diğer gruplara göre belirgin bir azalma gözlendi. LPS+ Zy grubundaki azalma LPS grubu hariç diğer tüm gruplara göre çok belirgindi ve her grup ile istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptandı. LPS verilen gruptaki EphB2 ekspresyonu LPS+*ATRA* ve *ATRA* verilen gruplara göre anlamlı bir azalma gösterdi. Stratum radiatum katmanında, *ATRA* grubuna göre LPS verilen gruplar arasında EphB2 ekspresyonunda anlamlı azalma belirlendi (Şekil 26A-F).

Akut gruplarda EphB2 ekpresyonunun CA3 alanındaki ortalama ve standart sapma değerleri, Tablo 12'de verilmiştir.



Şekil 26. Hipokampal CA3 bölgesinde, akut deney gruplarında EphB2'nin ekspresyonu. Sistemik akut LPS'nin ve *ATRA*'nın CA3'de EphB2 ekspresyonuna etkisi ve gruplara ait temsili mikrograflar (A). CA3'ün histolojik katmanlarında EphB2'nin laminer ekpresyon paterni (B). CA3'ün histolojik katmanlarında EphB2 reseptörü ekspresyonunun akut gruplar arasındaki istatistiksel değerlendirme grafikleri (C, D, E). CA3'ün piramidal nöronlarındaki EphB2 kümelenmesi, beyaz ok yüksek derecede kümelenme, siyah ok düşük derecede EphB2 reseptör kümelenmesi (F). *p <0,05; ** p <0,001. Anti-EphB2 (FITC), DAPI.

Tablo 12. Akut gruplarda EphB2 ekpresyonunun CA3 alanındaki ortalama ve standart sapma değerleri

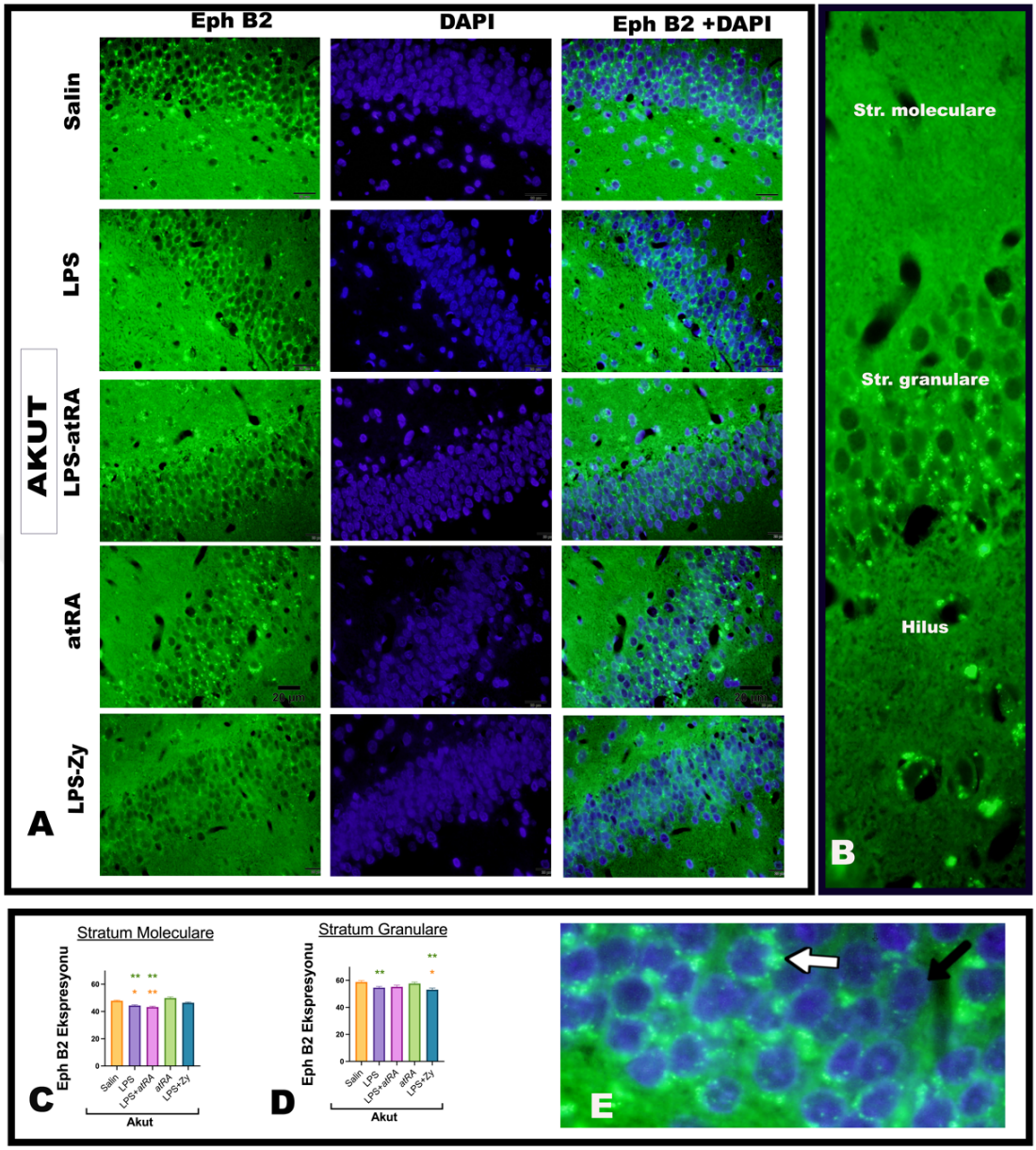
Akut Gruplar	Salin	LPS	LPS+ATRA	ATRA	LPS+ZY
Str. Piramidale	52,76 ± 2,06	47,18 ± 0,96	47,71 ± 0,96	53,47 ± 1,34	48,35 ± 1,04
Str. Lucidum	30,03 ± 0,68	29,12 ± 0,65	31,34 ± 0,41	31,45 ± 0,48	27,09 ± 0,47
Str. Radiatum	32,58 ± 1,00	29,88 ± 0,87	30,22 ± 0,74	36,21 ± 0,85	28,77 ± 0,87.

Dentat girus'ta stratum molekulare katmanında, salin grubuna göre LPS ve LPS+*ATRA* verilen grupta anlamlı bir azalma gözlendi. *ATRA* verilen grup ile LPS verilen gruplar karşılaştırıldığında; her üç LPS grubunda EphB2 ekspresyonunda azalma gözlense de, LPS ve LPS+*ATRA* gruplarındaki azalmalar istatistiksel olarak anlamlı bulundu. Stratum granulare katmanında salin grubuna göre tüm gruplarda azalma gözlense de sadece LPS+Zy grubu ile arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıydı. *ATRA* verilen grup ile LPS ve LPS+Zy grupları arasında anlamlı bir azalma dikkati çekti (Şekil 27A-E).

Akut gruplarda EphB2 ekpresyonunun DG alanındaki ortalama ve standart sapma değerleri, Tablo 13'de verilmiştir.

Tablo 13. Akut gruplarda EphB2 ekpresyonunun DG alanındaki ortalama ve standart sapma değerleri tablosu

Akut Gruplar	Salin	LPS	LPS+ATRA	ATRA	LPS+ZY
Str. Molekulare	47,85 ± 0,50	44,39 ± 0,54	43,27 ± 0,64	49,87 ± 0,86	46,39 ± 0,51
Str. Granulare	58,77 ± 1,12	54,57 ± 0,89	55,17 ± 1,20	57,63 ± 1,06	53,09 ± 1,19



Şekil 27. Hipokampal DG bölgesinde, akut deney gruplarında EphB2'nin ekspresyonu. Sistemik akut LPS'nin ve *ATRA*'nın DG'da EphB2 ekspresyonuna etkisi ve gruplara ait temsili mikrograflar (A). DG'un histolojik katmanlarında EphB2'nin laminer ekpresyon paterni (B). DG'un histolojik katmanlarında EphB2 reseptörü ekspresyonunun akut gruplar arasındaki istatistiksel değerlendirme grafikleri (C, D). DG'un granuler nöronlarındaki EphB2 kümelenmesi, beyaz ok yüksek derecede kümelenme, siyah ok düşük derecede Eph B2 reseptör kümelenmesi (E). * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$. Anti-EphB2 (FITC), DAPI.

4.4.3. Kronik sistemik LPS ve *ATRA*'nın hipokampal EphA4 ve EphB2 ekpresyonuna etkisi

4.4.3.1. Kronik nöroinflamasyonun ve *ATRA*'nın, hipokampal EphA4 ekspresyonuna etkisi

Kronik gruplarda EphA4 ekspresyonu değerlendirmelerinde hipokampüsün CA1 bölgesinin stratum oriens katmanında; salin grubuna göre LPS uygulanan gruplarda (LPS, LPS+*ATRA* ve LPS+Zy) istatistiksel olarak anlamlı bir artış gözlendi. LPS+*ATRA* grubunda *ATRA* verilen gruba göre EphA4 ekspresyonu açısından anlamlı artış saptandı. LPS+Zy grubunda *ATRA* grubuna göre EphA4 ekspresyonunda izlenen yüksek EphA4 ekspresyonu da istatistiksel olarak anlamlı bulundu. Genel olarak stratum oriens katmanında LPS verilen gruplarda EphA4 ekspresyonu artmıştı.

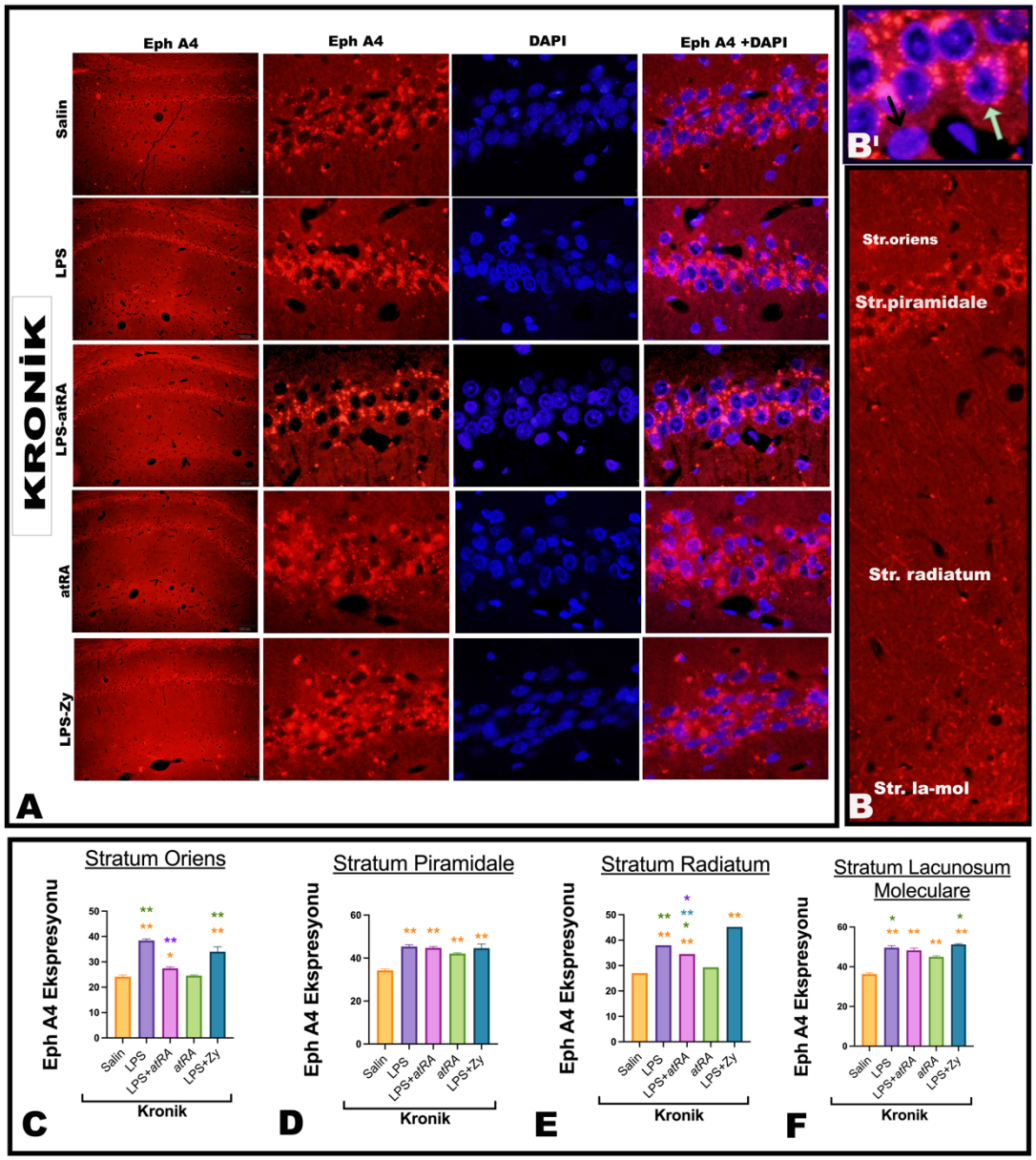
Stratum radiatum katmanında, salin grubuna göre LPS verilen gruplarda (LPS, LPS+*ATRA* ve LPS+Zy) EphA4 ekspresyonunda saptanan artış istatistiksel olarak anlamlı bulundu. LPS grubunda LPS+*ATRA* grubuna kıyasla anlamlı artış belirlendi. LPS verilen gruplarda (LPS, LPS+*ATRA* ve LPS+Zy) *ATRA* grubuna göre EphA4 ekspresyonu yönünden saptanan artış anlamlıydı. LPS grupları kendi aralarında karşılaştırıldığında; LPS ve LPS+Zy verilen gruplarda LPS+*ATRA* grubuna göre anlamlı artış görüldü. Stratum radiatum katmanında LPS'nin EphA4 ekspresyonunu arttırdığı, *ATRA* uygulamasının ise EphA4 ekspresyonunu azalttığı dikkati çekti.

Stratum piramidale katmanında, salin grubuna göre diğer tüm gruplarda gözlenen anlamlı artış, kronik LPS ve *ATRA* uygulamasının stratum piramidale katmanında EphA4 ekspresyonunu arttırdığının ifadesidir.

Stratum lacunosum/moleculare katmanında EphA4 ekspresyonu açısından yine tüm gruplarda salin grubuna göre anlamlı artış belirlendi. *ATRA* grubuna göre LPS ve LPS+Zy uygulanan grupların EphA4 ekspresyon düzeyleri daha yüksek bulundu ve istatistiksel olarak anlamlılık söz konusuydu.

LPS+*ATRA* verilen grupta diğer LPS gruplarına (LPS ve LPS+Zy) göre EphA4'ün daha aşağıya inmesi, *ATRA* uygulamasının EphA4 ekspresyonunu kısmen azalttığı yönünde yorumlandı (Şekil 28A-F).

Kronik gruplarda EphA4 ekpresyonunun CA1 alanındaki ortalama ve standart sapma değerleri, Tablo 14'de verilmiştir.



Şekil 28. Hipokampal CA1 bölgesinde, kronik deney gruplarında EphA4'ün ekspresyonu. Sistemik kronik LPS'nin ve *ATRA*'nın hipokampusta EphA4 ekspresyonuna etkisi (A). CA1'in histolojik katmanlarında EphA4'ün laminer ekpresyon paterni (B). CA 1 piramidal nöronlarındaki Eph A4 kümelenmesi, yeşil ok yüksek derecede kümelenme, siyah ok düşük derecede EphA4 reseptör kümelenmesi (B'). CA1'in histolojik katmanlarında EphA4 reseptörü ekspresyonunun kronik gruplar arasındaki istatistiksel değerlendirme grafikleri (C, D, E, F). Veriler ortalama ± standart sapma olarak sunulmuştur. * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$. Anti-EphA4 (Alexa flour 594), DAPI.

Tablo 14. Kronik gruplarda EphA4 ekpresyonunun CA1 alanındaki ortalama ve standart sapma değerleri tablosu.

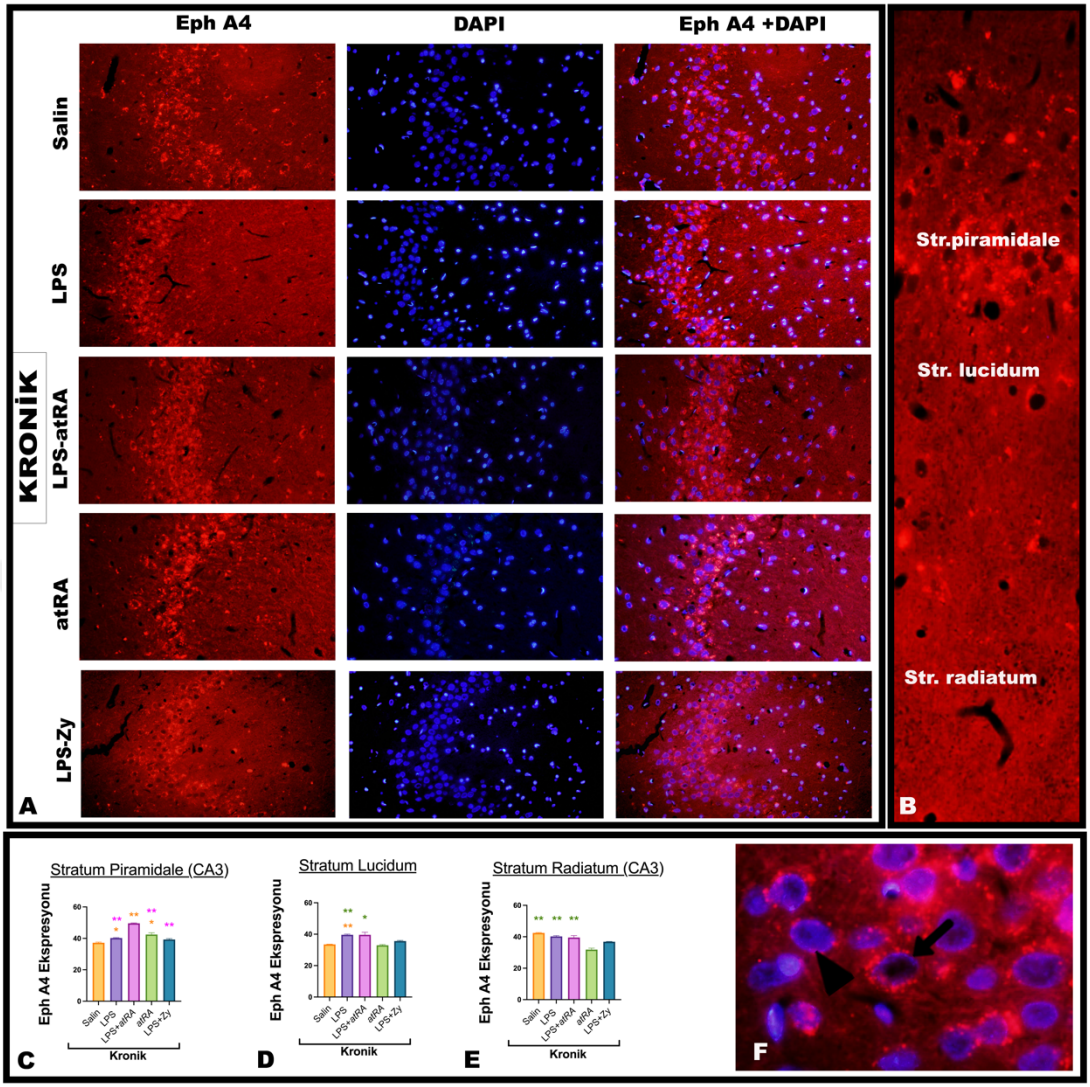
Kronik Gruplar	Salin	LPS	LPS+ATRA	ATRA	LPS+ZY
Str. Oriens	24.14 ± 0,62	38,45 ± 0,61	27,44 ± 0,54	24,54 ± 0,33	34,04 ± 1,92
Str. Radiatum	27,05 ± 0,89	37,97 ± 0,41	34,54 ± 0,40	29,32 ±0,75	45,20 ± 1,54
Str. Piramidale	34,27 ± 0,67	45,36 ± 0,86	44,37 ± 0,63	42,10 ±0,40	44,63 ± 1,88
Str. Lacunosum/molekulare	36,30 ± 0,62	49,60 ± 1,03	48,26 ± 1,13	44,99 ± 0,54	51,23 ± 0,35

CA3 bölgesinin stratum piramidale tabakasında EphA4 ekspresyonu incelendiğinde; salin grubuna göre diğer tüm gruplara EphA4 ekspresyon değerleri yüksek olmakla birlikte LPS, LPS+*ATRA* ve *ATRA* gruplarındaki artış istatistiksel olarak anlamlı bulundu. LPS+*ATRA* uygulanan grubun EphA4 ekspresyonu en yüksek değerde olup LPS, *ATRA* ve LPS+Zy grularına göre istatistiksel olarak anlamlılık gösterdi.

CA3'ün stratum lucidum katmanında, salin grubu ile karşılaştırıldığında LPS grubunda gözlenen artış istatistiksel olarak anlamlıydı. *ATRA* grubuna göre LPS, LPS+*ATRA* ve LPS+Zy gruplarındaki artış da yine anlamlı bulundu.

CA3'ün stratum radiatum katmanında EphA4 ekspresyonu en düşük çıkan grup *ATRA* grubu oldu. Diğer gruplarda (salin, LPS ve LPS+*ATRA*) gözlenen artışlar istatistiksel olarak anlamlı bulundu (Şekil 29A-F).

Kronik gruplarda EphA4 ekpresyonunun CA3 alanındaki ortalama ve standart sapma değerleri, Tablo 15'de verilmiştir.



Şekil 29. Hipokampal CA3 bölgesinde, kronik deney gruplarında EphA4'ün ekspresyonu. Sistemik kronik LPS'nin ve *ATRA*'nın CA3 alanında Eph A4 ekspresyonuna etkisi (A). CA3'ün histolojik katmanlarında Eph A4'ün laminer ekpresyon paterni (B). CA3 piramidal nöronlarındaki Eph A4 kümelenmesi, siyah ok yüksek derecede kümelenme, siyah okbaşı düşük derecede Eph A4 reseptör kümelenmesi. CA3'ün histolojik katmanlarında EphA4 reseptörü ekspresyonunun kronik gruplar arasındaki istatistiksel değerlendirme grafikleri (C, D, E). CA3 piramidal nöronlarındaki siyah ok yüksek derecede, siyah okbaşı düşük derecede Eph A4 reseptör kümelenmesi (F). *p <0,05; ** p <0,001. Anti-EphA4 (Alexa flour 594), DAPI.

Tablo 15. Kronik gruplarda EphA4 ekpresyonunun CA3 alanındaki ortalama ve standart sapma değerleri tablosu.

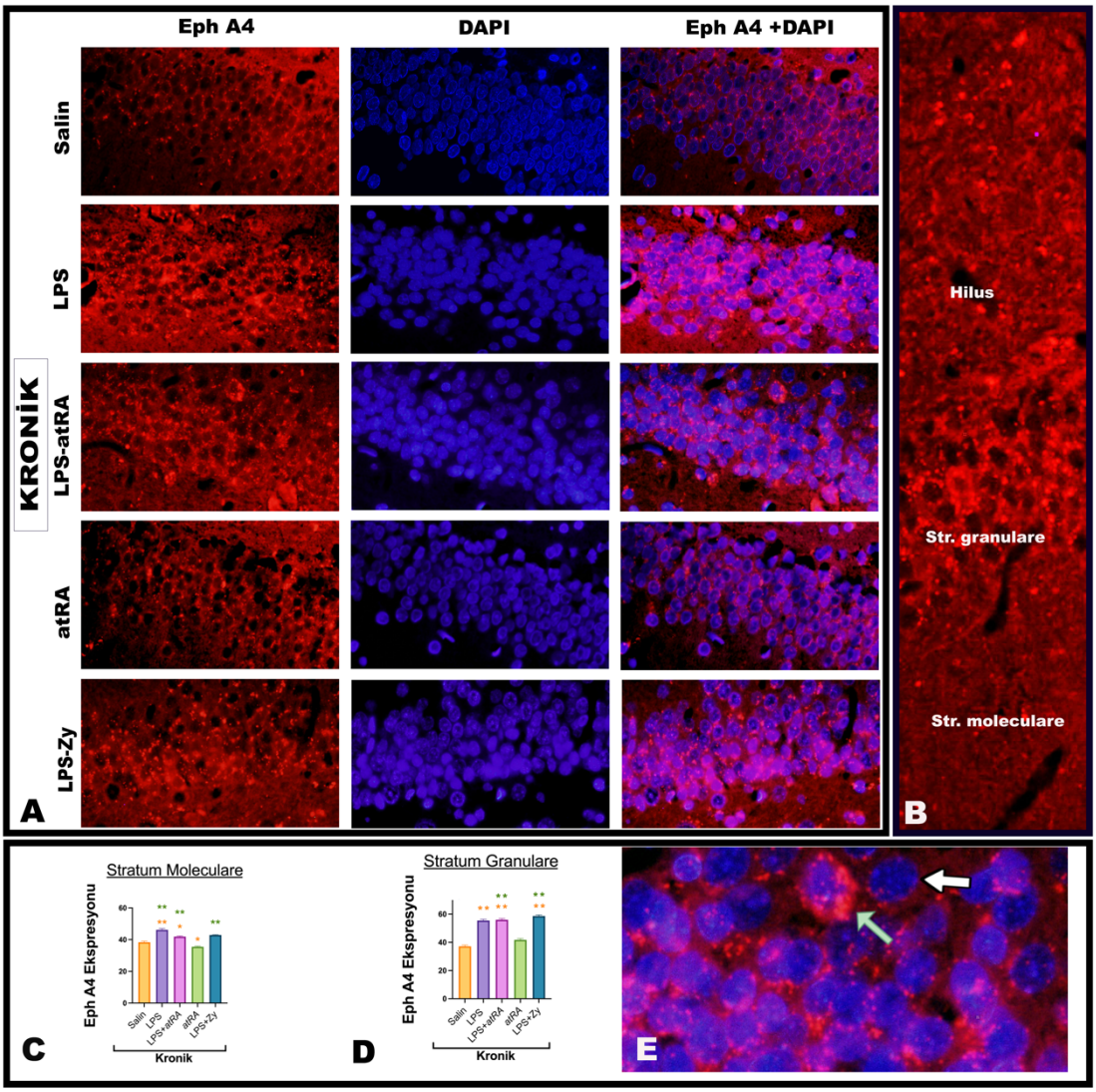
Kronik Gruplar	Salin	LPS	LPS+ATRA	ATRA	LPS+ZY
Str. Piramidale	37,17 ± 0,48	40,21 ± 0,24	49,54 ± 0,21	42,44 ±1,13	39,26 ± 0,57
Str. Lucidum	33,50 ± 0,16	39,62 ± 0,46	39,63 ± 1,61	32,97 ±0,44	35,62 ± 0,42
Str. Radiatum	42,44 ± 0,27	40,21 ± 0,51	39,51 ± 1,22	31,84 ±0,88	36,83 ± 0,18

Dentat girusun EphA4 ekspresyonu açısından değerlendirmelerinde; stratum moleculare katmanında, salin grubuna göre LPS verilen (LPS, LPS+*ATRA* ve LPS+Zy) gruplarda EphA4 ekspresyonunda saptanan yükseliş istatistiksel olarak anlamlı bulundu. LPS grubunda EphA4 ekspresyonu en yüksek seviyede gözlendi, bu artış LPS+*ATRA* ve *ATRA* gruplarına göre istatistiksel olarak da anlamlıydı. *ATRA* grubuna göre LPS+*ATRA* ve LPS+Zy grularında daha yüksek seviyede izlenen EphA4 ekspresyonunda anlamlılık söz konusuydu.

Dentat girusun hücresel katmanı olan stratum granularede, salin grubuna göre LPS verilen gruplarda (LPS, LPS+*ATRA* ve LPS+Zy) EphA4 ekspresyonunda anlamlı artış saptandı. *ATRA* grubuna göre LPS gruplarında (LPS, LPS+*ATRA* ve LPS+Zy) EphA4 ekspresyonunda istatistiksel olarak anlamlı artış bulundu (Şekil 30A-E).

LPS verilen grupların tümünde EphA4 ekspresyonunun belirgin biçimde artması, hipokampusun kronik nöroinflamatuvar yanıtında bu reseptörlerin rol aldığını düşündürmektedir.

Kronik gruplarda EphA4 ekpresyonunun DG alanındaki ortalama ve standart sapma değerleri, Tablo 16'da verilmiştir.



Şekil 30. Hipokampal DG bölgesinde, kronik deney gruplarında EphA4'ün ekspresyonu. Sistemik kronik LPS'nin ve *ATRA*'nın DG'da EphA4 ekspresyonuna etkisi (A). DG'un histolojik katmanlarında Eph A4'ün laminer ekpresyon paterni (B). DG'un 'in histolojik katmanlarında EphA4 reseptörü ekspresyonunun kronik gruplar arasındaki istatistiksel değerlendirme grafikleri (C, D). DG'un granuler nöronlarındaki Eph A4 kümelenmesi, yeşil ok yüksek derecede kümelenme, beyaz ok düşük derecede Eph A4 reseptör kümelenmesi (E). *p <0,05; ** p <0,001. Anti-EphA4 (Alexa flour 594), DAPI.

Tablo 16. Kronik gruplarda EphA4 ekpresyonunun DG alanındaki ortalama ve standart sapma değerleri tablosu.

Kronik Gruplar	Salin	LPS	LPS+ATRA	ATRA	LPS+ZY
Str. Molekulare	38,34 ± 0,70	46,19 ± 0,83	41,88 ± 0,21	35,49 ±0,45	42,91 ± 0,21
Str. Granulare	37,14 ± 0,97	55,46 ± 0,88	56,01 ± 0,85	41,74 ±0,91	58,66 ± 0,80

4.4.3.2. Kronik nöroinflamasyonun ve *ATRA*'nın, hipokampal EphB2 ekspresyonuna etkisi

Kronik nöroinflamasyon modelinde hipokampal CA1 bölgesinin stratum oriens tabakasında, salin grubuna göre diğer tüm gruplarda EphB2 ekspresyonunda belirlenen azalma istatistiksel olarak anlamlı bulundu. En fazla azalma LPS+Zy ve LPS gruplarında görüldü.

Stratum piramidale tabakasında, yine salin grubuna göre diğer tüm gruplarda EphB2 ekspresyonunda belirlenen azalma istatistiksel olarak anlamlıydı. *ATRA* grubuna göre LPS verilen gruplarda gözlenen azalmalardan LPS ve LPS+Zy gruplarının sonuçları istatistiksel anlamlılık gösterdi.

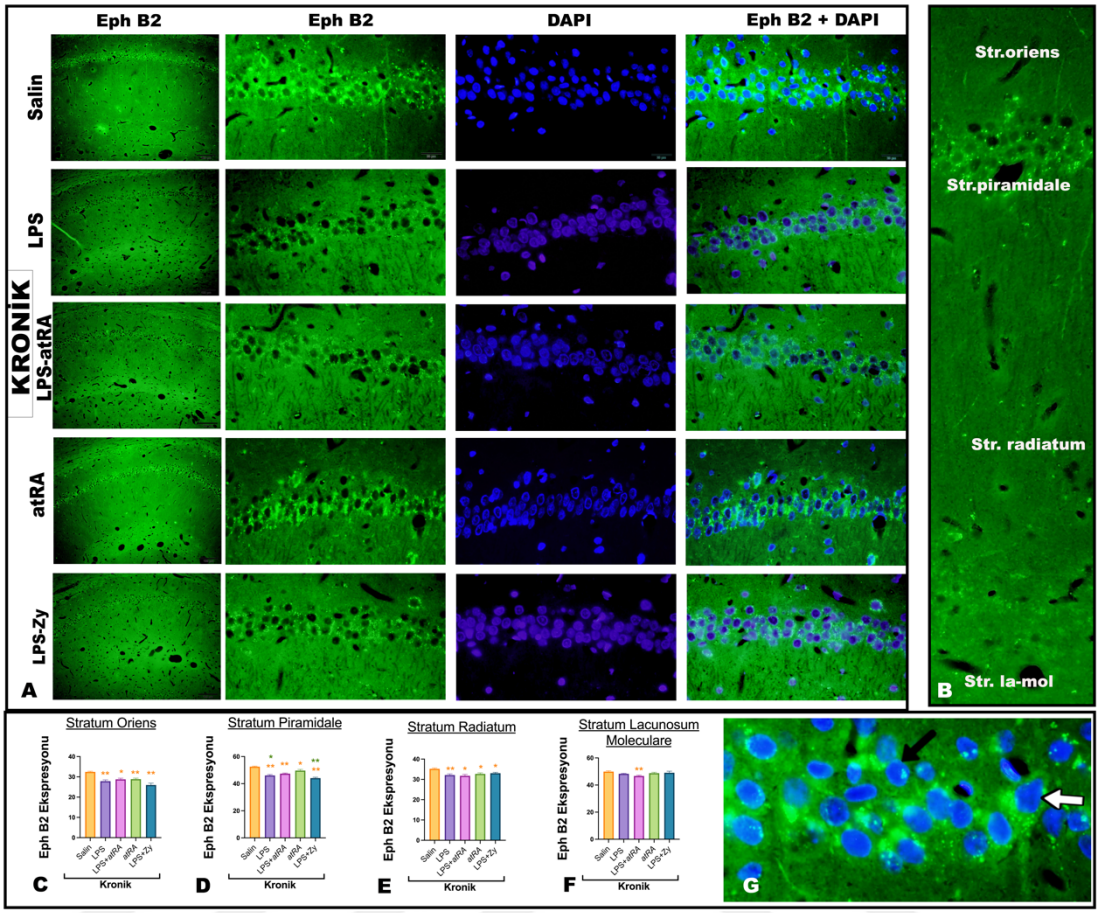
Stratum radiatum katmanında, salin grubuna göre EphB2 ekspresyonundaki azalma LPS, LPS+*ATRA* ve *ATRA* gruplarında anlamlı bulundu. Bu katmanda en düşük EphB2 ekspresyonu LPS+*ATRA* grubunda gözlendi.

Stratum lakunosum/molekulare katmanında, salin grubuna göre tüm gruplarda saptanan ekspresyon azalışı, LPS+*ATRA* grubunda istatistiksel anlamlılık gösterdi (Şekil 31A-G).

Kronik gruplarda EphB2 ekpresyonunun CA1 alanındaki ortalama ve standart sapma değerleri, Tablo 17'de verilmiştir.

Tablo 17. Kronik gruplarda EphB2 ekpresyonunun CA1 alanındaki ortalama ve standart sapma değerleritablosu.

Kronik Gruplar	Salin	LPS	LPS+ATRA	ATRA	LPS+ZY
Str. Oriens:	32.43 ± 0,34	27,84 ± 0,66	28,76 ± 0,59	28,87 ± 0,51	25,98 ± 0,91
Str. Radiatum	35,20 ± 0,44	32,14 ± 0,56	31,78 ± 0,64	32,68 ±0,50	33,03 ± 0,45.
Str. Piramidale	52,57 ± 0,39	48,06 ± 0,66	47,40 ± 0,44	49,69 ±0,81	44,12 ± 0,67
Str. Lacunosum/molekulare	49,93 ± 0,62	48,31 ± 0,32	46,66 ± 0,59;	48,74 ± 0,65	49,08 ± 1,15.



Şekil 31. Hipokampal CA1 bölgesinde, kronik deney gruplarında EphB2'nin ekspresyonu. Sistemik kronik LPS'nin ve *ATRA*'nın CA1'de EphB2 ekspresyonuna etkisi ve gruplara ait temsili mikrograflar (A). CA1'in histolojik katmanlarında Eph B2'ün laminer ekpresyon paterni (B). CA1'in 'in histolojik katmanlarında EphB2 reseptörü ekspresyonunun kronik gruplar arasındaki istatistiksel değerlendirme grafikleri (C, D, E, F). CA1'in piramidal nöronlarındaki Eph B2 kümelenmesi, beyaz ok yüksek derecede kümelenme, siyah ok düşük derecede Eph B2 reseptör kümelenmesi (G). *p <0,05; ** p <0,001. Anti-EphB2 (FITC), DAPI.

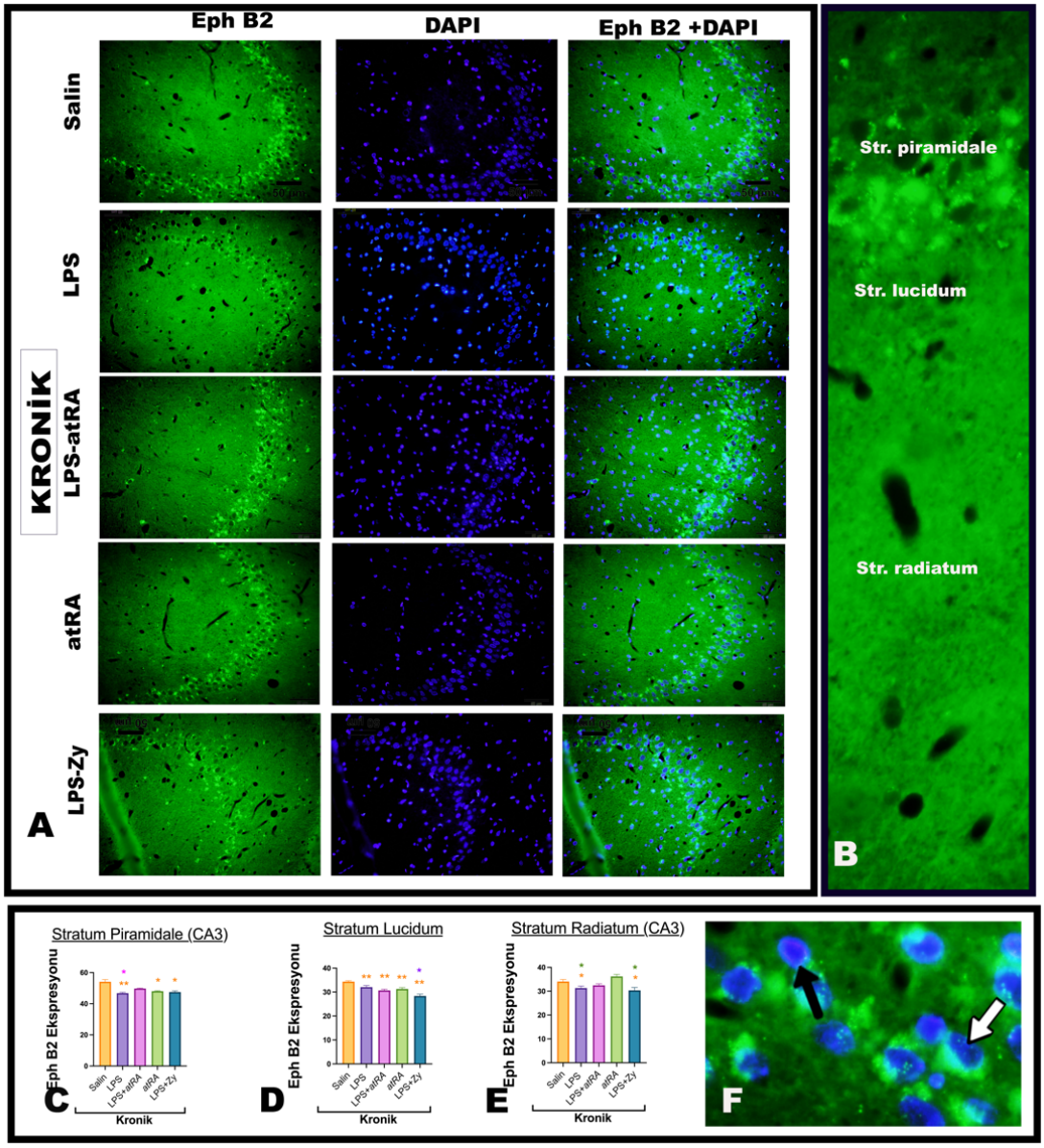
CA3 bölgesinin stratum pramidale katmanında, EphB2 ekspresyonunda en çok azalma LPS verilen grup oldu. Salin grubuna göre LPS, *ATRA* ve LPS+Zy gruplarındaki azalmalar istatistiksel olarak anlamlıydı. LPS grubuna kıyasla LPS+*ATRA* grubunda izlenen EphB2 ekspresyon artışı anlamlı olup, *ATRA*'nın olumlu etki ettiği şeklinde yorumlandı.

Stratum lucidum tabakasında, salin grubuna kıyasla EphB2 ekspresyonu bakımından tüm gruplarda istatistiksel olarak anlamlı azalma saptandı. Azalmanın en çok görüldüğü grup LPS+Zy grubu ile LPS grubu arasındaki fark da istatistiksel anlamlılık gösterdi.

Stratum radiatum katmanında, salin grubuna kıyasla LPS ve LPS+Zy

gruplarındaki azalmalar istatistiksel olarak anlamlıydı. Salin grubundan sonra ekspresyonun en yüksek olduğu *ATRA* grubuna göre LPS ve LPS+Zy gruplarındaki azalışlar anlamlılık gösterdi. Bu katmanda EphB2 ekspresyonu en düşük olarak LPS grubunda saptandı (Şekil 32A-F).

Kronik gruplarda EphB2 ekpresyonunun CA3 alanındaki ortalama ve standart sapma değerleri, Tablo 18'de verilmiştir.



Şekil 32. Hipokampal CA3 bölgesinde, kronik deney gruplarında EphB2'nin ekspresyonu. Sistemik kronik LPS'nin ve *ATRA*'nın CA3'de EphB2 ekspresyonuna etkisi ve gruplara ait temsili mikrograflar (A). CA1'in histolojik katmanlarında Eph B2'ün laminer ekpresyon paterni (B). CA3'ün histolojik katmanlarında EphB2 reseptörü ekspresyonunun kronik gruplar arasındaki istatistiksel değerlendirme grafikleri (C, D, E, F). CA1'in piramidal nöronlarındaki Eph B2 kümelenmesi, beyaz ok yüksek derecede kümelenme, siyah ok düşük derecede Eph B2 reseptör kümelenmesi (G). *p <0,05; ** p <0,001. Anti-EphB2 (FITC), DAPI.

Tablo 18. Kronik gruplarda Eph B2 ekpresyonunun CA3 alanındaki ortalama ve standart sapma değerleri tablosu.

Kronik Gruplar	Salin	LPS	LPS+ATRA	ATRA	LPS+ZY
Str. Piramidale	54,09 ± 1,43	46,77 ± 0,59	49,74 ± 0,34	48,08 ±0,33	47,52 ± 0,79
Str. Lucidum	34,35 ± 0,39	32,06 ± 0,67	30,67 ± 0,48	31,29 ±0,56	28,35 ± 0,74
Str. Radiatum:	34,07 ± 0,85	31,31 ± 0,85	32,47 ± 0,63	36,21 ±0,85	30,35 ± 1,20

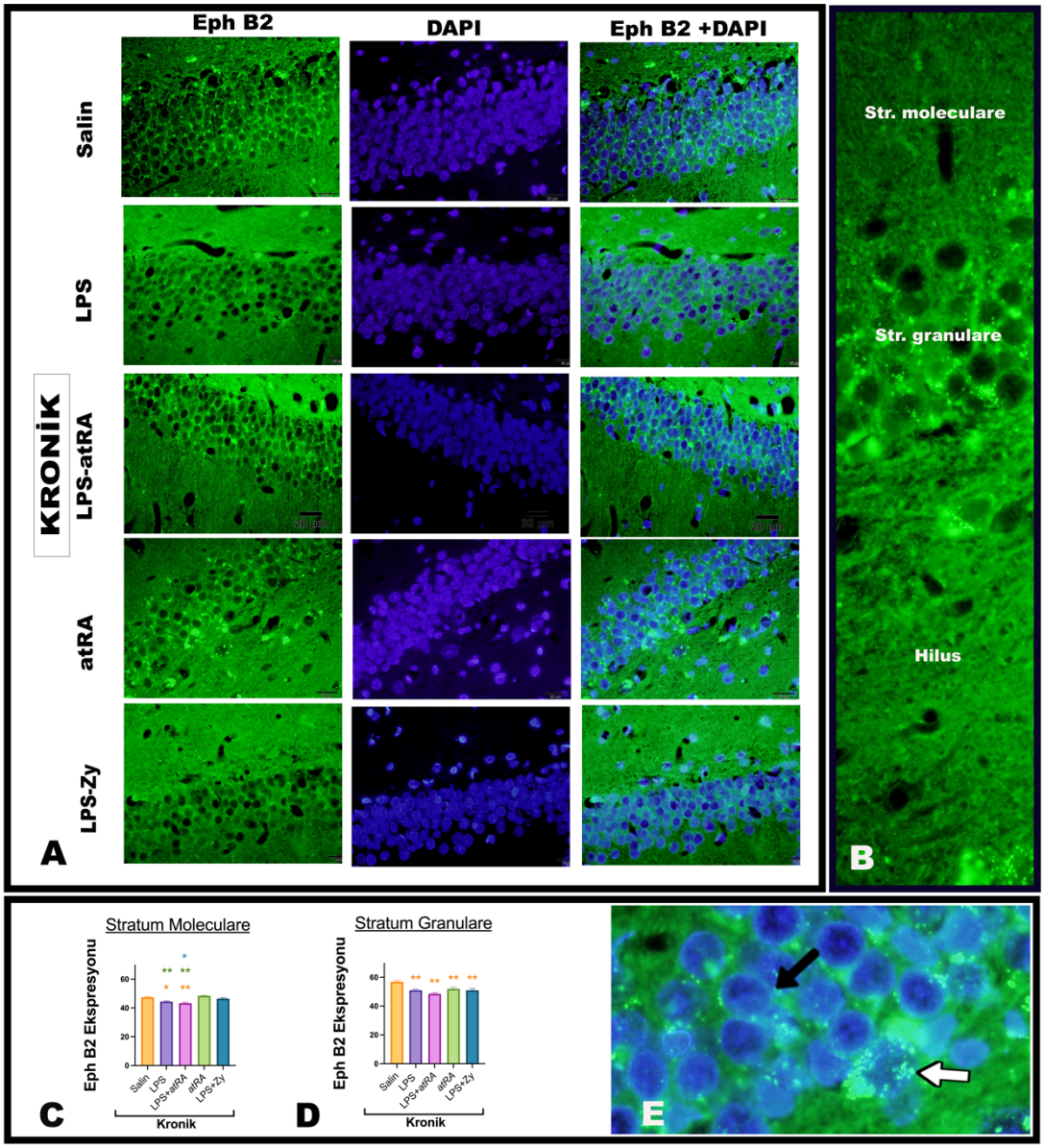
Dentat girusun stratum molekulare katmanında, salin grubu ile LPS ve LPS+*ATRA* gruplarındaki EphB2 ekspresyon azalışı anlamlı çıktı. *ATRA* grubuna kıyasla LPS ve LPS+*ATRA* gruplarında anlamlı azalma mevcuttu. LPS+*ATRA* grubu, EphB2 ekspresyonu bakımından en düşük ekspresyona sahip grup olarak dikkati çekti ve LPS+Zy grubuna göre anlamlı ekspresyon azalışı gösterdi.

Stratum granulare katmanında, salin grubuna göre tüm gruplarda gözlenen ekspresyon azalması istatistiksel olarak da anlamlı bulundu (Şekil 33A-E).

Kronik gruplarda EphB2 ekpresyonunun DG alanındaki ortalama ve standart sapma değerleri, Tablo 19'da verilmiştir.

Tablo 19. Kronik gruplarda Eph B2 ekpresyonunun DG alanındaki ortalama ve standart sapma değerleri tablosu.

Kronik Gruplar	Salin	LPS	LPS+ATRA	ATRA	LPS+ZY
Str. Molekulare	47,39 ± 0,49	44,39 ± 0,54	43,25 ± 0,58	48,42 ±0,31	46,47 ± 0,58
Str. Granulare	56,80 ± 1,03	51,00 ± 0,75	48,53 ± 0,79	51,94 ±1,11	50,89 ± 1,08



Şekil 33. Hipokampal DG bölgesinde, kronik deney gruplarında EphB2'nin ekspresyonu. Sistemik kronik LPS'nin ve *ATRA*'nın DG'da EphB2 ekspresyonuna etkisi ve gruplara ait temsili mikrograflar (A). DG'un histolojik katmanlarında Eph B2'ün laminer ekpresyon paterni (B). DG'un 'in histolojik katmanlarında EphB2 reseptörü ekspresyonunun kronik gruplar arasındaki istatistiksel değerlendirme grafikleri (C, D). DG'un granuler nöronlarındaki Eph B2 kümelenmesi, beyaz ok yüksek derecede kümelenme, siyah ok düşük derecede Eph B2 reseptör kümelenmesi (E). *p <0,05; ** p <0,001. Anti-EphB2 (FITC), DAPI.

4.5.Bulguların Özeti

4.5.1. Akut gruplar

• LPS grubunda total lökositlerde dramatik bir düşüş ile birlikte, nötrofil yüzdelerinde artış gözlendi. LPS+*ATRA* uygulaması bulguları değiştirmeyerek benzer sonuçlara neden oldu. Uygulanan dozda sadece *ATRA* uygulaması, lökosit sayıları ve formül lökosit değerlerinde değişikliğe neden olmadı.

• LPS uygulaması keşif davranışında, lokomotor aktivitede azalma ve umutsuzluk davranışında artış gibi, hem hastalık- hem de depresyon-benzeri davranışlar olarak kabul edilen güçlü bir davranış değişikliğine neden oldu. LPS ile birlikte *ATRA* uygulanması, çok düşük bir oranda bu davranışları iyileştirdi. Uygulanan dozda yalnızca *ATRA* uygulaması ise, özellikle keşif davranışını bir miktar azaltarak düşük düzeyde davranışsal bozukluğa neden oldu.

• LPS grubunda, hipokampal alanda Iba-1 pozitif mikroglial hücrelerde aktivasyon ve sayıca artış saptandı. LPS+*ATRA* uygulaması, mikroglial yanıtı hafif bir şekilde baskıladı. *ATRA*'nın tek olarak kullanılması, istatistiksel olarak anlamlı olmayan hafif derece mikroglial yanıta neden oldu.

• LPS uygulaması, hipokampal alanlarda nörodejeneratif değişikliklere ve nöronal apoptoza neden oldu. İstatistiksel olarak anlamlı olmamakla birlikte LPS+*ATRA*, sağlıklı morfolojideki nöronların korunmasını sağlayarak, nöronal apoptozu kısmen önleyerek özellikle DG'da düşük düzeyde nöroprotektif etki gösterdi. Yalnızca *ATRA* uygulaması, nöronal morfolojide ve apoptozda değişikliğe neden olmadı.

• LPS etkisi ile, EphA4 reseptör ekspresyonu hipokampal CA1 alanının oriens katmanında artış gösterdi. LPS+*ATRA* uygulaması, ekspresyonda azalmaya ve iyileşmeye neden oldu. Yalnızca *ATRA* uygulaması da EphA4 ekspresyonunu arttırdı.

• LPS uygulaması, hipokampal CA3 alanının piramidale ve ratiatum katmanlarında EphA4 reseptör ekspresyonunu arttırdı. Radiatum katmanında LPS+*ATRA* verilimi EphA4 ekspresyonundaki artışı şiddetlendirdi. *ATRA*'nın tek uygulanması CA3 alanında EphA4 ekspresyonu açısından etkili olmadı.

• LPS etkisi ile hipokampal DG alanının moleküler ve granüler tabakalarında EphA4 ekspresyonunda artış gelişti. LPS+*ATRA* uygulaması, ekspresyon artışında bir değişikliğe neden olmadı. *ATRA*'nın tek uygulanması, DG'da EphA4 ekspresyonunu etkilemedi.

• Akut LPS, hipokampal CA1 alanında EphB2 reseptör ekspresyonunu oriens ve piramidale katmanlarında azaltırken, birlikte *ATRA* uygulaması etkili olmadı. Yalnızca *ATRA* uygulaması EphB2 ekspresyonunu etkilemedi.

• LPS sonrası hipokampal CA3 alanının lucidum ve radiatum katmanlarında EphB2 reseptörü ekspresyonu azaldı. *ATRA* uygulaması yalnızca lucidum katmanında artış sağladı. Normal koşullarda *ATRA* uygulanması EphB2 ekspresyonunu etkilemedi.

• Akut LPS uygulaması, hipokampal DG alanında EphB2 ekspresyonunu hem moleküler hem de granüler katmanlarda azaltırken, beraberinde *ATRA* uygulaması etkili olmadı. Yine sadece *ATRA* uygulamasının DG EphB2 ekspresyonu üzerinde etkisi bulunmadı.

4.5.2. Kronik gruplar

• Kronik LPS indüksiyonu total lökositlerde, monosit, lenfosit ve nötrofillerde artışa neden oldu. LPS+*ATRA* uygulaması total lökosit sayılarını iyileştirme yönünde etkili oldu. Ancak nötrofil oranında artışa, lenfosit yüzdesinde azalışa neden oldu. Normal koşullarda kronik *ATRA* uygulaması nötrofiliye neden oldu.

• Kronik LPS, keşif davranışında, lokomotor aktivitede azalma ile umutsuzluk davranışında artış gibi depresyon benzeri davranışlara neden oldu. LPS+*ATRA* uygulamaları LPS'in neden olduğu bu davranışları değiştirmedi. Sadece *ATRA* uygulaması ise, düşük düzeyde davranışsal bozukluğa neden oldu.

• LPS, Iba-1 immünpozitif mikroglia sayılarında dramatik bir artışa neden olarak, mikrogliaların fagositik fenotipe dönüşümünü tetikledi. Beraberinde *ATRA* uygulaması, LPS'in neden olduğu mikroglial artışı ve aktivasyon şiddetini kısmen azalttı. Yalnızca *ATRA* uygulamak, hafif derecede aktivasyona ve mikrogliosize neden oldu.

• Kronik LPS, hipokampal nöronlarda dejeneratif değişikliklere ve apoptozda artışa neden oldu. *ATRA*'nın LPS ile birlikte uygulanması, hipokampal nöronal hasarı ve nöron kaybını hafifletmedi. Kronik *ATRA* uygulaması ise, hafif derecede nöronal morfolojide bozukluğa neden olurken, apoptozu arttırdı.

• Kronik LPS indüksiyonu, hipokampal CA1 alanında EphA4 reseptör ekspresyonunu tüm katmanlarda arttırırken, LPS ile birlikte *ATRA* uygulaması, yalnızca oriens ve radiatum katmanlarında ekspresyonu düşürdü. *ATRA*, hafif derecede EphA4 ekspresyonunu arttırdı.

• Hipokampal CA3 alanının piramidale ve lucidum katmanlarında LPS EphA4 ekspresyonunu arttırdı. Birlikte *ATRA* uygulamak piramidale katmanında bu artışı şiddetlendirerek etki gösterdi. Kronik *ATRA* uygulaması, piramidal hücre katmanında EphA4 ekspresyonunu arttırdı, diğer katmanlarda ise azalttı.

• LPS, hipokampal DG alanında EphA4'ün ekpresyonunu her iki katmanda da arttırarak etki gösterirken, LPS ile birlikte *ATRA* uygulaması moleküler katmanda düşüşe neden oldu. *ATRA* uygulaması EphA4 ekspresyonunu etkilemedi.

• LPS indüksiyonu, hipokampal CA1 alanında EphB2 reseptör ekspresyonunu tüm katmanlarda azalttı. Birlikte *ATRA* uygulaması, LPS'in neden olduğu ekspresyon değişikliğini etkilemedi. *ATRA* uygulaması, lacunosum moleculere dışındaki diğer tüm katmanlarda EphB2 ekspresyonunu azaltarak etki gösterdi.

• Kronik LPS indüksiyonu, hipokampal CA3 alanında EphB2'nin ekspresyonunu tüm katmanlarda azalttı. LPS+*ATRA* uygulaması LPS'in neden olduğu bu azalma eğilimini değiştirmedi. *ATRA* uygulaması, piramidale ve lucidum katmanlarında EphB2 ekspresyonunu azalttı.

• Kronik LPS uygulaması, hipokampal DG alanında EphB2'nin ekspresyonunu her iki katmanda da azalttı. LPS ile birlikte *ATRA* uygulaması LPS'in neden olduğu bu azalma eğilimini değiştirmedi. Kronik *ATRA* uygulaması, yalnızca granüler hücre tabakasında EphB2 ekspresyonunda azalmaya neden oldu.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Sistemik inflamasyon ve *ATRA*'nın etkisi

Periferik kan lökositleri; nötrofiller, monositler, eozinofiller, bazofiller ve lenfositleri kapsar. Bu hücreler kan dolaşımı, lenf dolaşımı ve dokular arasında sürekli olarak vücutta dolaşırlar. Lökosit tipleri birbirlerinin yanıtlarını artırabilir veya azaltabilir. Bu yüksek düzeyde düzenlenmiş yanıt, süreklilik kazanan zorluklar karşısında homeostazı korunmasında rol oynar. Periferik kandan total lökosit ölçülmesi, enfeksiyon araştırılmalarında en yaygın kullanılan metriktir. Ancak yorumlanması tartışmalıdır, septik şok gibi ağır akut inflamatuvar durumların lökositoz veya lökopeniye neden olebileceği bildirilmektedir. Birçok septik olguda normal veya azalmış lökosit sayıları bulunabilir. Genellikle gecikmiş lökositoz olabilir. Örneğin, bakteriyemi ile hastaneye başvuran hastaların yarısında normal lökosit değerleri gözlenmiştir (Seigel ve ark., 2012). Bu nedenle önemli ölçüde anormal yüksek lökosit değeri enfeksiyon varlığını ciddi şekilde düşündürürken, normal veya düşük lökosit değerleri kesin olarak enfeksiyon varlığını dışlayamaz. Akut inflamatuvar bir durumdan şüphelenildiğinde, Lökositlerin son derece düşük olduğu durumlarda, nötrofil sayısının belirlenmesi önerilmektedir (olgun nötrofillerin mutlak sayısı+ mevcut bant nötrofiller) (Martins, Silveira, Viegas, & Beck, 2019). Nötrofiller, granülopoez ile kemik iliğinde üretilirler. Granülopoezin uyarılması, başta G-CSF olmak üzere IL-3, IL-6 gibi sitokinler tarafından düzenlenir (Kwok ve ark., 2023; Liu, Poursine-Laurent, Wu, & Link, 1997). Granülopoezin son üç aşaması olan metamiyelosit, band nötrofil ve segmentli nötrofil olgunlaşma aşamalarıdır (Ross, & Pawlina, 2010). Periferik kanda band nötrofillerin varlığı, inflamatuvar kaynaklı akut bir uyarım varlığının önemli bir işaretidir (Martins ve ark., 2019). Bununla birlikte, kronik bir inflamasyonun varlığının tespit edilmesi için total lökosit sayımlarını değerlendirmek genellikle daha güvenilirdir. Periferik yaymada lenfosit ve monositlerde artış, sistemik kronik inflamasyonun önemli bir göstergesi olarak bilinir (Hamad, & Mangla, 2023; Mangaonka, Tande, & Bekele, 2021).

Gram-negatif bakteri duvarının bir bileşeni olan LPS, inflamasyon kaynaklı çeşitli hastalık modellerini oluşturmak için ve hastalık davranışını incelemek için sıklıkla kullanılan bir indükleyici ajandır (Berg ve ark., 2004). Tez bulgularımızın periferik kan analizlerinde; akut LPS grubunda total lökosit sayısında azalma

görülmekle birlikte, nötrofil sayılarında ve nötrofil/lenfosit oranındaki artışlar akut inflamatuvar cevabın varlığını ifade etmektedir. Kemotaktik faktörlerin etkisi altında nötrofillerin ve makrofajların kandan enfeksiyon bölgelerine hızla göç ettiği bilinmektedir (Shin, Lee, & Choi, 2007). Çalışmamızda da toplam periferik lökosit sayısındaki azalmanın; LPS indüksiyonu sonrası 24. saatte, periferik kandan dokulara lökosit göçünün olması yani, akut faz yanıtı nedeniyle olduğu düşünülmüştür. Bu bulgularımız, LPS'nin akut enjeksiyonları ve çekal ligasyon perforasyon modelleri gibi endotoksemi modellerinin araştırıldığı çalışmaların sonuçları ile uyumludur (Cuccurullo ve ark., 2016; Gao, Yang, Chen, & Song, 2021; Shin, Lee, & Choi, 2007; Steven, Dib, Roohani, Kashani, Münzel, & Daiber, 2017). İmmün sistemde çözülmeyen yanıt, kronik inflamasyona ve doku hasarına yol açar. Deneysel çalışmalarla sistemik LPS enjeksiyonundan yaklaşık 48-72 saat sonra total lökosit sayılarının kontrole kıyasla arttığı bildirilmiştir (Lee ve ark., 2018; Zhong, Zhang, Hu, & Li, 2018). Tez çalışmamızın kronik dönem kan bulguları; uzun süreli LPS indüksiyonunun, lenfosit ve monosit oranlarını arttırarak toplam lökosit sayısında da artışa neden olduğu şeklinde yorumlanmıştır. Bulgularımız, kronik inflamasyon araştırma sonuçları ile paralellik göstermektedir.

Kronik LPS+*ATRA* grubunda, kontrole daha yakın sonuçlar elde edilmiştir. Bunun nedeni, lökositlerin dokulara göçünün azalması ve/veya kemik iliği aktivitesinin artması olabilir. Literatürde farklı organlarda inflamasyon modellerinin çalışıldığı çok sayıda araştırma mevcuttur. Sıçan kolit modelinin uygulandığı bir çalışmada; TNF-α ve nitrik oksit gibi inflamatuvar belirteçler A vitamini eksikliği olan grupta daha yüksek bulunmuş, bu eksikliğin NF-κB aktivasyonu ve kollajen oluşumu yoluyla inflamatuvar yanıtı güçlendirdiği şeklinde yorumlanmıştır. Yüksek derecedeki inflamatuvar yanıtın, A vitamini takviyesi ile düzeldiği bildirilmiştir (Reifen ve ark., 2002). Bir başka çalışmada, A vitamini eksikliğinin granülositlerin artmasına bağlı total lökosit sayısında artışa neden olduğu ve interferon-γ üretimini artırdığı görülmüştür. A vitamini eksikliği olan hayvanlar histaminin subkutan enjeksiyonundan sonra daha güçlü yanıt göstermiştir (Wiedermann, Chen, Enerback, Hanson, Kahu & Dahlgren, 1996). Bununla birlikte *ATRA*, LPS'in ligandı olduğu TLR fonksiyonlarını da etkileyebilir. İnsan monositlerinde TLR2 ekspresyonunu ve fonksiyonunu downregüle ettiği, TLR4'ün ekspresyonunu etkilemeden IL-12, TNF-α

ve IL-6 gibi TLR4 ile indüklenen sitokin salınımını inhibe ettiğini bildiren çalışmalar mevcuttur (Liu, Krutzik, Kim, & Modlin, 2005). Yine A vitamini eksikliğinde makrofaj-aracılı inflamasyonun IL-12 ve IFN-γ üretiminin artması nedeniyle şiddetlendiği, makrofajların bakterileri fagosite etme ve öldürme yeteneğinin de bozulduğu bildirilmiştir (Stephensen, 2001). Bu veriler, A vitamininin doğrudan ya da retinoid reseptörlerinin değişmiş ifadesi yoluyla konağın inflamatuvar tepkilerini modüle ettiğini göstermektedir. RA'in miyeloid soy farklılaşmasını uyarabildiği bilinmektedir. *ATRA*, nötrofillerin çekirdeğindeki RAR'a etki ederek, mTOR sinyal yolunun aktivasyonu yoluyla nötrofil farklılaşmasını ve heterojenliği indükler (Yu, & Sun, 2020). Bu bilgi, çalışmamızda inflamatuvar bir indüksiyon olmaksızın kronik *ATRA* uygulanan sıçanlarda total lökosit oranında ve nötrofil yüzdesindeki artışı açıklamaktadır. Süperfizyolojik *ATRA* konsantrasyonlarının, kemik iliğindeki malign hücrelerin metamiyelositlere, bantlara ve polimorfonükleer nötrofillere (PMN) farklılaşmasına neden olduğu Huang ve ark. (1988) tarafından bulunmuştur ve halen günümüzde kemik iliğinin in vitro tedavi yaklaşımı olarak akut promiyelositik lösemi (APL) hastalarının primer tedavisinde kullanılmaktadır. 28 günlük *ATRA* uygulaması sonrası artan total lökosit ve nötrofil bulgularımız, daha önce nötrofiller üzerindeki in-vivo diğer çalışmaların (Higuchi, & Nagahata, 2000; Seguin-Devaux ve ark., 2005) bulgularını doğrulamaktadır.

Sistemik LPS ve *ATRA* kaynaklı davranışsal değişiklikler

Depresyonda bağışıklık tepkisinin arttığını gösteren çalışmalar giderek artmaktadır. Bir dizi meta-analiz ile depresyonlu kişilerin en az bir alt kümesinde sistemik inflamasyonun rol oynadığı doğrulanmıştır. Major depresif bozukluklarda (MDB) inflamatuvar belirteçler olan nötrofil, lenfosit ve monositlerde artış olduğu bildirilmiştir (Zorrilla ve ark., 2001). Howren ve ark. (2009)'nın yaptığı 61 çalışmadan oluşan büyük bir meta-analizde; yaş, cinsiyet, vücut kitle indeksi (BMI) ve antidepresan ilaçlar dikkate alınsa bile depresyon ile CRP, IL-6 ve IL-1 arasında anlamlı ilişkiler bulunmuştur. Bir çalışmada bipolar bozukluk ve MDB hastalarında daha yüksek nötrofil/lenfosit ve monosit/lenfosit oranları olduğu bildirilmiştir (Mazza, Lucchi, Tringali, Rossetti, Botti & Clerici, 2018; Wei ve ark., 2022). Artan immün hücre ve proinflamatuvar sitokinlerin, depresyonun şiddeti ve intihar davranışıyla

yakından ilişkili olduğu da bildirilmiştir (Nowak, Bozek & Blukacz, 2019; Zhu ve ark., 2022).

İnflamasyon, depresyon gelişiminde rol oynayan önemli bir patojenik faktördür, LPS de inflamasyonu indükleyen bir ajan olarak sıklıkla kullanılır. Farklı doz, sıklık veya uygulama yolu ile farklı deneysel protokollere rağmen, LPS uygulanan kemirgenlerin cinsiyete özgü bir etkiyle artan (Millett ve ark., 2019) depresyon benzeri davranışlar sergilediği bildirilmiştir (Szot ve ark., 2017; Wickens ve ark., 2017; Yamawaki ve ark., 2018). Çalışmamızda LPS indüksiyonunda kullanılan doz, akut hastalık davranışı ile depresyonu ayırt edebilmek amacıyla seçilmiştir. Akut hastalık davranışını indüklemek amacıyla orta septik dozda, 5 mg/kg E. coli kaynaklı LPS'nin O55 B5 suşu uygulanmıştır. Bu doz, tek doz LPS uygulaması ile depresyon modellemelerinin dışına çıkabilmek amacıyla, depresyon-hastalık davranışı ayrımını yapabilmek için seçilmiştir. LPS indüksiyonunu izleyen 24 saatin sonunda davranış testleri uygulanmış ve hastalık davranışı-depresyon ortak davranış değerlendirmeleri yapılmıştır. Davranışsal bulgular, hayvanlardaki anksiyete ve depresyonun davranışsal ölçütü olarak kullanılan açık alan testi ve kuyruk süspansiyon testleri (Belovicova, Bogi, Csatlosova & Dubovicky, 2017) ile ölçülmüştür. Açık alan testindeki anksiyetenin davranışsal işaretleri, sıçanların daha önce karşılaşmadığı yeni çevreyi keşfetme isteği ve güvende kalma ihtiyacı arasındaki duygusal çatışmasına dayanır. Stresli hayvanların açık alan arenasında davranışlarını değiştirmesi (arenanın merkezinde geçirilen sürede azalma gibi) ve daha fazla kaygı göstermesi beklenir (Roth & Katz, 1979; Choleris ve ark., 2001; Meyer ve ark., 2006). Bu davranışta etkili olan bir diğer faktör de sıçanın lokomotor aktivitesidir. Gerçekten de değişmiş/azalan lokomotor aktivite, psikiyatrik bozuklukların temel belirtilerinden biridir ve tanı kriteri olarak kullanılır (American Psychiatric Association, 2000). Diğer davranış testi olan kuyruk süspansiyon testi (TST), hayvanın stresli durumdan kaçmaya çalışacağı varsayımına dayanır. Belli bir süre sonra hayvan mücadele etmeyi bırakır ve hareketsizlik oluşur. Uzamış hareketsizlik evreleri depresif davranışın işaretidir ve sıklıkla farelerde kullanılır (Can ve ark., 2011; Ueno ve ark., 2022). Test aynı zamanda, hayvanın hareket gücünü ve enerjisini değerlendirme olasılığını da sağlar. Test sırasında hayvan düşerse, deney sonlandığı için sıçan gibi daha ağır kemirgenler için bu test genellikle önerilmemektedir (Can ve ark., 2011). Literatürde birkaç örnek

dışında genellikte TST sıçanlarda kullanılmamıştır (Lee ve ark., 2018; Zhao, Pan, Tang, & Lin, 2018). Deneylerimizde ortalama ağırlıkları 200-250 gram Wistar ırkı dişi sıçanlarda TST'nin gerçekleştirilmesi mümkün oldu.

Literatürdeki bulgularla uyumlu olarak çalışmamızda, hem uzun dönem hem de kısa dönem LPS uygulanan sıçanlarda daha az keşif davranışı, lokomotor aktivite ve artan umutsuzluk davranışları gözlendi. Hem akut ve kronik LPS, hem de kronik *ATRA* uygulanan sıçanlarda salin kontrollerine kıyasla keşif davranışının azaldığı görüldü. Lokomotor aktivite sonuçları da anksiyete bulgularını destekler nitelikteydi. Sonuçlarımız LPS'nin inflamatuvar süreç ile anksiyete, depresyon gibi nöropsikiyatrik davranışların bozulması arasındaki ilişkiyi araştırmak için kullanılabilecek güvenilir bir molekül olduğunu, inflamasyon ile depresyonun yakından ilişkili olduğunu desteklemektedir. Bulgularımız ayrıca depresyonun bir alt popülasyonundaki hastaların periferik kan bulguları ile de tutarlıdır. 4 haftalık *ATRA* uygulamaları, depresif benzeri davranış üzerinde iyileştirici etkiye neden olmasa da periferik toplam lökosit sayılarında iyileşmeye neden olmuştur. Bu sonuçlarda *ATRA*'nın immünomodülatör ve immün hücre göçünü destekleyici rolü olduğu düşünülmüştür ve literatür bilgisi ile uyumludur (Kang ve ark., 2011; Huang, Liu, Qi, Brand & Zheng, 2018). Elde ettiğimiz davranışsal bulgulara göre, akut hastalık davranışı ve inflamasyonun neden olduğu depresif benzeri davranışların aynı davranışsal çıktı olduğu ve ayrılmaması gerektiği yönündedir. LPS modeline dayanan teoride de, insanlarda depresyonun inflamasyonla ilişkili olduğu ve inflamasyonun depresyonda hastalığa benzer davranışsal değişikliklere neden olduğu şeklindedir (Raison ve diğerleri, 2006). Bu yaklaşım tamamen inflamasyonun neden olduğu davranış değişikliklerine odaklanmakta, davranışlar arasında ayrım yapmayı amaçlamamaktadır.

Östrojen ve progesteronun, MSS ortamında güçlü anti-inflamatuvar maddeler olarak görev yaptığını ve östrojenin bağışıklık hücreleri üzerindeki ER-α reseptörlerine doğrudan bağlanması yoluyla dişi farelerde nörodejenerasyonu ve oksidatif hasarı azalttığı gösterilmiştir (Habib & Beyer, 2015). Östrojen seviyesindeki artışın dişi kemirgenlerde antidepresan benzeri bir role sahip olabileceği doğrulanmıştır. Ovarektominin zorunlu yüzdürme testinde (FST) yüzme süresinin azalmasına neden olduğu ve sıçanlarda kronik öngörülemeyen strese karşı

savunmasızlığı artırdığı gösterilmiştir (Lagunas ve ark., 2010). Dişilerin depresyona duyarlılığı ve östrojenin immün yanıt üzerindeki etkileri göz önüne alınarak (Ma ve ark., 2019; Millett ve ark., 2019) inflamatuvar yolaklar üzerinden depresyon oluşturmak üzere çalışmamızda deney hayvanı olarak dişi sıçanlar seçilmiş ve östrojen seviyelerinin en bazal seviyelerde olduğu bilinen diöstrus dönemlerinde deneyler gerçekleştirilmiştir. Bu sayede literatürdeki bilgilere uygun şekilde, östrojenin olası anti-inflamatuvar ve antidepresan etkileri minimize edilmiştir.

Sinirsel işlevlerle ilgili bazı rahatsızlıklar -kafa karışıklığı, sinirlilik, anksiyete, depresyon ve intihar düşüncesi gibi-, aşırı A vitamini alımından kaynaklanan yan etkiler listesinde de yer almaktadır (Snodgrass 1992). Ayı karaciğeri tüketimine bağlı olarak yüksek A vitamini konsantrasyonuna sahip bireylerde, akut davranış bozuklukları bildirilmiştir. Bu tür değişen davranışlar "kutup histerisi" olarak adlandırılmış ve şizofreni ile benzerlikleri öne sürülmüştür (Rodahl & Moore 1943; Restak 1972). Bir retinoid türevi olan 13-cis-retinoik asit (13-cis-RA, izotretinoin) ergenlik döneminde şiddetli nodüler akne tedavisi için sıklıkla reçete edilmektedir. İzotretinonin, Gıda ve İlaç İdaresi'nin (FDA) depresyonla ilişkili bulduğu ilk 10 ilaç arasındadır ve psikotropik olmayan tek ilaçtır. Belirtiler arasında depresyon, intihar düşüncesi ve psikoz sayılabilir (Barak ve ark., 2005; Bigby ve Stern, 1988; Byrne ve Hnatko, 1995; Hazen ve ark., 1983; Hull & D'Arcy, 2005; Ng ve Schweitzer, 2003; O'Connell ve ark., 2003; Scheinman ve ark., 1990; Wysowski ve ark., 2001). Kronik 13-cis-RA uygulanan akne hastalarında, depresyon semptomlarına aracılık ettiği bilinen bir beyin bölgesi olan orbitofrontal korteksin metabolik aktivitesinin önemli derecede değiştiği bildirilmiştir (Bremner, 2005). Sedef hastalığı için oral retinoid tedavisi uygulanması da psikiyatrik yan etkiler ile ilişkilendirilmiştir (Starling & Koo, 2005). *ATRA*, bir lösemi türü olan akut promiyelositik lösemi (APL)'nin tedavisi amacıyla sıklıkla kullanılan bir ajandır (Hanson & Leachman, 2001; Mi ve ark., 2012). Kullanım alanları nedeniyle RA terapisinin nöropsikiyatrik yan etkilerinin aydınlatılması önemli bir çalışma alanıdır. Retinoik asit türevlerinin kronik uygulamasının fare ve sıçanlarda depresyonla ilgili davranışları tetikleyebileceği hayvan çalışmalarıyla da doğrulanmıştır (Cai ve ark., 2010; Cai ve ark., 2015; Hu ve ark., 2013; Hu ve ark., 2016; O'Reilly ve ark., 2006). De Oliveira ve ark. (2007) tarafından yapılan çalışmada, sıçanlarda 28 günlük A vitamini takviyesinin açık-koyu

kutuda anksiyete- benzeri davranışa neden olduğunu ve açık alan testinde hareket ve keşfi azalttığı gösterilmiştir. Trent ve ark. (2009), erişkin sıçanlarda kronik 13-cis-RA uygulamasının (1 mg/kg/gün/i.p., 7-14 gün) saldırganlıkla ilgili davranışları artırdığını bildirmişlerdir. 13-cis-RA'in günlük 1mg/kg 21 gün uygulanmasının hipokampüste hücre proliferasyonunda önemli bir azalmaya neden olduğu, 13-cis-RA'nın (1 mg/kg) 6 hafta boyunca kronik uygulanmasının genç farelerde depresyonla ilişkili davranışları indüklediği bildirilmiştir (O'Reilly ve ark., 2006). *ATRA*'nın kronik uygulamasına dair deneysel çalışmalardan birinde, Cai ve ark. (2010)'ları 6 haftalık *ATRA* (2 mg/kg) enjeksiyonunun genç sıçanlarda davranış değişikliklerine neden olduğunu ifade etmişlerdir. Hu ve ark. (2016)'larının lateral serebral ventriküle enjekte ettikleri 19 gün süreli *ATRA* kürünün yetişkin sıçanlarda tipik depresyon benzeri davranışa neden olduğunu rapor etmişlerdir. Qin ve ark. (2020)'ları, kronik 10 mg/kg *ATRA*'nın sinaptik plastisite ile ilişkili genlerde bozulmaya neden olarak, farelerdeki depresif benzeri semptomlara neden olduğunı bildirmişlerdir. Çalışmamız, 24 saat gibi kısa süreli *ATRA* uygulamasını sıçanlardaki hastalık/depresyon benzeri davranışı üzerindeki etkisini inceleyen ilk çalışmadır. Bununla birlikte, *ATRA* uygulaması, *ATRA* ve 13-cis-RA kullanan diğer deneylerde de gösterilen sükroz tercih testinde depresyonun ana semptomu olan anhedoniyi indüklememiştir (Cai ve ark., 2010; Ferguson ve ark., 2007; Quin ve ark., 2009). Çalışmamızda açık alan ve TST testlerinde kronik *ATRA* uygulanan grup ve kronik LPS+*ATRA* grubun saptanan artmış depresyon davranışları literatürdeki bulgular ile tutarlıdır. Taranabilen literatürde *ATRA* ve diğer retinoidlerin akut uygulanmasının depresyon davranışları üzerindeki etkilerine ilişkin çalışmaya rastlanmamıştır. Bu anlamda çalışmamız, akut *ATRA* uygulamasının sıçanlardaki depresyon benzeri davranışlar üzerinde etkisini inceleyen ilk çalışmadır. *ATRA*'nın akut uygulama dozu kroniğe göre daha yüksek olmakla birlikte, açık alan arenasında istatistiksel olarak anlamlı olmayan birkaç bozulmuş parametre dışında davranışlar üzerinde olumsuz etkileri saptanmamıştır. Buna karşılık 28 gün kronik oral *ATRA* uygulamasının, retinoid ve duygudurum bozuklukları arasındaki olası ilişkilerle korele olarak, gerek kronik inflamatuvar koşullarda gerekse sağlıklı koşullarda depresyon benzeri davranışa neden olduğu belirlenmiştir. Bu bulgularımız, uzun süreli retinoid terapisinin davranış bozukluklarına neden olabilecek nörotoksik etkilerini doğrular niteliktedir.

LPS kaynaklı nöroinflamasyon: mikroglial yanıt ve *ATRA*'nın etkisi

Mikroglialar beyin gelişimi, nöral ortamın korunması, hasarlanma ve onarım süreçlerinde roller olan MSS'deki yerleşik makrofajlardır. Nöroinflamatuvar süreçlerde oldukça önemli rol oynarlar. LPS gibi PAMP'lar tarafından aktivasyon sonrası değişen mikroglial protein ekspresyonlarının sonucunda fenotip değişikliklerine uğrarlar (Roy, ve ark., 2006). Deneysel çalışmalar, LPS gibi periferik inflamatuvar uyaranların beyinde mikroglial aktivasyonla sonuçlanan derin bir immünolojik tepkiye neden olduğunu göstermiştir. Mikroglia aktivasyonu, akut LPS verilimini takiben sistemik inflamasyona yanıt vermede ve bu inflamatuvar yanıtı beyin içinde yaymada, davranışları etkilemede kritik rol oynar. Tek bir LPS indüksiyonu sonrası 3. saat itibatıyla mikroglialar aktive olmaya başlar. 8 saat ila 2 gün sonra derin aktivasyon durumuna ulaşırlar. 7 gün sonra normal dinlenme durumlarına geri dönebilirler (Hoogland, Houbolt, Westerloo, van Gool & van de Beek, 2015). Peng ve ark. (2005) yaptıkları çalışmalarında LPS ile nöroinflamasyonu tetiklediklerini ve mikrogliaları aktive ettiklerini bildirmişlerdir. Noh ve ark. (2014), tarafından yapılan bir çalışmada yine akut LPS uygulamasını takiben mikrogliaların aktive oldukları bildirilmiştir. Hipokampus ve prefrontal korteks gibi beyin bölgelerinde mikroglia belirteci iyonize kalsiyum bağlayıcı adaptör molekül-1 (Iba-1) ekspresyonunda artış görülmesi, kemirgenlerde LPS depresyon modelinde mikroglia aktivasyonunun karakteristik bulgusudur (Biesmans ve ark., 2013; van Buel, Patas, Peters, Bosker, Eisel & Klein ,2015). Bu bilgiler doğrultusunda biz de çalışmamızda LPS'nin mikroglial yanıt üzerindeki etkilerini incelemek için hipokampal mikrogliaların sayı ve aktivasyon durumlarını değerlendirdik. Akut sistemik LPS uygulamasından sonra, hipokampusta, Iba-1 (+) mikrogliaların sayıca arttığı, ağırlıklı olarak da aktive morfolojide mikrogliaların alanda bulunduğunu belirledik. Kronik sistemik LPS'nin ise, Iba-1 pozitivitesi gösteren mikroglia sayısında dramatik artış ile birlikte mikrogliaların aktive ve fagositik karaktere dönüşmelerine yol açtığını gözledik. Bulgularımız, literatür bilgisi ile tamamen paralellik göstermektedir.

İnflamasyonun yıkıcı özelliğine çeşitli moleküller ve yolaklar neden olmaktadır: Kompleman sistemi (Kalfayan & Kidd 1952), katyonik proteinler (Clark & Klebanoff 1975), sitokinler (Carswell, Old, Kassel, Green, Fiore & Williamson, 1975), reaktif oksijen türleri (Badwey & Karnovsky 1980; Carson, Thrash & Walter,

2006; Wallach, Kang & Kovalenko, 2014) gibi. Nöronlar, astrositler ve endotelyal hücreler arasında mikroglialar nöroinflamatuvar süreçlerin yanı sıra nörodejeneratif hastalıklarda yer alan hücresel ve moleküler mekanizmalarda da merkezi bir rol oynamaktadır (Ekdahl, Kokaia, & Lindvall, 2009; Hanisch 2002; Monji ve ark., 2013). Beyindeki RA sinyalleri, mikroglia aktivitesini down regüle eder. Sıçanlarda reaktif mikroglialardan salgılanan proinflamatuvar mediatörlerin hem mRNA'sını hem de protein ekspresyonunu zayıflatır (Dheen, Jun, Yan, Tay, & Ling, 2005; Hellmann-Regen, Kronenberg, Uhlemann, Freyer, Endres, & Gertz, 2013). Bu süreçte öne sürülen etki mekanizmalarından birisi, inflamatuvar yanıtın merkezinde yer alan inflamatuvar sinyal yolu NF-Kb'nin baskılanmasıdır (Austenaa ve ark., 2009). Takamura ve ark. (2017)'larının yapmış olduğu çalışmada; haftada 3 kere, 4 hafta boyunca 20 mg/kg *ATRA* uygulaması Alzheimer'ın transgenik hayvan modelinde mikroglial aktivasyonu baskıladığı bulunmuştur. Retinoik asidin beyinde bilinen sınırlı immünomodülatör işlevleri (Cai, Yan, Chen, Mebg & Zhou, 2010; Hu ve ark., 2013) dışında, akut nöroinflamasyonda immün cevaba etkisini bildiren ve ayrıca sağlıklı koşullarda retinoik asidin hem akut hem de kronik kullanımının mikroglial yanıtla ilişkisine dair literatür verisine rastlanmamıştır. Bulgularımız kapsamında mikroglia sayılarında düşme eğilimi nedeniyle; akut ve kronik nöroinflamatuvar koşullarda 6 mg/kg/gün dozda *ATRA* uygulamasının mikroglial yanıt üzerinden LPS ile oluşturulan nöroinflamasyonu baskılayabileceğini gösterdik. Sağlıklı koşullarda *ATRA*'nın akut tek doz ve uzun dönem kronik sistemik uygulanmasının da, mikroglial artışa ve aktivasyona neden olabileceği de literatürde rastlamadığımız ve bu anlamda mevcut literatüre katkı sağlaması açısından önemli bir bulgudur.

Hipokampal nörodejenerasyon ve nöronal apoptoz

MSS'deki nöronların ilerleyici işlev bozukluğu ve nöron kaybı olarak tanımlanan nörodejenerasyon ve nöron kaybı, depresyonun deneysel modellerinde ve klinik çalışmalarda değerlendirilen önemli kriterlerdendir. Depresyon nörodejeneratif hastalıklarda yaygın olarak görülür. Nöroinflamasyon her ikisi tarafından paylaşılan ortak bir mekanizma olabilir veya depresyonun kendisi nörodejenerasyon ile ilişkili olabilir. Nöronal devrenin aktivitesi, sadece ateşleme frekansına ve senkronizasyonuna bağlı değildir, aynı zamanda belirli bir aktivitede ve belirli bir bölgede bulunan nöronların sayısına ve türüne de bağlıdır. Bu nedenle, hipokampal

hücrelerin kaybı MDB gibi davranışsal sonuçlara neden olan patolojilerde önemli olabilir. Depresyondaki görüntüleme çalışmaları ile hipokampus, amigdala, prefrontal korteks, anterior singulat ve bazal ganglionların hacimlerinin azaldığı gösterilmiştir (Campbell & MacQueen, 2006). Azalmış hipokampal hacim, depresyondaki en tutarlı nörobiyolojik bulgulardan biridir (Campbell ve ark., 2004). Hipokampal hacim azalmaları ayrıca hastalık süresi ve hafıza bozukluğu ile de ilişkili görünmektedir (MacQueen ve ark., 2003).

Nissl boyaları ile koyu boyanan büzüşmüş nöronlar yani "karanlık nöronlar"ın varlığı, nöronal dejenerasyonun histokimyasal bir belirtisi olarak kabul edilir (Naseri ve ark., 2022). Karanlık nöron değerlendirmesi tartışmalı da olsa, güncel olarak nöronal dejenerasyonu tanımlamak için kullanılan hızlı ve kolay bir değerlendirme yoludur. Karanlık nöronların çok büyük bir kısmının (%90'dan fazla) ilerleyen sürelerde iyileşme evresine girebildiği bildirilmektedir (Csordas, Mazlo & Gallyas, 2003; Ahmadpour & Haghir, 2011; Gallyas, Hsu & Buzsaki, 1993). Bununla birlikte, yaklaşık %1-10'u kromatin parçalanması, vakuolizasyon gibi hücresel bozulmalar ve nihayetinde nöron ölümüne ilerleyen geri dönüşsüz sürece girebilir (Toth ve ark., 1997).

Çok sayıda çalışmada inflamasyonun doku hasarına ve hücre ölümüne yol açtığını gösterilmiştir. İnflamatuvar etken olarak LPS ve/veya LPS indüksiyonu ile salgılanan periferik inflamatuvar mediatörler, nöronal toksisiteyi tetiklemek ve nihayetinde beyinde hücre ölümüne yol açmak için kan-beyin bariyerini bozarak beyne girer (Banks ve ark., 2015). LPS, mitojen ile aktive olan protein kinaz p38'in fosforilasyonunu indükler (Han, Lee, Bibbs, & Ulevitch, 1994). Bu da hücresel bozulma ile sonuçlanan bir dizi hücre içi değişikliği tetikler. LPS'nin sistemik uygulamasının mitokondriyal apoptotik yolu tetiklediği ve apoptotik nörodejenerasyonu desteklediği gösterilmiştir (Hattori ve ark. 2010; Santhanasabapathy ve Sudhandiran 2015). TLR4 sinyallemesinin aktivasyonu, LPS uygulamasını takiben JNK sinyalleme kaskadını indükleyerek mitokondriyal apoptotik yolun ve nörodejenerasyonun aktivasyonuna neden olur (Tournier ve ark. 2000; Putcha ve ark. 2003). LPS'in ve tetiklediği moleküler yolakların nöronlarda (de Bock, Derijard, Dornand, Bockaert, & Rondouin, 1998) ve astrositlerde (Sharma, Patro, & Patro, 2016) hücresel ölümde rol oynadığı kanıtlanmıştır.

Biz de çalışmamızda nörodejenerasyon değerlendirmelerini krezil viyole ile boyanan kesitlerde, apoptozu ise TUNEL metodu ile boyanan kesitlerde gerçekleştirdik. Histopatolojik analizlerimiz, hem akut hem de kronik LPS'in, Nissl boyamasında koyu boyanan nöronlardaki artış ve apoptozdaki artış ile hipokampüste önemli nöronal hasarın varlığını ortaya koymuştur. Bu bulgularımız, depresif hastalardaki nörodejeneratif bulgularla ve LPS modellerindeki araştırma sonuçları ile özdeştir (Choi ve ark. 2009; Chen ve ark. 2018; Sayed ve ark. 2018). Bununla birlikte, beyinde nöroinflamatuvar koşullarda mikroglialardan salgılanan özellikle önemli iki sitokinden TNF ve interferonlar inflamasyona bağlı hücre ölümünü teşvik ederken, diğer yandan apoptotik hücrelerin fagosite edildiği de bilinmektedir (Wallach, Varfolomeev, Malinin, Goltsev, Kovalenko, & Boldin, 1999, Marín-Teva ve ark., 2011). Akut gruplardaki apoptotik hücre sayısındaki dramatik artışın kronik gruplarda gözlenmemesinin nedeni, kronik gruplarda fagositik morfolojideki mikroglial hücrelerin artışı lehine yorumlandı. Ancak bunun netleştirilmesi için, erken apoptoz belirteçlerini içeren daha detaylı çalışmaların yapılmasının yararlı olacağı düşünüldü.

Hipokampusta EphA4 ve EphB2'nin laminer ekspresyon paterni

Sıçan merkezi sinir sisteminde, EphA4 ve EphB2 proteinlerinin ekspresyonu immünohistokimya ve Western blot gibi antikor-antijen sistemine dayanan metotlarla gösterilmektedir (Li, Wang, Wang, Liu, Wan, & Wang, 2014; Liu ve ark., 2023). Western blot analizi, hücre ve doku bazında lokalizasyonlarına dair bir gösterge vermez. İmmunohistokimya ile hipokampal ekspresyonu inceleyen birkaç çalışma (Murai ve ark., 2003a; Murai ve ark., 2003b; Tremblay ve ark., 2009) haricinde genellikle bu proteinlerin hipokampusta histolojik alt katmanlardaki lokalizasyonuna odaklanılmamıştır. İmmunofloresan çalışmalarla EphA4'ün hipokampal ekspresyonunun anatomik olarak CA3 alanının stratum oriens ve stratum radiatumda katmanlarında en yüksek seviyelerde olduğu bildirilmiştir. EphB2'nin yoğun olarak hipokampusun CA1 ve dentat girusun granül nöronlarının dendritik bölgelerine, özellikle de yüksek NMDA reseptör ekspresyonuna sahip alt bölmelere lokalize olduğu bildirilmiştir (Henderson ve ark., 2001). Çalışmamızın bu konudaki bulguları ile, dişi sıçan hipokampusunda EphA4 ve EphB2 reseptörlerinin hem hücresel hem de hipokampal dokudaki lokalizasyon ve ekspresyon seviyelerine dair bilinen verileri bir kez daha destekleyerek güncellediğimizi düşünmekteyiz. CA bölgelerinde ve DG'daki

nöron somalarında membran reseptör kümelenmelerini temsil eden EphB2 ve EphA4 ekspresyonunu temsil eden floresan ışımalar saptadık. Bunlara ek olarak dendritik katmanlarda da floresan ışıma tespit ettik. Elde ettiğimiz sonuçlara göre DG'da hem EphA4 hem de EphB2'nin en yüksek ekspresyon gösteren anatomik katman olduğunu belirledik. Ayrıca cornu ammonisin alt katmanlarında, oriens ve radiatuma kıyasla perforan yol liflerini ve CA piramidal nöronlarının onlarla sinapslarını içeren lacunosum molekulare katmanında en yüksek ekspresyon oranı saptadık. Eph reseptörlerinin tespit edilen bu ekspresyonu, hipokampal alt alanlarda nöron somalarında ve postsinaptik alanlarda lokalizasyonu bildiren çalışmaları destekler niteliktedir. Ancak ilgili proteinlerin hipokampal lokalizasyonlarının değerlendirilmesinde, nöronal ve glial belirteçleri içeren ikili boyamaların da kullanılmasının sonuçlarımızı daha ileri taşıyacağı düşünüldü.

Eph reseptörlerinin nöroplastisitedeki rolleri

Uzun süreli güçlendirme (LTP) ve uzun süreli depresyon (LTD), merkezi sinir sisteminde hücresel bilgi depolama modelleri olarak çok dikkat çeken, belirli sinaptik aktivite kalıpları tarafından indüklenen sinaptik güçteki kalıcı değişikliklerdir. Eph reseptörleri postsinaptik membranda, α-amino-3-hidroksi-5-metil-4-izoksazolepropiyonik asit reseptör (AMPAR) miktarını etkileyen ve LTP'yi düzenleyen sinyal yollarıyla yakından ilişkilidirler. LTP'nin glutamat salınımında artış nedenli presinaptik bir değişiklikten mi, yoksa glutamata postsinaptik yanıtta bir artıştan kaynaklanan postsinaptik bir değişiklikten mi ya da presinaptik ve postsinaptik özelliklerde koordineli bir değişiklikten mi kaynaklandığı halen önemli bir sorudur ve tartışmalıdır. Bazı araştırmacılar LTP'nin büyük ölçüde postsinaptik olduğunu ve AMPAR'lerinin postsinaptik membrana yerleştirilmesinden kaynaklandığını belirtmektedir (Huganir, & Nicoll, 2013; Nicoll, & Roche, 2013). Diğer bazı araştırmacılar ise, LTP'nin büyük ölçüde presinaptik olduğunu (Enoki, Hu, Hamilton, & Fine, 2009) veya farklı pre- ve post-sinaptik süreçlerin bir karışımı olduğunu (Bliss, & Collingridge, 1993) savunmaktadırlar. Sinaptik temas bölgelerinde, spina adı verilen nöronların dendritleri üzerinde mikroskobik çıkıntılar bulunur. Dendritik spinalar oldukça dinamik yapılardır, uyaranlara tepki olarak şekillerini ve boyutlarını değiştirirler. Kronik stres maruziyetinin neden olduğu depresyonda kronik antidepresan uygulamasının, hipokampusta dendrit şekillenmesinin düzensizliğini

yeniden eski haline getirdiği bilinmektedir (Duman, & Aghajanian, 2012; Norrholm, & Ouimet, 2001; Rubio ve ark., 2013). Depresyon gelişimi ve antidepresan etkinliği için hipokampusta dendritik dallanmadaki morfolojik şekillenme çok önemlidir (Bessa ve ark., 2009). Ek olarak, LTP ve LTD'ye dendritik omurga yoğunluğu ve morfolojisi eşlik eder. Bu nedenle, LTP, yeni dendritik dalların büyümesi ve önceden var olan dallanmanın genişlemesi ile yakından ilişkilidir (Segal, 2005). Çeşitli hayvan modellerinde eksitatör sinaptik kuvvet, yani sEPSC genliği ile dendritik spina boyutu arasında pozitif bir korelasyon olduğu gösterilmiştir (Bosch & Hayashi, 2012; Matsuzaki, Honkura, Ellis-Davies, & Kasai, 2004). Eph reseptörlerinin ana rollerinden birisi de, hücre iskeleti modifikasyonlarına neden olarak nöronal uzantıların morfolojik düzenlemesini sağlamaktır (Bouvier ve ark., 2008; Carmona ve ark., 2009; de Curtis, ve ark.2004; Goldshmit ve ark., 2004; Segura, ve ark., 2007) Literatür bilgisi ışığında biz de çalışmamızda sinaps gelişimi ve plastisitenin düzenlenmesinde rolü olduğu bilindiği için RTK'lerin Eph Eph reseptör alt ailesinin üyelerinden EphA4 ve EphB2 reseptörlerine odaklandık. EphA4 esas olarak yetişkin hipokampusunda nörotransmisyon ve sinaptik plastisitede baskılayıcı olarak eksprese edilir (Klein, 2008; Murai ve ark., 2003). EphhA4'ün aksine, EphB2 reseptörünün sinaptik plastisitede pozitif düzenleyici olarak rol oynadığı bilinmektedir (Attwood ve ark., 2011; Cisse ve ark., 2011; Koeppen ve ark., 2018).

EphA4 reseptörleri: Plastisitedeki temel rolleri ve depresyon ile ilişkileri

Dendritik spinalar ve dendritik dallanma morfolojisi EphA4 reseptörlerinin sinyallemesi ile düzenlenir. EphA4 reseptöründen nakavt fareler anormal dendrit morfolojisi sergiler. Bu durumun ephrin-A3 eksprese eden hipokampal glial etkileşimin yanı sıra, reseptörün kinaz aktivitesiyle bağlantılı olduğu bulunmuştur (Murai, Nguyen, Irie, Yamaguchi, & Pasquale, 2003). Ayrıca EphA4 reseptörünün epheksin-1'e bağımlı bir mekanizma ile dendrit morfolojisini modüle edebildiği de bildirilmiştir (Fu ve ark., 2007; Fu ve ark., 2014). Hipokampüste EphA4 reseptörüne ligand bağlanmasının Cdk5 aracılığıyla ephexin-1'i aktive ettiği, bunun daha sonra RhoA'yı aktive ettiği ve dendritik spinaların retraksiyonuyla sonuçlandığı belirlenmiştir (Fu ve ark., 2007). Ayrıca, EphA4-ephexin-1 sinyallemesinin kemirgenlerde PFC ve hipokampusta BDNF/TrkB ekspresyonunu ve sinyalleşmesini

down regüle ederek nöroplastisitenin değiştirilebileceği alternatif bir mekanizma da öne sürülmüştür (Zhang ve ark., 2017).

EphA reseptörleri, EphB reseptörlerinin aksine NMDA reseptörleri ile doğrudan etkileşime giremez (Contractor, Rogers, Maron, Henkemeyer, Swanson, & Heinemann, 2002), ancak yine de bu sınıftaki reseptörlerin dolaylı yoldan sinaptik plastisiteyi modüle ettiklerine dair kanıtlar vardır. Filosa ve ark. (2009), EphA4 reseptörü ve ephrin-A3 mutant farelerini kullanarak postsinaptik EphA4 reseptörü ile astrositik ephrin-A3 arasındaki bağlanmanın, glial glutamat taşıyıcı ekspresyonunu düzenlediğini ve dolayısıyla sinaptik sistemi modüle ettiğini bildirmişlerdir.

Sinaptik plastisiteyi dolaylı yoldan düzenleyici olarak EphA4'ün nöroinflamatuvar yolaklar üzerinden etkisini bildiren çalışmalar da vardır. EphA4, Alzheimer (Fu ve ark., 2014), amiyotrofik lateral skleroz (Wu ve ark., 2017), iskemi (Okyere ve ark., 2016) ve travmatik beyin hasarı (TBI) (Goldshmit, & Bourne, 2010) hastalık patolojilerinde rapor edilmiş, EphA4'ün nöral doku hasarına katkıda bulunduğu bildirilmiştir. Travmatik beyin hasarında EphA4 insanlarda ve insan olmayan primatlarda up-regüle olmuştur (Frugier ve ark., 2012; Goldshmit, & Bourne, 2010). Ayrıca, MSS hasarını takip eden saatler içinde ipsilateral kortekste EphA4 ekspresyonunda önemli artışlar bildirilmiştir (Kowalski ve ark., 2019). Bu da TBI'ı takiben beyinde inflamasyon indüksiyonu ile ilişkilidir. EphA4'ün nöronal olmayan mekanizma(lar) yoluyla da MSS hasarına aracılık ettiği bildirilmektedir (Hanell ve ark., 2012).

EphA4'ün MSS'deki rolleri bilinse de, depresyona katılımını gösteren doğrudan kanıtlar çok azdır. Farelerde kronik öngörülemeyen hafif stres modelinde, hipokampusta Western blot analiziyle tespit edilen artmış EphA4 ekspresyonu saptanmış, antidepresan tedavisi bu ekspresyon artışını azaltmıştır. (Li ve ark.,2014). PFC'sinde EphA4 reseptörünün viral vektör kaynaklı aşırı ekspresyonu, depresyon benzeri bir fenotipi indüklemiş ve EphA4 reseptörü inhibisyonu ile hızla tersine çevrilmiştir. Araştırmacılar EphA4 reseptör aktivasyonunun pro-depresif etkisinin, dendritik spinaların geri çekilmesinden kaynaklandığını öne sürmüşlerdir (Zhang ve ark., 2017). LPS ile oluşturulan inflamatuvar streste EphA4'ün ilişkisel rolünü bildiren literatürde yayımlanmış yalnızca bir çalışma mevcuttur. Bu çalışmada EphA4'ün miyelinizasyon üzerindeki olası etkileri üzerinden depresyon davranışına

odaklanılmış, öncelikle C57BL/6J farelerine 10 gün boyunca 0,5 mg/kg LPS ile inflamatuvar stres ve beraberinde kronik kısıtlama stresi uygulanmıştır. Farelerin eksitatör nöronlarında artmış EphA4 ekspresyonu saptanmış ve EphA4'ün shRNA'sının inhibisyonu sonucunda EphA4 kaynaklı beyindeki demiyelinizasyonu ve depresyon benzeri davranışları önlediği rapor edilmiştir. Araştırmacılar ayrıca postmortem beyin örneklerinde de değerlendirme yapmıştır. Depresyon tanılı vakaların örneklerinde, EphA4 ekspresyonunun artmış olduğunu tespit etmişlerdir. Bununla birlikte, çalışmalarında kullandıkları deney hayvanlarının erkek olduğunu ve depresyonun dişi cinsiyetteki yüksek prevalansına vurgu yaparak, dişi deneklerde deneylerin tekrar edilmesi gerektiğini ifade etmişlerdir (Li, Su, Chen, Nie, Yuan, & Wong, 2022). Literatür ile benzer şekilde tez çalışmamızda EphA4'ün floresan ekspresyon analizlerine dair verilerimize göre akut LPS; CA3 ve DG'un hücresel katmanları ile perforan yol-DG, perforan yol-CA1 ve DG-CA3 sinapslarında EphA4 ekspresyonunu arttırdığı, Schaffer kolleteralleri-CA1 sinapslarındaki ekspresyonu etkilememiştir. Kronik LPS uygulaması; CA1, CA3 ve DG'un hücresel katmanları ile, CA1-perforan yol, CA1-Shaffer kolleteralleri, DG-CA3 sinapslarında EphA4 ekspresyonunda artışa neden olmuştur. *ATRA* uygulaması ise akut nöroinflamasyonda; hipokampusun birçok katmanında EphA4 ekspresyonunu değiştirmezken yalnızca CA1 orienste iyileştirici yönde ekspresyon şiddetini azaltmış, CA3 alanında ise ekspresyonu daha da arttırmış, DG'de bir etkisi olmamıştır. Kronik nöroinflamasyonda *ATRA* uygulaması, CA1 ve DG alanında EphA4'te kısmi iyileşmelere neden olurken, CA3 alanında ekspresyon artışını şiddetlendirmiştir. Tek olarak *ATRA* uygulanması akut dönemde yalnızca CA1 oriens katmanında ekpsresyon artışına neden olmuştur. Kronik dönemde ise CA3 hücresel katmanında EphA4 ekspresyonunu arttırmıştır. Bu verilerimiz; *ATRA*'nın EphA4'e bağımlı mekanizmalar ile depresyon davranışında rol oynadığını, *ATRA*'nın daha önce bildirilen antiinflamatuvar ve sinaptik plastisitedeki modülatör etkileri ile EphA4'ün ekspresyonunu dolaylı yoldan modüle edebileceği ihtimalini düşündürmektedir.

Eph B2 reseptörleri: Plastisitedeki temel rolleri ve depresyon ile ilişkileri

Sinaptik plastisite ile ilgili olarak; kültüre edilmiş hipokampal nöronlarda ephrin-B1 (Dalva ve ark., 2000)'in eksojen uygulanmasıyla uyarıcı bir etki olan sinaps oluşumunu indüklemek için EphB2 reseptörünün, NMDA reseptörlerinin NR1 alt

birimi ile doğrudan etkileşime girdiği bulunmuştur. Buna paralel olarak postsinaptik EphB2 reseptörleri ve presinaptik ephrin-B ligandları arasındaki bağlanmanın bloke edilmesinin, hipokampüsün mossy fibrilleri-CA3 sinapslarında LTP'yi in vitro olarak inhibe ettiği bildirilmiştir (Contractor ve ark., 2002). Bu bulgular in vivo olarak da doğrulanmıştır; EphB2 nakavt fareler ile yapılan çalışmalarda, CA1 ve DG'da LTP'yi azalttığı ve Morris su labirentinde bozulmuş mekansal öğrenme ve hafıza olarak davranışsal sorunlara neden olduğu ileri sürülmüştür (Grunwald ve ark., 2001; Henderson ve ark., 2001). Özellikle EphB2 reseptörünün intrasellüler domaini bulunmayan fareler normal LTP fonksiyonu sergilediği için EphB2 reseptörünün indüklediği LTP'nin kinaz fonksiyonundan bağımsız olduğu düşünülmüştür (Henderson ve ark., 2001). Hipokampusta EphB2 DG, CA3 ve CA1 sinapslarında LTP'yi düzenler. Mossy fibrilleri-CA3 sinapslarında EphB2'nin pre-sinaptik EphrinB2'ye bağlanmasının bozulması, LTP'yi inhibe eder (Contractor, Rogers, Maron, Henkemeyer, Swanson, & Heinemann, 2002). Benzer şekilde, EphB-nakavt farelerde dentat girus sinapslarında ve CA1 sinapslarında LTP azalır (Grunwald ve ark., 2001; Henderson ve ark., 2001).

EphB2, yetişkin beynindeki eksitatör sinapslarda yüksek oranda bulunur. Sinaps ve dendritik dallanma, spina gelişimi ve sürdüürülmesinde rol oynar (Aoto ve Chen, 2007). EphB/Ephrin-B'ler, nöronal olgunlaşma ve sinaptik plastisite düzenlemelerindeki rolleri nedeniyle büyük ilgi çekmektedir. Dendritik spinaların şekillerini değiştirme yeteneği nöronal plastisitenin ayrılmaz bir parçasıdır. Spinalar filopodyumlardan oluşur ve olgun bir mantar şekli oluşturmadan önce bir dizi aşamadan geçer (Lippman & Dunaevsky, 2005). EphB2, Rho-family guanosin trifosfatazlar yoluyla endojen sindekan-2 veya aktin polimerizasyonunun kümelenmesine aracılık edebilen hipokampal nöronlarda dendritik omurga morfogenezinde önemli bir role sahiptir (Ethell ve ark., 2001; Irie ve Yamaguchi, 2002; Shi ve ark., 2009). EphB reseptörleri, dendritik omurga morfolojisinin korunmasında önemli bir rol oynar, bu nedenle EphB2'deki bir kayıp veya azalma, sinaptik aktiviteden yoksun olgunlaşmamış spinaların oluşumuna neden olur (Lacor ve ark., 2007; Henkemeyer, Itkis, Ngo, Hickmott, & Ethell, 2003). EphB2 eksikliği olan farelerde sinaptik iletim ve plastisitede bozulmalar (Simon ve ark., 2009) ve in vitro sinaps oluşumu sırasında postsinaptik dendritik filopodia'nın hareketliliğinde

azalma geliştiği bildirilmiştir (Kayser, Nolt, & Dalva, 2008). Bu nedenlerle EphB2'deki azalmalar, doğrudan depresyon patolojisine katkıda bulunabilir.

Çalışmalar, EphB2'nin anormal ekspresyonunun merkezi sinir sistemi hastalıklarına katkıda bulunduğunu göstermiştir. Hipokampal EphB2'nin azalması, Alzheimer hastalığının fare modelinde bozulmuş bilişsel işlevle ilişkili olduğu bildirilmiştir (Cisse ve ark., 2011; Simon ve ark., 2009). EphB2'nin duygusal öğrenme ve hafızada da rolü vardır (Cruz ve ark., 2015; Dines ve ark., 2015; Trabalza ve ark., 2012). EphB2 doğrudan NMDAR ile etkileşime girer ve NMDAR reseptör alt birimlerinin tirozin fosforilasyonuna aracılık eder. EphB2 kaybı, uzun süreli güçlendirmede ve sinaptik olarak lokalize NMDAR işlevinde bir azalmaya neden olur ve bu da nöronal disfonksiyona neden olur (Kayser, McClelland, Hughes, & Dalva, 2006). EphB reseptörlerinin davranıştaki rolü, genetiği değiştirilmiş fareler kullanılarak araştırılmıştır. EphB2 geninde eksiklik olan farelerin öğrenme ve bellek değerlendirmelerinde yabanıl tip farelere kıyasla (Grunwald ve ark., 2001) gizli platformu bulmak için daha uzun süre ve daha uzun yüzme yollarına ihtiyaç duymaları, mutant farelerin hipokampus temelli öğrenmede bir eksikliğini göstermektedir. EphB2 ve ligandı EphrinB1'in disfonksiyonu, biliş bozuklukları ve depresyon gibi beyin bozukluklarına yol açmıştır (Zhang ve ark., 2016; Koeppen ve ark., 2018). Hayvan depresyon modelleri ile EphB2'nin nöronal gelişim, NMDAR fonksiyonu, hipokampus ve PFC'nin sinaptik plastisitesini düzenlemede önemli rol oynadığı bulunmuştur (Zhang ve ark., 2016; Zhen ve ark., 2018). Çeşitli stres modellerinde MSS'de EphB2'nin ekspresyon düzeylerinde azalma gösterilmiştir. Kronik sosyal yenilgi stresi uygulanan farelerde, orbitofrontal kortekste (OFC) ve medial prefrontal kortekste (mPFC) EphB2 seviyelerinde ve bunların aşağı akış moleküllerinde azalmalar bulunmuş, açık alan sükroz tercih testi ve sosyal etkileşim testlerinde anormal davranışlar saptanmıştır. Bu etkilerin mPFC'de EphB2 reseptörlerinin EphrinB1-Fc ile aktivasyonu ile geri dönerek iyileştiği saptanmıştır. Ayrıca mPFC'deki EphB2 reseptörünün baskılanması, strese karşı duyarlılığı arttırmıştır. Bu davranışsal etkilerin, AMPA reseptörleri ve mPFC'deki diğer bazı sinaptik proteinlerin ekspresyonu ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Bununla birlikte aynı çalışmada, EphB2'nin mPFC'de stres kaynaklı dendritik morfolojinin yeniden modellemesini düzenlemede etkili olduğu bildirilmiştir (Zhang ve ark., 2016). Yapılan bir çalışmada,

korku koşullandırmanın, uzun süreli bellek oluşumu için gerekli olan nöronal iletim, nöronal morfogenez ve nöronal gelişimde yer alan proteinlerin mRNA seviyelerinde kalıcı bir değişikliğe yol açtığını, heterozigot EphB2 mutasyonu olan farelerde ise mRNA seviyelerinde değişiklik olmadığının gösterilmesi ile bu proteinlerin mRNA seviyelerinin EphB2 ye bağımlılığı doğrulanmıştır (Jana, Dines, Lalzar, & Lamprecht, 2023). NMDAR antikorlarının kronik serebroventriküler infüzyonu ile oluşturulan bir fare çalışmasında, ilerleyici hafıza eksikliği ve depresif benzeri davranış geliştiği gözlenmiştir. Bu bulgular, nöron somasında ve postsinaptik NMDAR ve EphB2 yoğunluğunda bir azalma ve plastisitede belirgin bozulma ile ilişkili bulunmuştur (Planagumà ve ark., 2016). Ancak literatürde yayımlanan EphB2 ile ilişkili tek LPS depresyon modelinde, hipotalamusu LPS ile indüklenen depresif farelerde EphB2 ve EphrinB1'in 'nin düzeylerinin gösterilmiştir (Wu ve ark., 2019). Bizim de, bulgularımıza göre, LPS ile indüklenen depresyonda, ilk kez hipokampuste EphB2'nin sinyalinde değişiklik bulundu. EphB2'nin immunofloresan ekspresyon analizlerine dair sonuçlarımız akut LPS'in; CA3 ve DG'ün hücresel katmanları ile perforan yol-DG sinapslarını, perforan yol-CA1, CA1-Shaffer kolleteralleri ve DG-CA3 sinapslarında katmanlarında EphB2 ekspresyonunu azaltıcı etkisi olduğunu göstermiştir. Kronik LPS uygulaması; CA1, CA3 ve DG'un hücresel ve sinaps katmanlarının çoğunda EphB2 ekspresyon düzeylerini azaltmıştır. Akut ve kronik nöroinflamasyonun her ikisinde de *ATRA* uygulanması; CA1, CA3, DG katmanlarındaki LPS'e bağlı EphB2 ekspresyon azalmalarını artırıcı yönde etkili olmadı. Tek *ATRA* uygulamak akut dönemde EphB2 ekspresyonlarını önemli düzeyde etkilemezken, kronik dönemde birçok katmanda (CA1'in perforan yol-CA1 sinapslarının olduğu lacunosum-moleculare dışındaki tüm katmanlar, CA1'in hücresel ve mossy fibrilleri-CA3 sinaspslarının olduğu lucidum katmanı ve DG'un hücresel katmanı) önemli düzeyde azalttığı görüldü. Bu bulgular inflamasyon kaynaklı plastisitede *ATRA*'nın EphB2 reseptörleri üzerinden iyileştirici bir rolü olamayabileceğini, aksine *ATRA*'nın uzun dönem kullanımının EphB2'ye bağlı mekanizmalar ile plastisitede bozukluklara yol açabileceğini düşündürmüştür. Postsinaptik membranda NMDA reseptörlerinin yoğunluğu ve dendritik morfolojinin pozitif regülasyonu ile yakından ilişkilendirilen EphB2'nin artışının, homosinaptik plastisite hakkında fikir vermesi makul bir yaklaşımdır. Bu noktada elde ettiğimiz

sonuçları daha ileri taşımak için, ilgili hipokampal alt birimlerdeki NMDAR alt birimleri nöronal morfoloji ile ilişkilendirecek (dendritik dallanma ve spina morfolojileri ile spina sayılarındaki değişiklikler gibi) daha kapsamlı çalışmaların yapılması yaralı olacaktır.

Sonuçlar ve Gelecek Perspektifleri

Benzer biyolojik etkilerine rağmen retinoik asit ve Eph reseptör sisteminin ilişkisi az sayıdaki embriyogenez, inflamasyon ve onkoloji çalışması ile sınırlı kalmıştır (Kao, Chen, Wu, & Lin, 2003; Leem ve ark., 2017; Molotkov, Molotkova, & Duester, 2006; Sen, Harpavat, Peters & Cepko, 2005; Shirato, Ujike, Kawase & Matsuyama, 2015), MSS'deki rolleri bu güne kadar incelenmemiştir. Çalışmamızda bazal ve inflamatuvar koşullardaki *ATRA*'nın hipokampüsteki etkilerine bakıldığında, EphB2 ekspresyonunun RA aktivitesine olan güçlü bağımlılığına karşın, nöroinflamasyonda artan EphA4 ekspresyonunun RA aktivitesine kısmen ve daha hafif olarak bağlı olduğu yorumu yapılabilir. Bununla birlikte, toplam reseptör ekpresyon düzeylerini değerlendirmenin, reseptör aktivasyonunun (fosforilasyon yoluyla) düzeyine eşdeğer olmadığını vurgulamak da önemlidir.

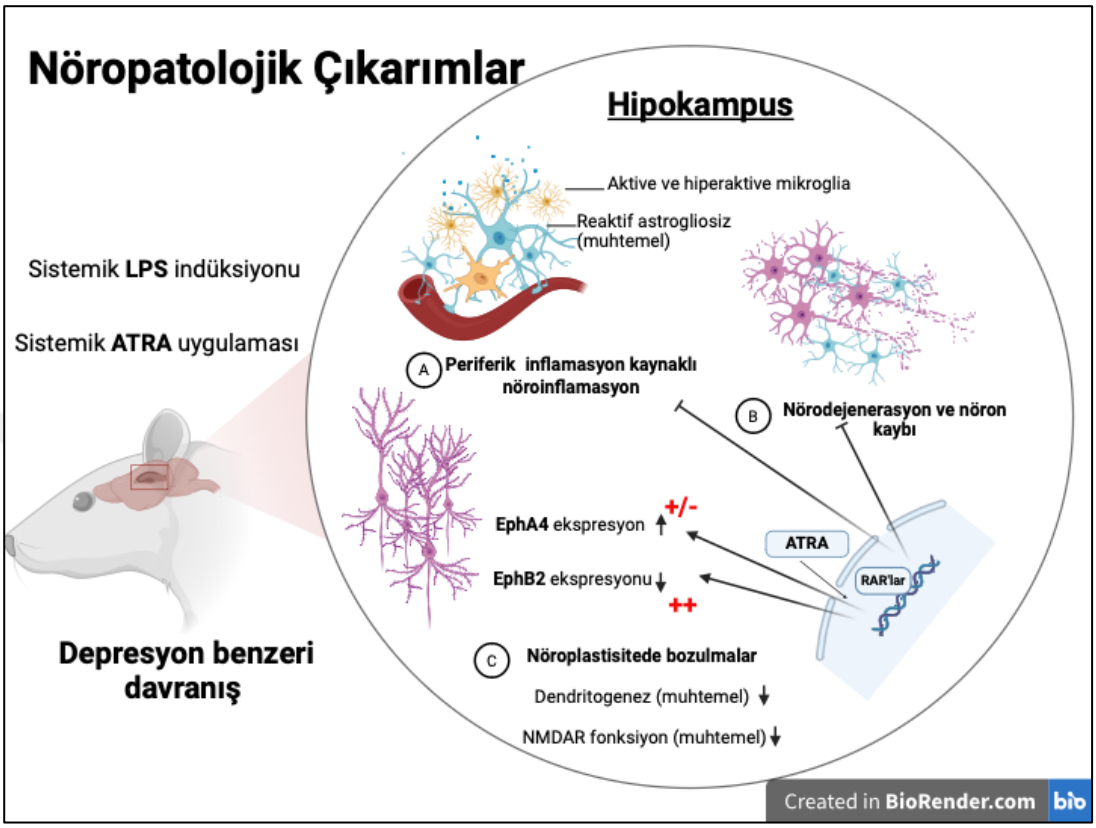
Çalışmamız, diğer depresyona odaklanan önceki çalışmalardan farklıdır. Çalışmamızda inflamasyon ve retinoik asit sistemi üzerinden hem ayrı ayrı hem de birlikte depresyon davranışı etkilerine odaklandık. Elde ettiğimiz sonuçlar da, bu fonksiyonu düzenleyebilecek moleküler mekanizmalar için kısmen ipuçları içermektedir. İnflamatuvar durumların neden olduğu hastalıklar, insan sağlığını etkileyen en yaygın durumlardan biridir ve toplum için sorundur. Aynı zamanda retinoidlerin hem beslenme hem de terapötik kullanımı sebebiyle yüksek doz alımına bağlı olan nöropsikiyatrik etkileri, anlaşılması gereken önemli bir sorundur. Bu bilgi eksikliklerinin kısmen çözümlenmesi sayesinde yapılacak küçük iyileştirmeler bile, depresyon gibi patolojiler için önemli bir etki yaratabilir. Depresyonu olan hastalar, birkaç nüks (mevcut bir atak, muhtemelen 3-12 ay) beklenen süre içinde semptomların erken geri dönüşü veya ilk kısa vadeli iyileşme veya remisyonun ardından daha sonra nüksler ile genellikle kronik olarak hastalanır (Forte, Baldessarini, Tondo, Vazquez, Pompili, & Girardi, 2015; Sim, Lau, Sim, Sum, & Baldessarini, 2015). Nüks oranları, bir indeks depresif epizodun on yılı içinde %85'in üzerindedir ve görünürde klinik

remisyondan sonraki altı ay içinde ortalama yaklaşık %50 veya daha fazladır (Sim ve ark., 2015).

Günümüzde depresyonun basit bir monoamin hipotezinden türetilen sinaptik bir etkiden ziyade, depresyonun patogenezini oluşturan nöronlar, süreçler ve sinapslardaki bir eksikliğin düzeltilmesini de kapsayan daha karmaşık bir anlayış ile yorumlanmasına gerek vardır. Nöronal fonksiyon ve sinaptik plastisite, binlerce protein ve bu proteinleri kodlayan genleri içeren çeşitli mekanizmalar tarafından düzenlenir. Tez çalışmasındaki odak noktamız olan Eph reseptör sistemi gibi retinoik asit sinyali ve nöroinflamatuvar sinyal kaynaklı olaylar, homeostatik sinaptik plastisite için önemlidir. Bu tez, Eph reseptörlerinin, bu yolun temel bir bileşeni olabileceğini göstermiştir. Hipokampüsün alt alanlarındaki Eph reseptörlerinin ekspresyon düzeylerindeki değişiklikler, postsinaptik alanlarda işlev görebileceğine dair bildirilen verileri güçlendirir niteliktedir. Çalışmamıza başlangıçta beyin fonksiyonlarını iyileştirmeyi amaçlayan, gelecekteki klinik yaklaşımlara katkıda bulunacak yeni yolları ve düzenleyici proteinleri tanımlama ve araştırma motivasyonu ile yola çıkılmıştır. Bulgularımız bu anlamda retinoik asit, nöroinflamasyon ve Eph reseptörlerini hedef alan, beyin fonksiyonunu iyileştirmeye yönelik çeşitli yaklaşımlara temel olabilir. Ancak elde ettiğimiz bulgular, sürecin anlaşılabilmesi için yeterli değildir. Retinoidlerin ve retinoik asit sinyalinin sağlıklı ve inflamatuvar koşullarda, hipokampal nöronlardaki Eph reseptörleri ile ilişkili nöroplastisitede olası işlevlerinin ve nöronal apoptozdaki rollerinin anlaşılabilmesi için daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır. Morfolojik ve sinaptik plastisitedeki moleküler yolakların daha iyi anlaşılabilmesi depresyonun anlaşılmasına, ayrıca depresyonla seyreden diğer nöropskiyatrik ve nörodejeneratif hastalıkların da anlaşılmasına ve yeni tedavi yollarının keşfine katkıda bulunacaktır.

Bu çalışmada, akut ve kronik inflamasyona maruz kalan dişi sıçanlarda, depresyon gibi davranışsal değişikliklere neden olduğu bilinen mikroglial aktivasyon, nöronal dejenerasyon ve Eph reseptör ekspresyonlarındaki değişiklikler değerlendirildi. Akut inflamasyonda bu etkilerin tek doz *ATRA* uygulanarak hafifletilebileceği, kronik *ATRA* uygulamasının hem inflamatuvar hem de sağlıklı koşullarda hipokampusta Eph reseptörlerinin ekspresyon düzeylerindeki değişikliklere

neden olduğu ve davranışsal bozuklukların gelişimi ile ilişkilendirilebileceği düşünüldü.



Şekil 34. Tez çalışmamızın bulgularına ve literatür tartışmasına göre dişi sıçanlardaki depresyon benzeri davranışa neden olan nöropatolojik çıkarımların grafiksel özeti. Sistemik LPS ve *ATRA* uygulamalarını takiben, periferden gelen immun sinyaller ve LPS, hipokampusta mikroglial aktivasyon ve muhtemel reaktif astrogliozisi içeren nöroinflamatuvar değişikliklere neden olur. Bununla birlikte sistemik (periferik inflamasyonun baskılanması) veya lokal *ATRA* etkisi ile nöroinflamasyon kısmen baskılanır (A). Nöroinflamasyonun sonucu olarak nörodejenerasyon ve nöronal kayıp gözlenir, *ATRA* sistemik inflamasyonu ya da lokal nöroinflamasyonu azaltarak, nörodejenerasyonu azaltabilir (B). Nöroinflamatuvar yanıtlarla veya beyindeki *ATRA*'nın indüklediği RAR sinyali, EphA4'ün ekspresyon artışına ve EphB2'nin ekspresyon azalışına bağlı muhtelemelen Eph sinyalini değiştirir, bu da muhtemelen morfolojik ve sinaptik plastisiteyi bozacak değişikliklere neden olarak, depresyon benzeri davranışa katkıda bulunabilir (C). Grafiksel çizim, yazar tarafından, https://www.biorender.com üzerinden oluşturulmuştur.

Sonuç olarak çalışmamızda;

*Nöroinflamasyonda retinoik asidin hipokampusta histolojik alt katmanlar düzeyinde EphA4 ve EphB2 reseptörlerinin ekspresyon düzeylerine etkisine dair ilk veriler sunulmuştur.

*Yüksek retinoik asit seviyelerinin (50 mg/kg) hipokampusta histolojik alt katmanlar düzeyinde EphA4 ve EphB2 reseptörlerinin ekspresyon düzeyine dair yine lüteratürdeki ilk verilerdir.

*Hipokampüste histolojik alt katmanlar düzeyinde retinoik asidin 24 saat gibi kısa süreli etkisini inceleyen ilk çalışmadır.

Gelecek perspektifleri;

Elde ettiğimiz verilere dayanarak bu tezin amaçlarını geliştirmek yönünde araştırılması düşünülen yeni konular, sonuçları ve doğrulamalarına dair bazı düşünceler aşağıda verilmiştir:

Sistemik uygulanan *ATRA*'nın MSS'ye ulaşan etkilerini doğrulamak için, hipokampal nöronlarda RAR reseptör ekspresyonu ile bu reseptörleri içeren nöronların aktivasyon düzeyleri incelenebilir.

Eph reseptör değişiklikleri, icv yoldan TLR ve/veya RAR antagonisti uygulanarak doğrulanabilir.

LPS ve retinoik asit ile indüklenen apoptozun, apoptotik hücrelerin mikroglialar tarafından fagositozu ile sonuçlanıp sonuçlanmadığının incelenmesi ve daha erken apoptoz belirteçleri ile nöronal apoptoz başka açılardan değerlendirilebilir.

MDB kaynaklı intihar vakalarında, postmortem beyin Eph reseptör ekspresyon düzeyleri incelenebilir.

6. KAYNAKLAR

Abbott, N. J., Patabendige, A. A. K., Dolman, D. E. M., Yusof, S. R., & Begley, D. J. (2010). Structure and function of the blood–brain barrier. Neurobiology of Disease, 37(1), 13–25. https://doi.org/10.1016/j.nbd.2009.07.030

Abrous, D. N., Koehl, M., & Moal, M. (2005). Adult neurogenesis: from precursors to network and physiology. *Physiological Reviews*, 85(2), 523-569. https://doi.org/10.1152/physrev.00055.2003.

Ahmadpour, S. H., & Haghir, H. (2011). Diabetes mellitus type 1 induces dark neuron formation in the dentate gyrus: a study by Gallyas' method and transmission electron microscopy. *Romanian Journal of Morphology and Embryology*, 52(2), 575-579.

Akdis, M., Burgler, S., Crameri, R., Eiwegger, T., Fujita, H., Gomez, E., ... Akdis, C. A. (2011). Interleukins, from 1 to 37, and interferon-γ: receptors, functions, and roles in diseases. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 127(3), 701–721. E1-70. https://doi.org/10.1016/j.jaci.2010.11.050

Albert, P. R. (2015). Why is depression more prevalent in women? *Journal of Psychiatry and Neuroscience*, 40, 219–221.

Alcantara, L. F., Parise, E. M., and Bolaños-Guzmán, C. A. (2017). "Neurobiology of mental illness,"in Animal Models of Mood Disorders, eds D. S. Charney, E. J. Nestler, P. Sklar, and J. D. Buxbaum (Oxord: Oxord University Press), doi: 10.1093/med/9780190681425.003.0026

Allan, S.M., and Rothwell, N.J. (2001). Cytokines and acute neurodegeneration. Nature reviews Neuroscience 2, 734-744.

Amann, P. M., Schadendorf, D., Owen, R. W., Korn, B., Eichmüller, S. B., & Bazhin, A. V. (2011). Retinal and retinol are potential regulators of gene expression in the keratinocyte cell line HaCaT. *Experimental Dermatology*, 20(4), 373–375. https://doi.org/10.1111/j.1600-0625.2010.01127.x

American Psychiatric Association (2000) Diagnostic and statistical manual of mental disorders. Washington, D.C.: American Psychiatric Press.

Amor, S., Puentes, F., Baker, D., & van der Valk, P. (2010). Inflammation in neurodegenerative diseases. *Immunology*, 129(2), 154–169. https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2009.03225.x

Anand KS, Dhikav V. (2012). Hippocampus in health and disease: An overview. Ann Indian Acad Neurol. Oct;15(4):239-46. doi: 10.4103/0972-2327.104323. PMID: 23349586; PMCID: PMC3548359.

Aoto J, Chen L (2007). Bidirectional ephrin/Eph signaling in synaptic functions. Brain Res 1184: 72–80.

Aoto, J., Nam, C. I., Poon, M. M., Ting, P., & Chen, L. (2008). Synaptic signaling by all-trans retinoic acid in homeostatic synaptic plasticity. Neuron, 60(2), 308–320. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2008.08.012.

Aoto, J., Nam, C. I., Poon, M. M., Ting, P., & Chen, L. (2008). Synaptic signaling by all-trans retinoic acid in homeostatic synaptic plasticity. Neuron, 60(2), 308–320. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2008.08.012

Augusto-Oliveira, M., Arrifano, G. P., Lopes-Araújo, A., Santos-Sacramento, L., Takeda, P. Y., Anthony, D. C., ... Crespo-Lopez, M. E. (2019). What do microglia really do in healthy adult brain? *Cells*, 8(10), 1293. https://doi.org/10.3390/cells8101293

Austenaa, L. M., Carlsen, H., Hollung, K., Blomhoff, H. K., & Blomhoff, R. (2009). Retinoic acid dampens LPS- induced NF-κB activity: results from human monoblasts and in vivo imaging of NF-κB reporter mice. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 20(9), 726–734. https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2008.07.002

Autry, A. E., Adachi, M., Cheng, P., & Monteggia, L. M. (2009). Gender-specific impact of brain-derived neurotrophic factor signaling on stress-induced depression-like behavior. *Biological Psychiatry*, 66, 84–90.

Azmitia, E.C., & Segal, M. (1978). An autoradiographic analysis of the differential ascending projections of the dorsal and median raphe nuclei in the rat. *The Journal of Comparative Neurology*, 179, 641-667.

Banks, W. A., Gray, A. M., Erickson, M. A., Salameh, T. S., Damodarasamy, M., Sheibani, N., Meabon, J. S., Wing, E. E., Morofuji, Y., Cook, D. G., & Reed, M. J. (2015). Lipopolysaccharide-induced blood-brain barrier disruption: roles of cyclooxygenase, oxidative stress, neuroinflammation, and elements of the neurovascular unit. Journal of Neuroinflammation, 12(1), 223. https://doi.org/10.1186/s12974-015-0434-1.

Barde, Y., Edgar, D., & Thoenen, H. (1982). Purification of a new neurotrophic factor from mammalian brain. *EMBO Journal*, 1, 549–553.

Bartkowska, K., Paquin, A., Gauthier, A. S., Kaplan, D. R., & Miller, F. D. (2007). Trk signaling regulates neural precursor cell proliferation and differentiation during cortical development. *Development*, 134(24), 4369-4380.

Basu, J., & Siegelbaum, S. A. (2015). The Corticohippocampal Circuit, Synaptic Plasticity, and Memory. Cold Spring Harbor perspectives in biology, 7(11), a021733. https://doi.org/10.1101/cshperspect.a021733

Baumann, H., & Gauldie, J. (1994). The acute phase response. *Immunology Today*, 15(2), 74–80. https://doi.org/10.1016/0167-5699(94)90137-6

Beattie, E.C., Stellwagen, D., Morishita, W., Bresnahan, J.C., Ha, B.K., Von Zastrow, M., Beattie, M.S., and Malenka, R.C. (2002). Control of synaptic strength by glial TNFalpha. Science 295, 2282-2285.

Becker, D., Zahn, N., Deller, T., and Vlachos, A. (2013). Tumor necrosis factor alpha maintains denervation-induced homeostatic synaptic plasticity of mouse dentate granule cells. Frontiers in cellular neuroscience 7, 257.

Belovicova K, Bogi E, Csatlosova K, Dubovicky M. (2017) Animal tests for anxiety-like and depression-like behavior in rats. Interdiscip Toxicol. Sep;10(1):40-43. doi: 10.1515/intox-2017-0006. PMID: 30123035; PMCID: PMC6096862.

Berg, B. M., Godbout, J. P., Kelley, K. W., & Johnson, R. W. (2004). α-Tocopherol attenuates lipopolysaccharide-induced sickness behavior in mice. *Brain, Behavior, and Immunity*, 18(2), 149–157. https://doi.org/10.1016/S0889-1591(03)00113-2

Bessa, J. M., Ferreira, D., Melo, I., Marques, F., Cerqueira, J. J., Palha, J. A., Almeida, O. F. X., & Sousa, N. (2009). The mood-improving actions of antidepressants do not depend on neurogenesis but are associated with neuronal remodeling. Molecular Psychiatry, 14(8), 764–773. https://doi.org/10.1038/mp.2008.119

Binder, D. K., & Scharfman, H. E. (2004). Brain-Derived Neurotrophic Factor. *Growth Factors*, 22(3), 123-131.

Binns, K.L., Taylor, P.P., Sicheri, F., Pawson, T., and Holland, S.J. (2000). Phosphorylation of tyrosine residues in the kinase domain and juxtamembrane

region regulates the biological and catalytic activities of Eph receptors. Mol Cell Biol 20, 4791-4805.
Björkholm, C., & Monteggia, L.M. (2015). BDNF—A key transducer of antidepressant effects. *Neuropharmacology*, 102, 72–79.
Blackstad, T. W. (1958). On the termination of some afferents to the hippocampus and fascia dentata. *Cells Tissues Organs*, 35(3), 202-214.
Blanchard, D. C., & Blanchard, R. J. (1990). Behavioral correlates of chronic dominance-subordination relationships of male rats in a seminatural situation. Neuroscience and biobehavioral reviews, 14(4), 455–462. https://doi.org/10.1016/s0149-7634(05)80068-5.
Bliss TV, Lomo T. 1973. Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. J Physiol 232: 331–356.
Bliss, T. V., & Collingridge, G. L. (1993). A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. Nature, 361(6407), 31–39. https://doi.org/10.1038/361031a0.
Block, M. L., & Hong, J. S. (2007). Chronic microglial activation and progressive dopaminergic neurotoxicity. *Biochemical Society Transactions*, 35(5), 1127–1132.
Blomhoff, R. & Blomhoff, H. K. (2006). Overview of retinoid metabolism and function. *Journal of Neurobiology*, 66, 606–630.
Blomqvist, A., & Engblom, D. (2018). Neural mechanisms of inflammation-induced fever. *Neuroscientist*, 24(4), 381–399.
Blume-Jensen, P., & Hunter, T. (2001). Oncogenic kinase signalling. *Nature*, 411(6835), 355–365. https://doi.org/10.1038/35077225
Bluthé, R. M., Layé, S., Michaud, B., Combe, C., Dantzer, R., & Parnet, P. (2000). Role of interleukin-1beta and tumour necrosis factor-alpha in lipopolysaccharide-induced sickness behaviour: a study with interleukin-1 type I receptor-deficient mice. *The European Journal of Neuroscience*, 12(12), 4447–4456.
Boelens Keun, J. T., van Heese, E. M., Laansma, M. A., Weeland, C. J., de Joode, N. T., van den Heuvel, O. A., ... van der Werf, Y. D. (2021). Structural assessment of thalamus morphology in brain disorders: A review and recommendation of thalamic nucleus segmentation and shape analysis. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 131, 466–478. https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2021.09.044
Bonhoeffer,T. & Yuste, R. (2002). Spine motility. Phenomenology, mechanisms, and function. *Neuron*, 35, 1019-1027.
Bonnet, E., Touyarot, K., Alfos, S., Pallet, V., Higueret, P., & Abrous, D. N. (2008). Retinoic acid restores adult hippocampal neurogenesis and reverses spatial memory deficit in vitamin A deprived rats. PloS one, 3(10), e3487. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003487
Bosch, M., & Hayashi, Y. (2012). Structural plasticity of dendritic spines. Current Opinion in Neurobiology, 22(3), 383–388. https://doi.org/10.1016/j.conb.2011.09.002
Bossù P, Cutuli D, Palladino I, Caporali P, Angelucci F, Laricchiuta D, Gelfo F, De Bartolo P, Caltagirone C, Petrosini L. (2012). A single intraperitoneal injection of endotoxin in rats induces long-lasting modifications in behavior and brain

protein levels of TNF-α and IL-18. J Neuroinflammation. May 29;9:101. doi: 10.1186/1742-2094-9-101. PMID: 22642744; PMCID: PMC3444884.
Bouvier, D., Corera, A. T., Tremblay, M., Riad, M., Chagnon, M., Murai, K. K., ... Doucet, G. (2008). Pre-synaptic and post-synaptic localization of EphA4 and EphB2 in adult mouse forebrain. *Journal of Neurochemistry*, 106(2), 682–695. https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2008.05416.x
Braak, H. (1974). On the structure of the human archicortex. *Cell and Tissue Research*, 152(3). https://doi.org/10.1007/BF00223955
Bradley, J. R. (2008). TNF-mediated inflammatory disease. *Journal of Pathology*, 214 (2), 149–160.
Bremner, J. D., Shearer, K. D., & McCaffery, P. J. (2012). Retinoic acid and affective disorders: the evidence for an association. The Journal of clinical psychiatry, 73(1), 37–50. https://doi.org/10.4088/JCP.10r05993.
Buetler, B. (2000). Tlr4: Central component of the sole mammalian LPS sensor. *Current Opinion in Immunology*, 12, 20-26.
Buttenschoen, K., Radermacher, P., & Bracht, H. (2010). Endotoxin elimination in sepsis: physiology and therapeutic application. *Langenbeck's Archives of Surgery*, 395, 597-605.
Cai, L., Li, R., & Zhou, J. N. (2015). Chronic all-trans retinoic acid administration induces CRF over-expression accompanied by AVP up-regulation and multiple CRF-controlling receptors disturbance in the hypothalamus of rats. Brain research, 1601, 1–7. https://doi.org/10.1016/j.brainres.2014.12.054
Campbell, S., & MacQueen, G. (2006). An update on regional brain volume differences associated with mood disorders. *Current Opinion in Psychiatry*, 19, 25–33.
Campbell, S., Marriott, M., Nahmias, C., & MacQueen, G. M. (2004). Lower hippocampal volume in patients suffering from depression: A meta-analysis. *American Journal of Psychiatry*, 161(4), 598–607.
Can, A., Blackwell, R. A., Piantadosi, S. C., Dao, D. T., O'Donnell, K. C., and Gould, T. D. (2011a). Antidepressant-like responses to lithium in genetically diverse mouse strains. Genes Brain Behav. 10, 434–443. doi: 10.1111/j.1601-183X.2011.00682.x
Can, A., Dao, D. T., Terrillion, C. E., Piantadosi, S. C., Bhat, S., & Gould, T. D. (2011). The Tail Suspension Test. Journal of Visualized Experiments, 58. https://doi.org/10.3791/3769
Capuron, L., Ravaud, A., Neveu, P. J., Miller, A. H., Maes, M., & Dantzer, R. (2002). Association between decreased serum tryptophan concentrations and depressive symptoms in cancer patients undergoing cytokine therapy. *Molecular Psychiatry*, 7(5), 468–473. https://doi.org/10.1038/sj.mp.4000995
Carmona, M. A., Murai, K. K., Wang, L., Roberts, A. J., & Pasquale, E. B. (2009). Glial ephrin-A3 regulates hippocampal dendritic spine morphology and glutamate transport. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106, 12524-12529.
Cattaneo, A., Gennarelli, M., Uher, R., Breen, G., Farmer, A., Aitchison, K. J., ... Pariante, C. M. (2013). Candidate genes expression profile associated with antidepressants response in the GENDEP study: Differentiating between baseline 'Predictors' and longitudinal 'Targets.' *Neuropsychopharmacology*, 38(3), 377–385. https://doi.org/10.1038/npp.2012.191

Chambon, P. (1996). A decade of molecular biology of retinoic acid receptors. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*,10(9), 940–954.

Chang, J., Xie, M., Shah ,V. R., Schneider, M. D., Entman, M. L., Wei, L., & Schwartz, R. J. (2006). Activation of Rho-associated coiled-coil protein kinase 1 (ROCK-1) by caspase-3 cleavage plays an essential role in cardiac myocyte apoptosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 10, 14495–14500. doi: 10.1073/pnas.0601911103.

Chauhan, P., Jethwa, K., Rathawa, A., Chauhan, G., & Mehra, S. (2021). The Anatomy of the Hippocampus. In Cerebral Ischemia (pp. 17–30). Exon Publications. https://doi.org/10.36255/exonpublications.cerebralischemia.2021.hippocampus

Chen, G. Y., & Nuñez, G. (2010). Sterile inflammation: sensing and reacting to damage. *Nature Reviews Immunology*, 10(12), 826–837. https://doi.org/10.1038/nri2873

Chen, L., Lau, A. G., & Sarti, F. (2014). Synaptic retinoic acid signaling and homeostatic synaptic plasticity. Neuropharmacology, 78, 3–12. https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2012.12.004.

Chen, X. N., Meng, Q. Y., Bao, A. M., Swaab, D. F., Wang, G. H., & Zhou, J. N. (2009). The involvement of retinoic acid receptor-alpha in corticotropin-releasing hormone gene expression and affective disorders. Biological psychiatry, 66(9), 832–839. https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2009.05.03.

Chen, Y., Hua, Y., Li, X., Arslan, I .M., Zhang, W., & Meng, G. (2020). Distinct types of cell death and the implication in diabetic cardiomyopathy. *Frontiers in Pharmacology*, 11, 42. doi: 10.3389/fphar.2020.00042

Chia CW, Lane W, J. Chibnall, A. Allen, E. Siegfried (2005). Isotretinoin therapy and mood changes in adolescents with moderate to severe acne: a cohort study. Arch. Dermatol., 141 (2005), pp. 557-560.

Choleris, E., Thomas, A. W., Kavaliers, M., and Prato, F. S. (2001). A detailed ethological analysis of the mouse open field test: Effects of diazepam, chlordiazepoxide and an extremely low frequency pulsed magnetic field. Neurosci. Biobehav. Rev. 25, 235–260. doi: 10.1016/s0149-7634(01)00011-2

Chovatiya, R., & Medzhitov, R. (2014). Stress, inflammation, and defense of homeostasis. *Molecular Cell*, 54(2), 281–288. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.03.030

Claiborne, B. J., Amaral, D. G., & Cowan, W. M. (1986). A light and electron microscopic analysis of the mossy fibers of the rat dentate gyrus. *Journal of Comparative Neurology*, 246, 435–458.

Claiborne, B. J., Amaral, D. G., & Cowan, W. M. (1990). A quantitative three-dimensional analysis of granule cell dendrites in the rat dentate gyrus. *Journal of Comparative Neurology*, 302, 206–219.

Cohen, S., Janicki-Deverts, D., Doyle, W. J., Miller, G. E., Frank, E., Rabin, B. S., & Turner, R. B. (2012). Chronic stress, glucocorticoid receptor resistance, inflammation, and disease risk. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(16), 5995–5999. https://doi.org/10.1073/pnas.1118355109

Collins, M. D., & Mao, G. E. (1999). Teratology of retinoids. Annual review of pharmacology and toxicology, 39, 399–430. https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.39.1.399.

Colton, C. A. (2009). Heterogeneity of microglial activation in the innate immune response in the brain. *Journal of Neuroimmune Pharmacology*, 4(4), 399–418. https://doi.org/10.1007/s11481- 009-9164-4.

Colton, C. A., & Wilcock, D. M. (2010). Assessing activation states in microglia. *CNS&Neurological Disorders-Drug Targets*, 9(2), 174-191. doi: 10.2174/187152710791012053.

Colucci-D'Amato, L., Speranza, L., & Volpicelli, F. (2020). Neurotrophic factor BDNF, physiological functions and therapeutic potential in depression, neurodegeneration and brain cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 21, 7777.

Congdon K.L., Sanchez-Perez, L.A., & Sampson, J.H. (2019). Effective effectors: How T cells access and infiltrate the central nervous system. *Pharmacology & Therapeutics*, 197, 52–60.

Connolly, R. M., Nguyen, N. K., & Sukumar, S. (2013). Molecular pathways: current role and future directions of the retinoic acid pathway in cancer prevention and treatment. *Clinical Cancer Research*, 19(7), 1651–1659.

Contractor, A., Rogers, C., Maron, C., Henkemeyer, M., Swanson, G.T., & Heinemann, S.F. (2002). Trans-synaptic Eph receptor-Ephrin signaling in hippocampal mossy fiber LTP. *Science*, 296, 1864-1869.

Contractor, A., Rogers, C., Maron, C., Henkemeyer, M., Swanson, G. T., & Heinemann, S. F. (2002). Trans-synaptic Eph receptor-ephrin signaling in hippocampal mossy fiber LTP. Science, 296(5574), 1864–1869. https://doi.org/10.1126/science.1069081

Corona, A. W., Norden, D. M., Skendelas, J. P., Huang, Y., O'Connor, J. C., Lawson, M., ... Godbout, J. P. (2013). Indoleamine 2,3-dioxygenase inhibition attenuates lipopolysaccharide induced persistent microglial activation and depressive-like complications in fractalkine receptor (CX3CR1)-deficient mice. *Brain, Behavior, and Immunity*, 31, 134–142. https://doi.org/10.1016/j.bbi.2012.08.008

Couch, Y., Trofimov, A., Markova, N., Nikolenko, V., Steinbusch, H. W., Chekhonin, V., ... Strekalova, T. (2016). Low-dose lipopolysaccharide (LPS) inhibits aggressive and augments depressive behaviours in a chronic mild stress model in mice. *Journal of Neuroinflammation*, 13(1), 108. https://doi.org/10.1186/s12974-016-0572-0.

Coulthard MG, Morgan M, Woodruff TM, Arumugam TV, Taylor SM, Carpenter TC, Lackmann M, Boyd AW (2012) Eph/Ephrin signaling in injury and inflammation. Am J Pathol 181(5):1493–1503. https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2012.06.043.

Cowan CA, Henkemeyer M. (2001) The SH2/SH3 adaptor Grb4 transduces B-ephrin reverse signals. Nature. Sep 13;413(6852):174-9. doi: 10.1038/35093123. PMID: 11557983.

Cramer, K. S., & Miko, I. J. (2016). Eph-ephrin signaling in nervous system development. *F1000Research*, 5, 413. https://doi.org/10.12688/f1000research.7417.1

Cramer, S. C., Sur, M., Dobkin, B. H., O'Brien, C., Sanger, T. D., Trojanowski, J. Q., ... Vinogradov, S. (2011). Harnessing neuroplasticity for clinical applications. *Brain*, 134(6), 1591–1609. https://doi.org/10.1093/brain/awr039

Crandall, J., Sakai, Y., Zhang, J., Koul, O., Mineur, Y., Crusio, W. E., & McCaffery, P. (2004). 13-cis-retinoic acid suppresses hippocampal cell division and

hippocampal-dependent learning in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101, 5111–5116.

Cryan JF, Mombereau C, Vassout A. The tail suspension test as a model for assessing antidepressant activity: review of pharmacological and genetic studies in mice. Neurosci Biobehav Rev. 2005;29(4-5):571-625. doi: 10.1016/j.neubiorev.2005.03.009. PMID: 15890404.

Cserr, H. F., Harling-Berg, C. J., & Knopf, P. M. (1992). Drainage of brain extracellular fluid into blood and deep cervical lymph and its immunological significance. *Brain Pathology (Zurich, Switzerland)*, 2, 269–276.

Csordas, A., Mazlo, M., & Gallyas, F. (2003). Recovery versus death of "dark" (compacted) neurons in non-impaired parenchymal environment: light and electron microscopic observations. *Acta Neuropathologica*, 106(1), 37-49.

Cuccurullo, A., Greco, E., Lupia, E., de Giuli, P., Bosco, O., Martin-Conte, E., Spatola, T., Turco, E., & Montrucchio, G. (2016). Blockade of Thrombopoietin Reduces Organ Damage in Experimental Endotoxemia and Polymicrobial Sepsis. PLOS ONE, 11(3), e0151088. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0151088

D'Sa, C., & Duman, R. S. (2002). Antidepressants and neuroplasticity. Bipolar disorders, 4(3), 183–194. https://doi.org/10.1034/j.1399-5618.2002.01203.x

Dalva, M. B., Takasu, M. A., Lin, M. Z., Shamah, S. M., Hu, L., Gale, N. W., & Greenberg, M.E. (2000). EphB receptors interact with NMDA receptors and regulate excitatory synapse formation. *Cell*, 103, 945-956.

Dalva, M. B., Takasu, M. A., Lin, M. Z., Shamah, S. M., Hu, L., Gale, N. W., & Greenberg, M. E. (2000). EphB receptors interact with NMDA receptors and regulate excitatory synapse formation. Cell, 103(6), 945–956. https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)00197-5

Dantzer, R. (2001). Cytokine-Induced Sickness Behavior: Where Do We Stand? *Brain, Behavior, and Immunity*, 15(1), 7–24. https://doi.org/10.1006/brbi.2000.0613

Dantzer, R. (2004). Cytokine-induced sickness behaviour: a neuroimmune response to activation of innate immunity. *European Journal of Pharmacology,* 500, 399-411

Dantzer, R., O'Connor, J. C., Freund, G. G., Johnson, R. W., & Kelley, K. W. (2008). From inflammation to sickness and depression: when the immune system subjugates the brain. *Nature Reviews Neuroscience*, 9, 46-56. https://doi.org/10.1038/nrn2297

Däubener, W., Remscheid, C., Nockemann, S., Pilz, K., Seghrouchni, S., Mackenzie, C., & Hadding, U. (1996). Anti-parasitic effector mechanisms in human brain tumor cells: role of interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha. *European journal of immunology*, 26(2), 487–492. https://doi.org/10.1002/eji.1830260231

Davy A, Gale NW, Murray EW, Klinghoffer RA, Soriano P, Feuerstein C, Robbins SM. (1999) Compartmentalized signaling by GPI-anchored ephrin-A5 requires the Fyn tyrosine kinase to regulate cellular adhesion. Genes Dev 13:3125–3135

Davy A, Soriano P (2005) Ephrin signaling in vivo: look both ways. Dev Dyn 232:1–10.

de Bock, F., Derijard, B., Dornand, J., Bockaert, J., & Rondouin, G. (1998). The neuronal death induced by endotoxic shock but not that induced by excitatory amino acids requires TNF-α. European Journal of Neuroscience, 10(10), 3107–3114. https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.1998.00317.x

de Oliveira, M. R., Silvestrin, R. B., Mello E Souza, T., & Moreira, J. C. (2007). Oxidative stress in the hippocampus, anxiety-like behavior and decreased locomotory and exploratory activity of adult rats: effects of sub acute vitamin A supplementation at therapeutic doses. Neurotoxicology, 28(6), 1191–1199. https://doi.org/10.1016/j.neuro.2007.07.008

Denans, N., Iimura, T., Pourquie, O., 2015. Hox genes control vertebrate body elongation by collinear WNT repression. eLife 4, e04379.

Derecki, N. C., Cardani, A. N., Yang, C. H., Quinnies, K. M., Crihfield, A., Lynch, K. R., & Kipnis, J. (2010). Regulation of learning and memory by meningeal immunity: a key role for IL-4. The Journal of experimental medicine, 207(5), 1067–1080. https://doi.org/10.1084/jem.20091419.

Desmond, N. L., & Levy, W. B. (1985). Granule cell dendritic spine density in the rat hippocampus varies with spine shape and location. *Neuroscience Letters*, 54, 219–224.

Dheen, S. T., Jun, Y., Yan, Z., Tay, S. S. W., & Ling, E. A. (2005). Retinoic acid inhibits expression of TNF-a and iNOS in activated rat microglia. *Glia*, 50, 21–31. https://doi.org/10.1002/glia.20153

Di Filippo, M., Sarchielli, P., Picconi, B., and Calabresi, P. (2008). Neuroinflammation and synaptic plasticity: theoretical basis for a novel, immune-centred, therapeutic approach to neurological disorders. Trends Pharmacol Sci 29, 402-412.

Dickens, C., McGowan, L., Clark-Carter, D., & Creed, F. (2002). Depression in rheumatoid arthritis: a systematic review of the literature with meta-analysis. *Psychosomatic Medicine*, 64, 52–60.

Diegelmann, R. F., & Evans, M. C. (2004). Wound healing: an overview of acute, fibrotic and delayed healing. Frontiers in bioscience : a journal and virtual library, 9, 283–289. https://doi.org/10.2741/1184.

Diniz, B. S., Teixeira, A. L., Talib, L., Gattaz, W. F., & Forlenza, O. V. (2010). Interleukin-1β serum levels is increased in antidepressant-free elderly depressed patients. *The American Journal of Geriatric Psychiatry*, 18(2), 172–176. https://doi.org/10.1097/JGP.0b013e3181c2947f

Dionisio-Santos, D. A., Olschowka, J. A., & O'Banion, M. K. (2019). Exploiting microglial and peripheral immune cell crosstalk to treat Alzheimer's disease. *Journal of Neuroinflammation*, 16(1), 74.

DiSabato, D. J., Quan, N., & Godbout, J. P. (2016). Neuroinflammation: the devil is in the details. Journal of Neurochemistry, 139 Suppl 2(Suppl 2), 136–153. https://doi.org/10.1111/jnc.13607

Dobbs-McAuliffe, B., Zhao, Q., & Linney, E. (2004). Feedback mechanisms regulate retinoic acid production and degradation in the zebrafish embryo. Mechanisms of Development, 121(4), 339–350. https://doi.org/10.1016/j.mod.2004.02.008

Domenjoz, R., & Theobald, W. (1959). On the pharmacology of tofranil (N-(3-dimethylaminopropyl)-iminodibenzyl hydrochloride. *Archives Internationales de Pharmacodynamie et de Therapie*, 120, 450–489.

Dowlati, Y., Herrmann, N., Swardfager, W., Liu, H., Sham, L., Reim, E. K., & Lanctôt, K. L. (2010). A meta-analysis of cytokines in major depression. *Biological Psychiatry*, 67(5), 446–457. https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2009.09.033

Drayton, D. L., Liao, S., Mounzer, R. H. & Ruddle, N. H. (2006). Lymphoid organ development: from ontogeny to neogenesis. *Nature Immunology*, 7, 344–353 https://doi.org/10.1038/ni1330

Drevets, W., Videen, T., Price, J., Preskorn, S., Carmichael, S., & Raichle, M. (1992). A functional anatomical study of unipolar depression. *The Journal of Neuroscience*, 12(9), 3628–3641. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.12-09-03628.1992

Duester G. (2008). Retinoic acid synthesis and signaling during early organogenesis. Cell, 134(6), 921–931. https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.09.002

Duman, C. H., & Duman, R. S. (2015). Spine synapse remodeling in the pathophysiology and treatment of depression. Neuroscience letters, 601, 20–29. https://doi.org/10.1016/j.neulet.2015.01.022

Duman, R. S., & Aghajanian, G. K. (2012). Synaptic Dysfunction in Depression: Potential Therapeutic Targets. Science, 338(6103), 68–72. https://doi.org/10.1126/science.1222939

Duman, R. S., & Monteggia, L. M. (2006). A neurotrophic model for stress-related mood disorders. *Biological Psychiatry*, 59(12), 1116–1127. https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2006.02.013.

Duman, R. S., Aghajanian, G. K., Sanacora, G., & Krystal, J. H. (2016). Synaptic plasticity and depression: new insights from stress and rapid-acting antidepressants. *Nature Medicine*, 22(3), 238–249. https://doi.org/10.1038/nm.4050

Dunn, A. J., Swiergiel, A. H., Zhang, H., & Quan, N. (2006). Reduced ingestion of sweetened milk induced by interleukin-1 and lipopolysaccharide is associated with induction of cyclooxygenase-2 in brain endothelia. Neuroimmunomodulation, 13(2), 96–104. https://doi.org/10.1159/000096291

Efficace, F., Platzbecker, U., Breccia, M., Cottone, F., Carluccio, P., Salutari, P., di Bona, E., Borlenghi, E., Autore, F., Levato, L., Finizio, O., Mancini, V., D'Ardia, S., Schlenk, R. F., Melillo, L., Fumagalli, M., Fiedler, W., Beltrami, G., Fracchiolla, N. S., … Vignetti, M. (2021). Long-term quality of life of patients with acute promyelocytic leukemia treated with arsenic trioxide vs chemotherapy. Blood Advances, 5(21), 4370–4379. https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2021004649.

Egea, J., & Klein, R. (2007). Bidirectional Eph-ephrin signaling during axon guidance. *Trends in Cell Biology*, 17(5), 230-238.

Engelhardt B., Vajkoczy, P., & Weller, R. O. (2017). The movers and shapers in immune privilege of the CNS. *Nature Immunology*, 18, 123–131.

Enoki, R., Hu, Y. L., Hamilton, D., & Fine, A. (2009). Expression of long-term plasticity at individual synapses in hippocampus is graded, bidirectional, and mainly presynaptic: optical quantal analysis. Neuron, 62(2), 242–253. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2009.02.026

Ernfors, P., Kucera, J., Lee, K., Loring, J., & Jaensch, R. (1995). Studies on the physiological role of brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 in knockout mice. *International Journal of Developmental Biology*, 39, 799-807.

Ernfors, P., Lee, K.-F., & Jaenisch, R. (1994). Mice lacking brain-derived neurotrophic factor develop with sensory deficits. *Nature*, 368, 147–150.

Erridge, C., Bennett-Guerrero, E., & Poxton, I. R. (2002). Structure and function of lipopolysaccharides. *Microbes and Infection*, 4(8), 837–851. https://doi.org/10.1016/S1286-4579(02)01604-0

Essmann, C. L., Martinez, E., Geiger, J. C., Zimmer, M., Traut, M. H., Stein, V., ...Acker-Palmer, A. (2008). Serine phosphorylation of EphrinB2 regulates trafficking of synaptic AMPA receptors. *Nature Neuroscience*, 11, 1035-1043.

Fagotto, F., Winklbauer, R., & Rohani, N. (2014). Ephrin-Eph signaling in embryonic tissue separation. Cell adhesion & migration, 8(4), 308–326. https://doi.org/10.4161/19336918.2014.970028

Ferahbas A., Turan M.T., Esel E., S. Utas, C. Kutlugun, C.G. Kilic (2004).A pilot study evaluating anxiety and depressive scores in acne patients treated with isotretinoin.J. Dermatolog. Treat., 15,pp. 153-157.

Ferguson, S. A., Cisneros, F. J., Gough, B., Hanig, J. P., & Berry, K. J. (2005). Chronic oral treatment with 13-cis-retinoic acid (isotretinoin) or all-trans-retinoic acid does not alter depression-like behaviors in rats. Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology, 87(2), 451–459. https://doi.org/10.1093/toxsci/kfi262.

Ferguson, S. A., Cisneros, F. J., Hanig, J. P., & Berry, K. J. (2007). Oral treatment with ACCUTANE does not increase measures of anhedonia or depression in rats. Neurotoxicology and teratology, 29(6), 642–651. https://doi.org/10.1016/j.ntt.2007.09.003

Fernandes-Silva, H., Araújo-Silva, H., Correia-Pinto, J., & Moura, R. S. (2020). Retinoic acid: A key regulator of lung development. *Biomolecules*, 10(1), 152. https://doi.org/10.3390/biom10010152

Ferraro, G., Montalbano, M. E., Sardo, P., & La Grutta, V. (1996). Lateral habenular influence on dorsal raphe neurons. *Brain Research Bulletin*, 41, 47-52.

Ferrucci, L., & Fabbri, E. (2018). Inflammageing: chronic inflammation in ageing, cardiovascular disease, and frailty. *Nature Reviews Cardiology*, 15(9), 505–522. https://doi.org/10.1038/s41569-018-0064-2

Feyissa DD, Aher YD, Engidawork E, Höger H, Lubec G, Korz V. Individual Differences in Male Rats in a Behavioral Test Battery: A Multivariate Statistical Approach. Front Behav Neurosci. 2017 Feb 17;11:26. doi: 10.3389/fnbeh.2017.00026. PMID: 28261069; PMCID: PMC5314104.

Filosa, A., Paixão, S., Honsek, S. D., Carmona, M. A., Becker, L., Feddersen, B., Gaitanos, L., Rudhard, Y., Schoepfer, R., Klopstock, T., Kullander, K., Rose, C. R., Pasquale, E. B., & Klein, R. (2009). Neuron-glia communication via EphA4/ephrin-A3 modulates LTP through glial glutamate transport. Nature neuroscience, 12(10), 1285–1292. https://doi.org/10.1038/nn.2394

Fleming, D. M., Smith, G. E., Charlton, J. R., Charlton, J. & Nicoll, A. (2002). Impact of infections on primary care--greater than expected. *Communicable Disease and Public Health*, 5(1), 7-12.

Foltran, R. B., & Diaz, S. L. (2016). BDNF isoforms: a round trip ticket between neurogenesis and serotonin? *Journal of Neurochemistry*, 138(2), 204–221. https://doi.org/10.1111/jnc.13658

Forte, A., Baldessarini, R. J., Tondo, L., Vázquez, G. H., Pompili, M., & Girardi, P. (2015). Long-term morbidity in bipolar-I, bipolar-II, and unipolar major depressive disorders. Journal of affective disorders, 178, 71–78. https://doi.org/10.1016/j.jad.2015.02.011

Fragoso, Y. D., Shearer, K. D., Sementilli, A., de Carvalho, L. V., & McCaffery, P. J. (2012). High expression of retinoic acid receptors and synthetic enzymes in the human hippocampus. Brain structure & function, 217(2), 473–483. https://doi.org/10.1007/s00429-011-0359-0.

Franceschi, F., Zuccalà, G., Roccarina, D., & Gasbarrini, A. (2014). Clinical effects of Helicobacter pylori outside the stomach. *Nature Reviews Gastroenterology&Hepatology*, 11, 234–242. 10.1038/nrgastro.2013.243

Frohlich, F. (2016). Microcircuits of the hippocampus. *Network Neuroscience* içinde (s. 85–95). Elsevier. https://doi.org/10.1016/C2013-0-23281-5.

Frugier, T., Conquest, A., McLean, C., Currie, P., Moses, D., & Goldshmit, Y. (2012). Expression and activation of EphA4 in the human brain after traumatic injury. Journal of neuropathology and experimental neurology, 71(3), 242–250. https://doi.org/10.1097/NEN.0b013e3182496149

Fu WY, Chen Y, Sahin M, Zhao XS, Shi L, Bikoff JB, Lai KO, Yung WH, Fu AK, Greenberg ME (2007), Ip NY. Cdk5 regulates EphA4-mediated dendritic spine retraction through an ephexin1-dependent mechanism. Nat Neurosci. Jan;10(1):67-76. doi: 10.1038/nn1811. Epub Dec 3. PMID: 17143272.

Fu, A. K., Hung, K. W., Huang, H., Gu, S., Shen, Y., Cheng, E. Y., Ip, F. C., Huang, X., Fu, W. Y., & Ip, N. Y. (2014). Blockade of EphA4 signaling ameliorates hippocampal synaptic dysfunctions in mouse models of Alzheimer's disease. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 111(27), 9959–9964. https://doi.org/10.1073/pnas.1405803111

Fu, W. Y., Chen, Y., Sahin, M., Zhao, X. S., Shi, L., Bikoff, J. B., Lai, K. O., Yung, W. H., Fu, A. K., Greenberg, M. E., & Ip, N. Y. (2007). Cdk5 regulates EphA4-mediated dendritic spine retraction through an ephexin1-dependent mechanism. Nature neuroscience, 10(1), 67–76. https://doi.org/10.1038/nn1811

Fuchs, E., & Flïugge, G. (2006). Experimental animal models for the simulation of depression and anxiety. Dialogues in clinical neuroscience, 8(3), 323–333. https://doi.org/10.31887/DCNS.2006.8.3/efuchs

Furman, D., Campisi, J., Verdin, E., Carrera-Bastos, P., Targ, S., Franceschi, C., ...Slavich, G. M. (2019). Chronic inflammation in the etiology of disease across the life span. *Nature Medicine*, *25*(12), 1822–1832. https://doi.org/10.1038/s41591-019-0675-0

Gabay, C., & Kushner, I. (1999). Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation. *New England Journal of Medicine*, 340(6), 448–454. https://doi.org/10.1056/NEJM199902113400607

Gale, N. W., & Yancopoulos, G. D. (1999). Growth factors acting via endothelial cellspecific receptor tyrosine kinases: VEGFs, angiopoietins, and ephrins in vascular development. *Genes & Development*, 13, 1055-1066.

Gale, N. W., Holland, S. J., Valenzuela, D. M., Flenniken, A., Pan, L., Ryan, T. E., ... Davis, S. (1996). Eph receptors and ligands comprise two major specificity subclasses and are reciprocally compartmentalized during embryogenesis. *Neuron*, 17(1), 9-19.

Gallyas, F., Hsu, M., & Buzsaki, G. (1993). Four modified silver methods for thick sections of formaldehyde-fixed mammalian central nervous tissue: ‘dark’ neurons, perikarya of all neurons, microglial cells and capillaries. *Journal of Neuroscience Methods*, 50(2), 159-164.

Gao, H., Yang, T., Chen, X., & Song, Y. (2021). Changes of Lipopolysaccharide-Induced Acute Kidney and Liver Injuries in Rats Based on Metabolomics Analysis. Journal of Inflammation Research, Volume 14, 1807–1825. https://doi.org/10.2147/JIR.S306789

Gao, R., & Penzes, P. (2015). Common mechanisms of excitatory and inhibitory imbalance in schizophrenia and autism spectrum disorders. *Current Molecular Medicine*, 15(2), 146–167. https://doi.org/10.2174/1566524015666150303003028

Gauthier, L.R. & Robbins, S.M. (2003). Ephrin signaling: One raft to rule them all? One raft to sort them? One raft to spread their call and in signaling bind them? *Life Sciences.* **74,** 207-216.

Gerety, S. S. & Anderson, D. J. (2002). Cardiovascular ephrinB2 function is essential for embryonic angiogenesis. *Development*, 129, 1397–1410.

Gerety, S. S., Wang, H. U., Chen, Z. F. & Anderson, D. J. (1999). Symmetrical mutant phenotypes of the receptor EphB4 and its specific transmembrane ligand ephrin-B2 in cardiovascular development. *Molecular Cell*, 4, 403–414.

Ghosh, S. S., Wang, J., Yannie, P. J., & Ghosh, S. (2020). Intestinal barrier dysfunction, LPS translocation, and disease development. *Journal of the Endocrine Society*, 4(2), bvz039.

Giacobbo, B. L., Doorduin, J., Klein, H. C., Dierckx, R. A., Bromberg, E., & de Vries, E. F. (2019). Brain-derived neurotrophic factor in brain disorders: focus on neuroinflammation. *Molecular Neurobiology*, 56(5), 3295–3312.

Ginhoux, F., & Prinz, M. (2015). Origin of microglia: current concepts and past controversies. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 7(8), a020537.

Giovannoni, F., & Quintana, F. J. (2020). The Role of Astrocytes in CNS Inflammation. Trends in immunology, 41(9), 805–819. https://doi.org/10.1016/j.it.2020.07.007.

Goehler, L., Gaykema, R., & Nguyen, K. (1999). Interleukin-1beta in immune cells of the abdominal vagus nerve: A link between the immune and nervous systems? *Journal of Neuroscience*, 19, 2799–2806.

Goldshmit, Y., & Bourne, J. (2010). Upregulation of EphA4 on astrocytes potentially mediates astrocytic gliosis after cortical lesion in the marmoset monkey. Journal of neurotrauma, 27(7), 1321–1332. https://doi.org/10.1089/neu.2010.1294

Goldshmit, Y., Galea, M. P., Wise, G., Bartlett, P. F. & Turnley, A. M. (2004). Axonal regeneration and lack of astrocytic gliosis in EphA4-deficient mice. *Journal of Neuroscience*, 24, 10064–10073.

Goldsmith, D. R., Rapaport, M. H., & Miller, B. J. (2016). A meta-analysis of blood cytokine network alterations in psychiatric patients: comparisons between schizophrenia, bipolar disorder and depression. *Molecular Psychiatry*, 21(12), 1696–1709. https://doi.org/10.1038/mp.2016.3

Gomes-Leal, W. (2019). Why microglia kill neurons after neural disorders? The friendly fire hypothesis. *Neural Regeneration Research*,14(9), 1499-1502. doi: 10.4103/1673-5374.255359.

Goodman AB, Pardee AB. (2003) Evidence for defective retinoid transport and function in late onset Alzheimer's disease. Proc Natl Acad Sci U S A. 2003 Mar 4;100(5):2901-5. doi: 10.1073/pnas.0437937100. Epub Feb 25. PMID: 12604774; PMCID: PMC151438.

Goodman AB. (2006). Retinoid receptors, transporters, and metabolizers as therapeutic targets in late onset Alzheimer disease. J Cell Physiol. Dec;209(3):598-603. doi: 10.1002/jcp.20784. PMID: 17001693.

Grasl-Kraupp, B., Ruttkay-Nedecky, B., Koudelka, H., Bukowska, K., Bursch, W., & Schulte-Hermann, R. (1995). In situ detection of fragmented DNA (TUNEL assay) fails to discriminate among apoptosis, necrosis, and autolytic cell death: a cautionary note. Hepatology (Baltimore, Md.), 21(5), 1465–1468. https://doi.org/10.1002/hep.1840210534

Groth, R. D., & Tsien, R. W. (2008). A role for retinoic acid in homeostatic plasticity. Neuron, 60(2), 192–194. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2008.10.003

Grunwald, I. C., Korte, M., Wolfer, D., Wilkinson, G. A., Unsicker, K., Lipp, H. P., Bonhoeffer, T., & Klein, R. (2001). Kinase-independent requirement of EphB2 receptors in hippocampal synaptic plasticity. Neuron, 32(6), 1027–1040. https://doi.org/10.1016/s0896-6273(01)00550-5

Grunwald, I.C., Korte, M., Wolfer, D., Wilkinson, G.A., Unsicker, K., Lipp, H.P., ... Klein, R. (2001). Kinase-independent requirement of EphB2 receptors in hippocampal synaptic plasticity. *Neuron*, 32, 1027-1040.

Gudas L. J. (2013). Retinoids induce stem cell differentiation via epigenetic changes. Seminars in cell & developmental biology, 24(10-12), 701–705. https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2013.08.002

Gudas, L. J. (1994). Retinoids and vertebrate development. *The Journal of Biological Chemistry*, 269(22),15399–15402.

Haber, S., & Mcfarland, N. R. (2001). The place of the talamus in frontal cortical-basal ganglia circuits. *The Neuroscientist,* 7(4), 315–324. https://doi.org/10.1177/107385840100700408

Hafner, C., Meyer, S., Hagen, I., Becker, B., Roesch, A., Landthaler, M., & Vogt, T. (2005). Ephrin-B reverse signaling induces expression of wound healing associated genes in IEC-6 intestinal epithelial cells. World journal of gastroenterology, 11(29), 4511–4518. https://doi.org/10.3748/wjg.v11.i29.4511.

Hamad H, Mangla A. Lymphocytosis. [Updated 2023 Jul 17]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024 Jan-. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK549819/

Han J, Lee JD, Bibbs L, Ulevitch RJ. A (1994). MAP kinase targeted by endotoxin and hyperosmolarity in mammalian cells. Science. Aug 5;265(5173):808-11. doi: 10.1126/science.7914033. PMID: 7914033.

Hånell, A., Clausen, F., Djupsjö, A., Vallstedt, A., Patra, K., Israelsson, C., Larhammar, M., Björk, M., Paixão, S., Kullander, K., & Marklund, N. (2012). Functional and histological outcome after focal traumatic brain injury is not improved in conditional EphA4 knockout mice. Journal of neurotrauma, 29(17), 2660–2671. https://doi.org/10.1089/neu.2012.2376

Hanson, N., & Leachman, S. (2001). Safety issues in isotretinoin therapy. Seminars in Cutaneous Medicine and Surgery, 20(3), 166–183. https://doi.org/10.1053/sder.2001.28209.

Harris, K. M., & Kater, S. B. (1994). Dendritic spines: cellular specializations imparting both stability and flexibility to synaptic function. *Annual Review of Neuroscience*, 17, 341-371.

Harrison, E. H. (2012). Mechanisms involved in the intestinal absorption of dietary vitamin A and provitamin A carotenoids. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1821,70–77.

Hart, B. L. (1990). Behavioral adaptations to pathogens and parasites: five strategies. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 14, 273-294.

Hebb DO. 1949. The organization of behavior. Wiley, New York.

Hellmann-Regen, J., Kronenberg, G., Uhlemann, R., Freyer, D., Endres, M., & Gertz, K. (2013). Accelerated degradation of retinoic acid by activated microglia. *Journal of Neuroimmunology*, 256(1–2), 1–6. https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2012.11.005

Heming, N., Mazeraud, A., Verdonk, F., Bozza, F. A., Chrétien, F., & Sharshar, T. (2017). Neuroanatomy of sepsis-associated encephalopathy. *Critical Care*, 21(1), 65. https://doi.org/10.1186/s13054-017-1643-z

Henderson, J. T., Georgiou, J., Jia, Z., Robertson, J., Elowe, S., Roder, J. C., & Pawson, T. (2001). The receptor tyrosine kinase EphB2 regulates NMDA-dependent synaptic function. *Neuron*, 32, 1041-1056.

Henderson, J. T., Georgiou, J., Jia, Z., Robertson, J., Elowe, S., Roder, J. C., & Pawson, T. (2001). The receptor tyrosine kinase EphB2 regulates NMDA-dependent synaptic function. Neuron, 32(6), 1041–1056. https://doi.org/10.1016/s0896-6273(01)00553-0

Henkemeyer, M., Itkis, O. S., Ngo, M., Hickmott, P. W., & Ethell, I. M. (2003). Multiple EphB receptor tyrosine kinases shape dendritic spines in the hippocampus. *Journal of Cell Biology*, 163, 1313-1326.

Henry, C. J., Huang, Y., Wynne, A. M., & Godbout, J. P. (2009). Peripheral lipopolysaccharide (LPS) challenge promotes microglial hyperactivity in aged mice that is associated with exaggerated induction of both pro-inflammatory IL-1β and anti-inflammatory IL-10 cytokines. *Brain, Behavior, and Immunity*, 23(3), 309–317. https://doi.org/10.1016/j.bbi.2008.09.002

Herkenham, M., & Nauta ,W. J. (1979).Efferent connections of the habenular nuclei in the rat. *The Journal of Comparative Neurology*, 187,19-47.

Heyman, R. A., Mangelsdorf, D. J., Dyck, J. A., Stein, R. B., Eichele, Evans, G., R. M., & Thaller, C. (1992). 9-cis retinoic acid is a high affinity ligand for the retinoid X receptor. *Cell*, 68(2), 397–406.

Higuchi H and Nagahata H (2000), "Effects of vitamins A and E on superoxide production and intracellular signaling of neutrophils in Holstein calves", Vitamins and Hormones, Vol. 64, pp. 69-75.

Himanen, J. P., Chumley, M. J., Lackmann, M., Li, C., Barton, W. A., Jeffrey, P. D., ... Nikolov, D. B. (2004). Repelling class discrimination: ephrin-A5 binds to and activates EphB2 receptor signaling. *Nature Neuroscience*, 7, 501-509.

Hirai, H., Maru, Y., Hagiwara, K., Nishida, J., & Takaku, F. (1987). A novel putative tyrosine kinase receptor encoded by the Eph gene. *Science*, 238, 1717-1720.

Hladky, S. B., & Barrand, M. A. (2014). Mechanisms of fluid movement into, through and out of the brain: evaluation of the evidence. *Fluids and Barriers of the CNS*, 11(1), 26. https://doi.org/10.1186/2045-8118-11-26

Holland, S. J., Peles, E., Pawson, T., & Schlessinger, J. (1998). Cell-contact-dependent signalling in axon growth and guidance: Eph receptor tyrosine kinases and receptor protein tyrosine phosphatase beta. *Current Opinion in Neurobiology,* 8, 117-27.

Holmes, C. (2003). Systemic infection, interleukin 1beta, and cognitive decline in Alzheimer's disease. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, 74(6), 788–789. https://doi.org/10.1136/jnnp.74.6.788

Holtmaat, A., & Svoboda, K. (2009). Experience-dependent structural synaptic plasticity in the mammalian brain. *Nature Reviews Neuroscience*, 10(9), 647–658. https://doi.org/10.1038/nrn2699

Hop, H. T., Reyes, A. W., Huy, T. X., Arayan, L. T., Min, W., Lee, H. J., ... Kim, S. (2017). Activation of NF-kB-mediated TNF-induced antimicrobial immunity is required for the efficient brucella abortus clearance in RAW 264.7 cells. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 7, 437-437.

Hopkins, S. J. (2003). The pathophysiological role of cytokines. *Legal Medicine*, 5, S45–S57.

Hornef, M. W., Normark, B. H., Vandewalle, A., & Normark, S. (2003). Intracellular recognition of lipopolysaccharide by toll-like receptor 4 in intestinal epithelial cells. *Journal of Experimental* Medicine, 198, 1225-1235.

Hu, P., Wang, Y., Liu, J., Meng, F. T., Qi, X. R., Chen, L., van Dam, A. M., Joëls, M., Lucassen, P. J., & Zhou, J. N. (2016). Chronic retinoic acid treatment suppresses adult hippocampal neurogenesis, in close correlation with depressive-like behavior. Hippocampus, 26(7), 911–923. https://doi.org/10.1002/hipo.22574

Huang ME, Ye YC, Chen SR, Chai JR, Lu JX, Zhoa L, Gu LJ, Wang ZY. Use of all-trans retinoic acid in the treatment of acute promyelocytic leukemia. Blood. 1988 Aug;72(2):567-72. PMID: 3165295.

Huganir, R. L., & Nicoll, R. A. (2013). AMPARs and synaptic plasticity: the last 25 years. Neuron, 80(3), 704–717. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2013.10.025

Ihne, J. L., Fitzgerald, P. J., Hefner, K. R., and Holmes, A. (2012). Pharmacological modulation of stress-induced behavioral changes in the light/dark exploration test in male C57BL/6J mice. Neuropharmacology 62, 464–473. doi: 10.1016/j.neuropharm.2011.08.045

Ikami, K., Tokue, M., Sugimoto, R., Noda, C., Kobayashi, S., Hara, K., & Yoshida, S. (2015). Hierarchical differentiation competence in response to retinoic acid ensures stem cell maintenance during mouse spermatogenesis. Development, 142(9), 1582–1592. https://doi.org/10.1242/dev.118695

Insausti, R. & Amaral, D. G. (2004). Hippocampal Formation. In G. Paxinos, & J. K. Mai (Eds.), *The Human Nervous System*. 2nd Edition, (pp. 871-914). Elsevier. Academic Press. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-547626-3.X5000-5.

Ip, W. E., Hoshi, N., Shouval, D. S., Snapper, S., & Medzhitov, R. (2017). Anti-inflammatory effect of IL-10 mediated by metabolic reprogramming of macrophages. *Science*, 356(6337), 513-519.

Isaacson, R. L. (1974). *The Limbic System*. Springer New York, NY.

Ivanov, A. I., & Romanovsky, A. A. (2006). Putative dual role of ephrin-Eph receptor interactions in inflammation. IUBMB life, 58(7), 389–394. https://doi.org/10.1080/15216540600756004.

Iyer, S. S., & Cheng, G. (2012). Role of interleukin 10 transcriptional regulation in inflammation and autoimmune disease. *Critical Reviews in Immunology*, 32(1), 23-63.

Jacobs, S., Lie, D. C., DeCicco, K. L., Shi, Y., DeLuca, L. M., Gage, F. H., & Evans, R. M. (2006). Retinoic acid is required early during adult neurogenesis in the dentate gyrus. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United

States of America, 103(10), 3902–3907. https://doi.org/10.1073/pnas.0511294103
Jacobs, S., Lie, D. C., Decicco, K. L., Shi, Y., Deluca, L. M., Gage, F. H., & Evans, R. M. (2006). Retinoic acid is required early during adult neurogenesis in the dentate gyrus. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 103, 3902–3907.
Jana, S., Dines, M., Lalzar, M., & Lamprecht, R. (2023). Fear Conditioning Leads to Enduring Alterations in RNA Transcripts in Hippocampal Neuropil that are Dependent on EphB2 Forward Signaling. Molecular Neurobiology, 60(4), 2320–2329. https://doi.org/10.1007/s12035-022-03191-w
Janes, P. W., Nievergall, E., & Lackmann, M. (2012). Concepts and consequences of Eph receptor clustering. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 23(1), 43–50. https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2012.01.001.
Jeon, S. W., & Kim, Y. K. (2018). The role of neuroinflammation and neurovascular dysfunction in major depressive disorder. *Journal of Inflammation Research*, 11, 179–192. https://doi.org/10.2147/JIR.S141033
Jesberger, J. A., & Richardson, J. S. (1985). Animal models of depression: parallels and correlates to severe depression in humans. Biological psychiatry, 20(7), 764–784. https://doi.org/10.1016/0006-3223(85)90156-8.
Jing J, Nelson C, Paik J, Shirasaka Y, Amory JK, Isoherranen N. (2017) Physiologically Based Pharmacokinetic Model of All-trans-Retinoic Acid with Application to Cancer Populations and Drug Interactions. J Pharmacol Exp Ther. May;361(2):246-258. doi: 10.1124/jpet.117.240523. Epub 2017 Mar 8. PMID: 28275201; PMCID: PMC5399637.
Jones, K. A., & Thomsen, C. (2013). The role of the innate immune system in psychiatric disorders. *Molecular and Cellular Neurosciences*, 53, 52-62.
Jourdi, H., Hsu, Y.-T., Zhou, M., Qin, Q., Bi, X., & Baudry, M. (2009). Positive AMPA receptor modulation rapidly stimulates BDNF release and increases dendritic mRNA translation. *Journal of Neuroscience*, 29(27), 8688–8697. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.6078-08.2009
Jovanovic, H., Lundberg, J., Karlsson, P., Cerin, Å., Saijo, T., Varrone, A., ... Nordström, A.-L. (2008). Sex differences in the serotonin 1A receptor and serotonin transporter binding in the human brain measured by PET. *NeuroImage*, 39(3), 1408–1419. https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2007.10.016
Kagan, J. C., Su, T., Horng, T., Chow, A., Akira, S., & Medzhitov, R. (2008). TRAM couples endocytosis of toll-like receptor 4 to the induction of interferon-beta. *Nature Immunology,* 9, 361–368. doi: 10.1038/ni1569
Kalo, M., Pasquale, E. Signal transfer by Eph receptors. *Cell Tissue Res* **298**, 1–9 (1999). https://doi.org/10.1007/PL00008807
Kania, A., Klein, R. (2016). Mechanisms of ephrin-Eph signalling in development, physiology and disease. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 17(4), 240-256. doi: 10.1038/nrm.2015.16.
Kanthou, C., & Tozer, G. M. (2002). The tumor vascular targeting agent combretastatin A-4-phosphate induces reorganization of the actin cytoskeleton and early membrane blebbing in human endothelial cells. *Blood*, 99, 2060–2069. doi: 10.1182/blood.V99.6.2060.
Kao, H.-W., Chen, H.-C., Wu, C.-W., & Lin, W.-C. (2003). Tyrosine-kinase expression profiles in human gastric cancer cell lines and their modulations with

retinoic acids. British Journal of Cancer, 88(7), 1058–1064. https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6600821

Kao, T. J, & Kania, A. (2011). Ephrin-mediated cis-attenuation of Eph receptor signaling is essential for spinal motor axon guidance. *Neuron*, 71(1), 76–91.

Kasawara, K. T., Cotechini, T., Macdonald-Goodfellow, S. K., Surita, F. G., Pinto e Silva, J. L., Tayade, C., Othman, M., Ozolinš, T. R. S., & Graham, C. H. (2016). Moderate Exercise Attenuates Lipopolysaccharide-Induced Inflammation and Associated Maternal and Fetal Morbidities in Pregnant Rats. PLOS ONE, 11(4), e0154405. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0154405

Kaufman, J., DeLorenzo, C., Choudhury, S. & Parsey, R. V. (2016). The 5-HT1A receptor in major depressive disorder. *European Neuropsychopharmacology*, 26, 397– 410.

Kayser, M. S., McClelland, A. C., Hughes, E. G., & Dalva, M. B. (2006). Intracellular and Trans-Synaptic Regulation of Glutamatergic Synaptogenesis by EphB Receptors. The Journal of Neuroscience, 26(47), 12152–12164. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3072-06.2006

Kayser, M. S., Nolt, M. J., & Dalva, M. B. (2008). EphB Receptors Couple Dendritic Filopodia Motility to Synapse Formation. Neuron, 59(1), 56–69. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2008.05.007

Kell, D. B., & Pretorius, E. (2015). On the translocation of bacteria and their lipopolysaccharides between blood and peripheral locations in chronic, inflammatory diseases: the central roles of LPS and LPS-induced cell death. *Integrative*, 7(11), 1339–1377. https://doi.org/10.1039/c5ib00158g

Kelley, K. W., Bluthé, R.-M., Dantzer, R., Zhou, J.-H., Shen, W.-H., Johnson, R. W., & Broussard, S. R. (2003). Cytokine-induced sickness behavior. *Brain, Behavior, and Immunity*, 17(1), 112–118. https://doi.org/10.1016/S0889-1591(02)00077-6.

Kempermann, G., Jessberger, S., Steiner, B., & Kronenberg, G. (2004). Milestones of neuronal development in the adult hippocampus. *Trends in Neurosciences*, 27(8), 447-452. https://doi.org/10.1016/j.tins.2004.05.013.

Kennedy, R. H., & Silver, R. (2015). Neuroimmune signaling: Cytokines and the CNS. In D. W. Pfaff, N. D. Volkow, & J. Rubenstein (Eds.), *Neuroscience in the 21st Century* (pp. 1–41). Springer New York, NY. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-6434-1_174-1.

Keshavan, M. S., Mehta, U. M., Padmanabhan, J. L., & Shah, J. L. (2015). Dysplasticity, metaplasticity, and schizophrenia: Implications for risk, illness, and novel interventions. *Development and Psychopathology*, 27(2), 615–635. https://doi.org/10.1017/S095457941500019X

Khalil, S., Bardawil, T., Stephan, C., Darwiche, N., Abbas, O., Kibbi, A. G., ... Kurban, M. (2017). Retinoids: a journey from the molecular structures and mechanisms of action to clinical uses in dermatology and adverse effects. *Journal of Dermatological Treatment*, 28(8), 684–696. https://doi.org/10.1080/09546634.2017.1309349

Kim Y. K., Na, K. S., Myint, A. M., & Leonard, B. E. (2016). The role of pro inflammatory cytokines in neuroinflammation, neurogenesis and the neuroendocrine system in major depression. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 64, 277–284. https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2015.06.008

Kiyota, T. (2017). Neurogenesis and Brain Repair. In T. Ikezu & H. E. Gendelman (Eds.), *Neuroimmune Pharmacology*. 2nd Edition, (pp. 575-597). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-44022-4.

Klein R. Bidirectional modulation of synaptic functions by Eph/ephrin signaling (2008). Nat Neurosci. 2009 Jan;12(1):15-20. doi: 10.1038/nn.2231. Nov 23. PMID: 19029886

Klein, R. (2009). Bidirectional modulation of synaptic functions by Eph/ephrin signaling. *Nature Neuroscience*, 12, 15-20.

Koeppen, J., Nguyen, A. Q., Nikolakopoulou, A. M., Garcia, M., Hanna, S., Woodruff, S., Figueroa, Z., Obenaus, A., & Ethell, I. M. (2018). Functional Consequences of Synapse Remodeling Following Astrocyte-Specific Regulation of Ephrin-B1 in the Adult Hippocampus. The Journal of Neuroscience, 38(25), 5710–5726. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3618-17.2018

Kojima, M., & Mizui, T. (2017). BDNF propeptide: A novel modulator of synaptic plasticity. *Vitamins and Hormones*, 104, 19–28.

Konsman, J. P., Patricia Parnet, P., & Dantzer, R. (2002). Cytokine-induced sickness behaviour: Mechanisms and implications. *Trends in Neurosciences*, 25(3), 154–159. https://doi.org/10.1016/S0166-2236(00)02088-9.

Kordek, R., Nerurkar, V. R., Liberski, P. P., Isaacson, S., Yanagihara, R., & Gajdusek, D. C. (1996). Heightened expression of tumor necrosis factor alpha, interleukin 1 alpha, and glial fibrillary acidic protein in experimental Creutzfeldt-Jakob disease in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(18), 9754–9758. https://doi.org/10.1073/pnas.93.18.9754

Kowalski, E. A., Chen, J., Hazy, A., Fritsch, L. E., Gudenschwager-Basso, E. K., Chen, M., Wang, X., Qian, Y., Zhou, M., Byerly, M., Pickrell, A. M., Matson, J. B., Allen, I. C., & Theus, M. H. (2019). Peripheral loss of EphA4 ameliorates TBI-induced neuroinflammation and tissue damage. Journal of Neuroinflammation, 16(1), 210. https://doi.org/10.1186/s12974-019-1605-2

Kriegstein, A., & Alvarez-Buylla, A. (2009). The glial nature of embryonic and adult neural stem cells. *Annual Review of Neuroscience*, 32(1), 149–184. https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.051508.135600

Kronfol, Z., Silva, J., Greden, J., Dembinski, S., Gardner, R., & Carroll, B. (1983). Impaired lymphocyte function in depressive illness. *Life Sciences*, 33(3), 241–247. https://doi.org/10.1016/0024-3205(83)90382-X

Kubera, M., Curzytek, K., Duda, W., Leskiewicz, M., Basta-Kaim, A., Budziszewska, B.,Roman, A., Zajicova, A., Holan, V., Szczesny, E., Lason, W., and Maes, M., 2013. A new animal model of (chronic) depression induced by repeated and intermittent lipopolysaccharide administration for 4 months. Brain Behav Immun, 31, 96–104.

Kuenzli, S., Tran, C., & Saurat, J. H. (2004). Retinoid receptors in inflammatory responses: a potential target for pharmacology. *Current Drug Targets - Inflammation & Allergy*, 3(4), 355-360. doi: 10.2174/1568010042634587.

Kuhn, H. G., Biebl, M., Wilhelm, D., Li, M., Friedlander, R. M., & Winkler, J. (2005). Increased generation of granule cells in adult Bcl-2-overexpressing mice: a role for cell death during continued hippocampal neurogenesis. *European Journal of Neuroscience*, 22(8), 1907-1915. https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2005.04377.x.

Kuhn, R. (1957). Treatment of depressive states with an iminodibenzyl derivative (G 22355). *Schweizerische Medizinische Wochenschrift*, 87(35–36), 1135–1140.
Kullander K, Klein R (2002) Mechanisms and functions of Eph and ephrin signalling. Nat Rev Mol Cell Biol 3:475–486.
Kullander, K., Croll, S.D., Zimmer, M., Pan, L., McClain, J., Hughes, V., Zabski, S., DeChiara, T.M., Klein, R., Yancopoulos, G.D., and Gale, N.W. (2001). Ephrin-B3 is the midline barrier that prevents corticospinal tract axons from recrossing, allowing for unilateral motor control. Genes Dev 15, 877-888.
Kumar, V., Abbas, A. K., Aster, J. C., & Robbins, S. L. (2013) *Robbins Basic Pathology*, 9th ed., Elsevier, Saunders, Philadelphia, PA.
Kumar, V., Cotran, R. S., & Robbins, S. L. (2003). *Robbins Basic Pathology*. Saunders, Philadelphia, Penns.
Kwok, A. J., Allcock, A., Ferreira, R. C., Cano-Gamez, E., Smee, M., Burnham, K. L., Zurke, Y.-X., Novak, A., Darwent, M., Baron, T., Brown, C., Beer, S., Espinosa, A., Panduro, T., Georgiou, D., Martinez, J., Thraves, H., Perez, E., Fernandez, R., … Knight, J. C. (2023). Neutrophils and emergency granulopoiesis drive immune suppression and an extreme response endotype during sepsis. Nature Immunology, 24(5), 767–779. https://doi.org/10.1038/s41590-023-01490-5
Lackmann, M., Oates, A. C., Dottori, M., Smith, F. M., Do, C., Power, M., ... Boyd, A. W., 1998. Distinct subdomains of the EphA3 receptor mediate ligand binding and receptor dimerization. *Journal of Biological Chemistry*, 273, 20228-20237.
Lacor PN, Buniel MC, Furlow PW, Clemente AS, Velasco PT, Wood M, Viola KL, Klein WL (2007). Abeta oligomer-induced aberrations in synapse composition, shape, and density provide a molecular basis for loss of connectivity in Alzheimer's disease. J Neurosci. ü Jan 24;27(4):796-807. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3501-06.2007. PMID: 17251419; PMCID: PMC6672917.
Lagunas, N., Calmarza-Font, I., Diz-Chaves, Y., & Garcia-Segura, L. M. (2010). Long-term ovariectomy enhances anxiety and depressive-like behaviors in mice submitted to chronic unpredictable stress. *Hormones and Behavior*, 58, 786-791. doi: 10.1016/j.yhbeh.2010.07.014
Lane, M. A., & Bailey, S. J. (2005). Role of retinoid signalling in the adult brain. Progress in neurobiology, 75(4), 275–293. https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2005.03.002.
Lara-Ramírez, R., Zieger, E., & Schubert, M. (2013). Retinoic acid signaling in spinal cord development. The international journal of biochemistry & cell biology, 45(7), 1302–1313. https://doi.org/10.1016/j.biocel.2013.04.002
Larson J, Schomberg S, Schroeder W, Carpenter TC (2008). Endothelial EphA receptor stimulation increases lung vascular permeability. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. Sep;295(3):L431-9. doi: 10.1152/ajplung.90256.2008. Epub 2008 Jul 3. PMID: 18599503; PMCID: PMC2536794.
Lawson, L. J., Perry, V. H., & Gordon, S. (1992). Turnover of resident microglia in the normal adult mouse brain. *Neuroscience*, 48(2), 405–415.
Lawson, M. A., McCusker, R. H., and Kelley, K. W., 2013. Interleukin-1 beta converting enzyme is necessary for development of depression-like behavior following intracerebroventricular administration of lipopolysaccharide to mice. J Neuroinflamm, 10, 54.

Layé, S., Parnet, P., Goujon, E., & Dantzer, R. (1994). Peripheral administration of lipopolysaccharide induces the expression of cytokine transcripts in the brain and pituitary of mice. *Molecular Brain Research*, 27(1), 157–162. https://doi.org/10.1016/0169-328X(94)90197-X

Leal, G., Bramham, C., & Duarte, C. (2017). BDNF and hippocampal synaptic plasticity. *Vitamins and Hormones*, 104, 153–195.

Lee, H.-Y., & Kim, Y.-K. (2008). Plasma brain-derived neurotrophic factor as a peripheral marker for the action mechanism of antidepressants. *Neuropsychobiology*, 57(4), 194–199. https://doi.org/10.1159/000149817

Lee, S.-Y., Cho, J.-H., Cho, S. S., Bae, C.-S., Kim, G.-Y., & Park, D.-H. (2018). Establishment of a chronic obstructive pulmonary disease mouse model based on the elapsed time after LPS intranasal instillation. Laboratory Animal Research, 34(1), 1. https://doi.org/10.5625/lar.2018.34.1.1

Lee, S., Kim, H.-B., Hwang, E.-S., Kim, E., Kim, S.-S., Jeon, T.-D., Song, M., Lee, J.-S., Chung, M.-C., Maeng, S., & Park, J.-H. (2018). Antidepressant-like Effects of p-Coumaric Acid on LPS-induced Depressive and Inflammatory Changes in Rats. Experimental Neurobiology, 27(3), 189–199. https://doi.org/10.5607/en.2018.27.3.189.

Leem AY, Shin MH, Douglas IS, Song JH, Chung KS, Kim EY, Jung JY, Kang YA, Chang J, Kim YS, Park MS (2017). All-trans retinoic acid attenuates bleomycin-induced pulmonary fibrosis via downregulating EphA2-EphrinA1 signaling. Biochem Biophys Res Commun. Sep 23;491(3):721-726. doi: 10.1016/j.bbrc.2017.07.122. Epub 2017 Jul 22. PMID: 28743499.

LeGates, T. A., Kvarta, M. D. & Thompson, S. M. (2019). Sex differences in antidepressant efficacy. *Neuropsychopharmacology*, 44, 140–154.

Lemieux, G., Davignon, A., & Genest, J. (1956). Depressive states during Rauwolfia therapy for arterial hypertension; a report of 30 cases. *Canadian Medical Association Journal*, 74(7), 522–526.

Leng, L., Zhuang, K., Liu, Z., Huang, C., Gao, Y., Chen, G., … Zhang, J. (2018). Menin deficiency leads to depressive-like behaviors in mice by modulating astrocyte-mediated neuroinflammation. *Neuron*, 100(3), 551-563.e7. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2018.08.031

Leng, L., Zhuang, K., Liu, Z., Huang, C., Gao, Y., Chen, G., Lin, H., Hu, Y., Wu, D., Shi, M., Xie, W., Sun, H., Shao, Z., Li, H., Zhang, K., Mo, W., Huang, T. Y., Xue, M., Yuan, Z., Zhang, X., … Zhang, J. (2018). Menin Deficiency Leads to Depressive-like Behaviors in Mice by Modulating Astrocyte-Mediated Neuroinflammation. Neuron, 100(3), 551–563.e7. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2018.08.031

Levi-Montalcini, R., & Hamburger, V. (1951). Selective growth stimulating effects of mouse sarcoma on the sensory and sympathetic nervous system of the chick embryo. *Journal of Experimental Zoology*, 116, 321–361.

Li Y, Su P, Chen Y, Nie J, Yuan TF, Wong AH, Liu F (2022). The Eph receptor A4 plays a role in demyelination and depression-related behavior. J Clin Invest. Apr 15;132(8):e152187. doi: 10.1172/JCI152187. Erratum in: J Clin Invest. 2022 May 16;132(10): PMID: 35271507; PMCID: PMC9012277

Li, R., & Shen, Y. (2005). Estrogen and brain: synthesis, function and diseases. *Frontiers in Bioscience*, 10, 257-267. doi: 10.2741/1525

Li, Y., Wang, H., Wang, X., Liu, Z., Wan, Q., & Wang, G. (2014). Differential expression of hippocampal EphA4 and ephrinA3 in anhedonic-like behavior, stress resilience, and antidepressant drug treatment after chronic unpredicted mild stress. Neuroscience Letters, 566, 292–297. https://doi.org/10.1016/j.neulet.2014.03.008

Liao, H., Bu, W. Y., Wang, T. H., Ahmed, S., & Xiao, Z. C. (2005). Tenascin-R plays a role in neuroprotection via its distinct domains that coordinate to modulate the microglia function. *The Journal of Biological Chemistry*, 280(9), 8316–8323.

Liddelow, S. A., & Barres, B. A. (2017). Reactive Astrocytes: Production, Function, and Therapeutic Potential. Immunity, 46(6), 957–967. https://doi.org/10.1016/j.immuni.2017.06.006

Liddelow, S. A., Guttenplan, K. A., Clarke, L. E., Bennett, F. C., Bohlen, C. J., Schirmer, L., Bennett, M. L., Münch, A. E., Chung, W. S., Peterson, T. C., Wilton, D. K., Frouin, A., Napier, B. A., Panicker, N., Kumar, M., Buckwalter, M. S., Rowitch, D. H., Dawson, V. L., Dawson, T. M., Stevens, B., … Barres, B. A. (2017). Neurotoxic reactive astrocytes are induced by activated microglia. Nature, 541(7638), 481–487. https://doi.org/10.1038/nature21029

Liebl, D. J., Morris, C. J., Henkemeyer, M., & Parada, L. F. (2003). mRNA expression of ephrins and Eph receptor tyrosine kinases in the neonatal and adult mouse central nervous system. *Journal of Neuroscience Research*, 71(1), 7–22. https://doi.org/10.1002/jnr.10457

Lim, G. Y., Tam, W. W., Lu, Y., Ho, C. S., Zhang, M. W., & Ho, R. C. (2022). Author correction: Prevalence of depression in the community from 30 countries between 1994 and 2014. *Scientific Reports*, 12(1), 14856. https://doi.org/10.1038/s41598-022-19021-x

Lima, M. S., Lima, V. C., Piuvezam, G., Azevedo, K. P., Maciel, B. L., & Morais, A. H. (2019). Mechanisms of action of molecules with anti-TNF-alpha activity on intestinal barrier inflammation. *Medicine*, 98(39), e17285.

Lin, K.T., Sloniowski, S., Ethell, D.W., & Ethell, I.M. (2008). Ephrin-B2-induced cleavage of EphB2 receptor is mediated by matrix metalloproteinases to trigger cell repulsion. *The Journal of Biological Chemistry*, 283, 28969-28979.

Linthorst, A. C. (1994). Local administration of recombinant human interleukin-1 beta in the rat hippocampus increases serotonergic neurotransmission, hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis activity, and body temperature. *Endocrinology*, 135(2), 520–532. https://doi.org/10.1210/en.135.2.520

Litterst, C., Georgakopoulos, A., Shioi, J., Ghersi, E., Wisniewski, T., Wang, R., ... Robakis, N.K., 2007. Ligand binding and calcium influx induce distinct ectodomain/gamma-secretase-processing pathways of EphB2 receptor. *The Journal of Biological Chemistry*, 282, 16155-16163.

Liu F, Poursine-Laurent J, Wu HY, Link DC. Interleukin-6 and the granulocyte colony-stimulating factor receptor are major independent regulators of granulopoiesis in vivo but are not required for lineage commitment or terminal differentiation. Blood. 1997 Oct 1;90(7):2583-90. PMID: 9326224.

Liu, P. T., Krutzik S. R., Kim, J., & Modlin, R. L. (2005). Cutting edge: all-trans retinoic acid down-regulates TLR2 expression and function. *Journal of Immunology*, 174(5), 2467-2470.

Liu, W., Gao, J., Hao, N., Li, J., Pei, J., Zou, D., Yang, S., Yin, Y., Yang, X., Mu, P., & Zhang, L. (2023). Effects of miR-204-5p and Target Gene EphB2 on

Cognitive Impairment Induced by Aluminum Exposure in Rats. Biological Trace Element Research. https://doi.org/10.1007/s12011-023-03961-0

Loomer, H. P., Saunders, J. C., & Kline, N. S. (1957). A clinical and pharmacodynamic evaluation of iproniazid as a psychic energizer. *Psychiatric Research Reports*, 8, 129–141.

Lorente de Nó, R. (1934). Studies on the structure of the cerebral cortex. II. Continuation of the study of the ammonic system. *Journal of Psychology and Neuroscience*, 46, 113–177.

Louveau A., Harris, T.H., & Kipnis, J. (2015) Revisiting the mechanisms of CNS immune privilege. *Trends in Immunology*, 36, 569–577.

Lu, Y. C, Yeh, W. C., & Ohashi, P. S. (2008). LPS/TLR4 signal transduction pathway. *Cytokine*, 42, 145–151. doi: 10.1016/j.cyto.2008.01.006

Lucas, R., Lou, J. N., Juillard, P., Moore, M., Bluethmann, H., & Grau, G. E. (1997). Respective role of TNF receptors in the development of experimental cerebral malaria. *Journal of neuroimmunology,* 72(2), 143–148. https://doi.org/10.1016/s0165-5728(96)00185-3

Lussier, A. L., Lebedeva, K., Fenton, E. Y., Guskjolen, A., Caruncho, H. J., & Kalynchuk, L. E. (2013). The progressive development of depression-like behavior in corticosterone- treated rats is paralleled by slowed granule cell maturation and decreased reelin expression in the adult dentate gyrus. *Neuropharmacology*, 71, 174–183. http://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2013.04.012

M.Y. Chiang, D. Misner, G. Kempermann, T. Schikorski, V. Giguere, H.M. Sucov, F.H. Gage, C.F. Stevens, R.M. Evans (1998). An essential role for retinoid receptors RARbeta and RXRgamma in long-term potentiation and depression Neuron, 21, pp. 1353-1361

Ma, L., Xu, Y., Wang, G., & Li, R. (2019). What do we know about sex differences in depression: A review of animal models and potential mechanisms. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry,* 89, 48–56. https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2018.08.026

MacQueen, G. M., Campbell, S., McEwen, B. S., Macdonald, K., Amano, S., Joffe, R. T.,...Young,L. T. (2003). Course of illness, hippocampal function, and hippocampal volume in major depression. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 100, 1387–1392.

Maden, M. (2007). Retinoic acid in the development, regeneration and maintenance of the nervous system. *Nature Reviews Neurosciences*, 8(10), 755-765. DOI: 10.1038/nrn2212.

Maghsoodi, B., Poon, M. M., Nam, C. I., Aoto, J., Ting, P., & Chen, L. (2008). Retinoic acid regulates RARalpha-mediated control of translation in dendritic RNA granules during homeostatic synaptic plasticity. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 105(41), 16015–16020. https://doi.org/10.1073/pnas.0804801105

Majumdar, A., Petrescu, A. D., Xiong, Y., & Noy, N. (2011). Nuclear translocation of cellular retinoic acid-binding protein II is regulated by retinoic acid-controlled SUMOylation. *Journal of Biological Chemistry*, 286(49), 42749–42757. https://doi.org/10.1074/jbc.M111.293464.

Mangaonkar AA, Tande AJ, Bekele DI. Differential Diagnosis and Workup of Monocytosis: A Systematic Approach to a Common Hematologic Finding. Curr

Hematol Malig Rep. 2021 Jun;16(3):267-275. doi: 10.1007/s11899-021-00618-4. Epub 2021 Apr 20. PMID: 33880680; PMCID: PMC8057007.
Mangelsdorf, D. J., Borgmeyer, U., Heyman, R. A., Zhou, J. Y., Ong, E. S., Oro, A. E., ... Evans, R. M. (1992). Characterization of three RXR genes that mediate the action of 9-cis retinoic acid. *Genes Development*, 6(3), 329–344.
Mangelsdorf, D. J., Thummel, C., Beato, M., Herrlich, P., Schütz, G., Umesono, K., ... Evans, R. M. (1995). The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell*, 83(6), 835–839.
Marín-Teva, J. L., M. A. Cuadros, D. Martín-Oliva, and J. Navascués 2011. Microglia and neuronal cell death. Neuron Glia Biology, 7(1):25–40.
Martin, P., & Parkhurst, S. M. (2004). Parallels between tissue repair and embryo morphogenesis. Development (Cambridge, England), 131(13), 3021–3034. https://doi.org/10.1242/dev.01253.
Martins EC, Silveira LDF, Viegas K, Beck AD, Fioravantti Júnior G, Cremonese RV, Lora PS. Neutrophil-lymphocyte ratio in the early diagnosis of sepsis in an intensive care unit: a case-control study. Rev Bras Ter Intensiva. 2019;31(1):64-70. doi: 10.5935/0103-507X.20190010. Epub 2019 Mar 21. PMID: 30916236; PMCID: PMC6443306.
Masi, G., & Brovedani, P. (2011). The hippocampus, neurotrophic factors and depression. *CNS Drugs*, 25(11), 913–931. https://doi.org/10.2165/11595900-000000000-00000
Masiá, S., Alvarez, S., de Lera, A. R., & Barettino, D. (2007). Rapid, nongenomic actions of retinoic acid on phosphatidylinositol-3-kinase signaling pathway mediated by the retinoic acid receptor. Molecular endocrinology (Baltimore, Md.), 21(10), 2391–2402. https://doi.org/10.1210/me.2007-0062
Matsuzaki, M., Honkura, N., Ellis-Davies, G. C. R., & Kasai, H. (2004). Structural basis of long-term potentiation in single dendritic spines. Nature, 429(6993), 761–766. https://doi.org/10.1038/nature02617
Mavria, G., Vercoulen, Y., Yeo, M., Paterson, H., Karasarides, M., Marais, R., ... Marshall, C. J. (2006). ERK-MAPK signaling opposes Rho-kinase to promote endothelial cell survival and sprouting during angiogenesis. *Cancer Cell*, 9, 33–44. doi: 10.1016/j.ccr.2005.12.021.
McCaffery, P., Zhang, J., & Crandall, J. E. (2006). Retinoic acid signaling and function in the adult hippocampus. *Journal of Neurobiology*, 66(7), 780–791. https://doi.org/10.1002/neu.20237
McDonald, M. P. (2015). Methods and Models of the Nonmotor Symptoms of Parkinson Disease. In Movement Disorders (pp. 387–412). Elsevier. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-405195-9.00023-8
McElhinney B., Poynter M.E., Shrivastava P., Hazen S.L., & Janssen-Heininger Y.M. (2003). Eosinophil peroxidase catalyzes JNK-mediated membrane blebbing in a Rho kinase-dependent manner. *The Journal of Leukocyte Biology*, 74:897–907. doi: 10.1189/jlb.0103028.
McEwen, B. S. (2007). Physiology and Neurobiology of Stress and Adaptation: Central Role of the Brain. Physiological Reviews, 87(3), 873–904. https://doi.org/10.1152/physrev.00041.2006
McKinnell, I. W., Makarenkova, H., de Curtis, I., Turmaine, M., & Patel, K. (2004). EphA4, RhoB and the molecular development of feather buds are maintained by the integrity of the actin cytoskeleton. *Developmental Biology*, 270, 94–105.

Medzhitov, R. (2008). Origin and physiological roles of inflammation. *Nature*, 454(7203), 428–435. https://doi.org/10.1038/nature07201.
Mehta, A.K., Gracias, D.T., and Croft, M. (2018). TNF activity and T cells. Cytokine 101, 14-18.
Mellitzer, G., Xu, Q., & Wilkinson, D. G. (1999). Eph receptors and ephrins restrict cell intermingling and communication. Nature, 400(6739), 77–81. https://doi.org/10.1038/21907
Mendiola, A. S., & Cardona, A. E. (2018). The IL-1β phenomena in neuroinflammatory diseases. *Journal of Neural Transmission*, 125(5), 781-795.
Merlos-Suárez A, Batlle E (2008) Eph-ephrin signalling in adult tissues and cancer. Curr Opin Cell Biol 20(2):194–200. https://doi.org/10.1016/j.ceb.2008.01.011.
Mi, J.-Q., Li, J.-M., Shen, Z.-X., Chen, S.-J., & Chen, Z. (2012). How to manage acute promyelocytic leukemia. Leukemia, 26(8), 1743–1751. https://doi.org/10.1038/leu.2012.57
Michaelsen, K., Zagrebelsky, M., Berndt-Huch J., Polack, M., Buschler, A., Sendtner, M., & Korte, M. (2010). Neurotrophin receptors TrkB.T1 and p75NTR cooperate in modulating both functional and structural plasticity in mature hippocampal neurons. *European Journal of Neuroscience*, 32(11), 1854-1865.
Miller, A. H. (2010). Depression and immunity: a role for T cells? *Brain, Behavior, and Immunity*, 24(1), 1-8.
Mingaud, F., Mormede, C., Etchamendy, N., Mons, N., Niedergang, B., Wietrzych, M., Pallet, V., Jaffard, R., Krezel, W., Higueret, P., & Marighetto, A. (2008). Retinoid hyposignaling contributes to aging-related decline in hippocampal function in short-term/working memory organization and long-term declarative memory encoding in mice. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience, 28(1), 279–291. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4065-07.2008
Misner, D. L., Jacobs, S., Shimizu, Y., Urquiza, A. M., Solomin, L., Perlmann, T., ...Evans, R. M. (2001). Vitamin A deprivation results in reversible loss of hippocampal long-term synaptic plasticity. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 98, 11714–11719.
Mohammad, S., & Thiemermann, C. (2021). Role of metabolic endotoxemia in systemic inflammation and potential interventions. *Frontiers in Immunology*, 11. https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.594150
Molendijk, M. L., Spinhoven, P., Polak, M., Bus, B. A. A., Penninx, B. W. J. H., & Elzinga, B. M. (2014). Serum BDNF concentrations as peripheral manifestations of depression: evidence from a systematic review and meta-analyses on 179 associations (N=9484). *Molecular Psychiatry*, 19(7), 791–800. https://doi.org/10.1038/mp.2013.105
Molliver, M. E. (1987). Serotonergic neuronal systems: what their anatomic organization tells us about function. *Journal of Clinical Psychopharmacology*, 7, 3S-23S.
Molotkov A, Molotkova N, Duester G (2006). Retinoic acid guides eye morphogenetic movements via paracrine signaling but is unnecessary for retinal dorsoventral patterning. Development. May;133(10):1901-10. doi: 10.1242/dev.02328. Epub 2006 Apr 12. PMID: 16611695; PMCID: PMC2833011.
Monteggia, L. M., Luikart, B., Barrot, M., Theobold, D., Malkovska, I., Nef, S., ... Nestler, E. J. (2007). Brain-derived neurotrophic factor conditional knockouts

show gender differences in depression-related behaviors. *Biological Psychiatry*, 61(2), 187–197. https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2006.03.021
Mrak, R. E. (2009). Neuropathology and the neuroinflammation idea. *Journal of Alzheimer's Disease*, 18(3), 473–481. https://doi.org/10.3233/JAD-2009-1158
Murai, K. K. & Pasquale, E. B. (2003). 'Eph'ective signaling: forward, reverse and crosstalk. *Journal of Cell Science*, 116(14), 2823-2832.
Murai, K. K., Nguyen, L. N., Irie, F., Yamaguchi, Y., & Pasquale, E. B. (2003a). Control of hippocampal dendritic spine morphology through ephrin-A3/EphA4 signaling. Nature neuroscience, 6(2), 153–160. https://doi.org/10.1038/nn994.
Murai, K. K., Nguyen, L. N., Koolpe, M., McLennan, R., Krull, C. E., & Pasquale, E. B. (2003b). Targeting the EphA4 receptor in the nervous system with biologically active peptides. Molecular and Cellular Neuroscience, 24(4), 1000–1011. https://doi.org/10.1016/j.mcn.2003.08.006
Murray, C. J., & Lopez, A. D. (1997). Global mortality, disability, and the contribution of risk factors: Global burden of disease study. *The Lancet*, 349(9063), 1436–1442. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(96)07495-8
Nagano, K., Kanasaki, S. -I., Yamashita, T., Maeda, Y., Inoue, M., Higashisaka, K., ... Tsunoda, S. -I. (2013). Expression of Eph receptor A10 is correlated with lymph node metastasis and stage progression in breast cancer patients. *Cancer Medicine*, 2, 972-977.
Naseri, F., Sirati-Sabet, M., Sarlaki, F., Keimasi, M., Mokarram, P., Siri, M., Ghasemi, R., Shahsavari, Z., & Goshadrou, F. (2022). The Effect of Ghrelin on Apoptosis, Necroptosis and Autophagy Programmed Cell Death Pathways in the Hippocampal Neurons of Amyloid-β 1–42-Induced Rat Model of Alzheimer's Disease. International Journal of Peptide Research and Therapeutics, 28(5), 151. https://doi.org/10.1007/s10989-022-10457-3
Naseri, F., Sirati-Sabet, M., Sarlaki, F., Keimasi, M., Mokarram, P., Siri, M., Ghasemi, R., Shahsavari, Z., & Goshadrou, F. (2022). The Effect of Ghrelin on Apoptosis, Necroptosis and Autophagy Programmed Cell Death Pathways in the Hippocampal Neurons of Amyloid-β 1–42-Induced Rat Model of Alzheimer's Disease. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, *28*(5), 151. https://doi.org/10.1007/s10989-022-10457-3
Neal, M. D., Leaphart, C., Levy, R., Prince, J., Billiar, T. R., Watkins, S., ...Hackam, D. J. (2006). Enterocyte TLR4 mediates phagocytosis and translocation of bacteria across the intestinal barrier. *Journal of Immunology*, 176, 3070-3079.
Nestler, E. J., Barrot, M., DiLeone, R. J., Eisch, A. J., Gold, S. J., and Monteggia, L. M. (2002). Neurobiology of Depression. Neuron 34, 13–25. doi: 10.1016/S0896-6273(02)00653-0
Nicoll, R. A., & Roche, K. W. (2013). Long-term potentiation: peeling the onion. Neuropharmacology, 74, 18–22. https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2013.02.010
Niederreither, K., Subbarayan, V., Dollé, P., & Chambon, P. (1999). Embryonic retinoic acid synthesis is essential for early mouse post-implantation development. Nature genetics, 21(4), 444–448. https://doi.org/10.1038/7788
Niknazar, S., Nahavandi, A., Peyvandi, A. A., Peyvandi, H., Akhtari, A. S., & Karimi, M. (2016). Comparison of the adulthood chronic stress effect on hippocampal BDNF signaling in male and female rats. *Molecular Neurobiology*, 53(6), 4026–4033. https://doi.org/10.1007/s12035-015-9345-5

Nimchimsky, E., Sabatini, B. L., & Svoboda, K. (2002). Structure and function of dendritic spines. *Annual Review of Physiology*, 64, 313-353.

Nimmerjahn, A., Kirchhoff, F., & Helmchen, F. (2005). Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. *Science*, 308, 1314–1318.

Norden, D. M., Fenn, A. M., Dugan, A., & Godbout, J. P. (2014). TGFβ produced by IL-10 redirected astrocytes attenuates microglial activation. *Glia*, 62(6), 881–895. https://doi.org/10.1002/glia.22647

Norden, D. M., Trojanowski, P. J., Villanueva, E., Navarro, E., & Godbout, J. P. (2016). Sequential activation of microglia and astrocyte cytokine expression precedes increased Iba-1 or GFAP immunoreactivity following systemic immune challenge. Glia, 64(2), 300–316. https://doi.org/10.1002/glia.22930

Noren, N.K., & Pasquale, E. B. (2004). Eph receptor-ephrin bidirectional signals that target Ras and Rho proteins. *Cellular Signalling*, 16(6), 655-666.

Norrholm, S. D., & Ouimet, C. C. (2001). Altered dendritic spine density in animal models of depression and in response to antidepressant treatment. Synapse, 42(3), 151–163. https://doi.org/10.1002/syn.10006

Norris, D. A., Osborn, R., Robinson, W., & Tonnesen, M. G. (1987). Isotretinoin produces significant inhibition of monocyte and neutrophil chemotaxis in vivo in patients with cystic acne. *Journal of Investigative Dermatology*, *89*(1), 38–43. https://doi.org/10.1111/1523-1747.ep12580370

O'Connor, J. C., Andre, C., Wang, Y., Lawson, M. A., Szegedi, S. S., Lestage, J., Castanon, N., Kelley, K. W., and Dantzer, R., 2009b. Interferon- and Tumor Necrosis Factor- Mediate the upregulation of indoleamine 2,3-dioxygenase and the induction of depressive-like behavior in mice in response to Bacillus Calmette- Guerin. J Neurosci, 29 (13), 4200–4209.

O'Neil, M. F., & Moore, N. A. (2003). Animal models of depression: are there any?. Human psychopharmacology, 18(4), 239–254. https://doi.org/10.1002/hup.496.

O'Reilly, K. C., Shumake, J., Gonzalez-Lima, F., Lane, M. A., & Bailey, S. J. (2006). Chronic administration of 13-cis-retinoic acid increases depression-related behavior in mice. Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology, 31(9), 1919–1927. https://doi.org/10.1038/sj.npp.1300998

Okyere, B., Giridhar, K., Hazy, A., Chen, M., Keimig, D., Bielitz, R. C., Xie, H., He, J. Q., Huckle, W. R., & Theus, M. H. (2016). Endothelial-Specific EphA4 Negatively Regulates Native Pial Collateral Formation and Re-Perfusion following Hindlimb Ischemia. PloS one, 11(7), e0159930. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0159930

Olbrich, H.-G., & Braak, H. (1985). Ratio of pyramidal cells versus non-pyramidal cells in sector CA1 of the human Ammon's horn. *Anatomy and Embryology*, 173(1), 105–110. https://doi.org/10.1007/BF00707308

Olmos, G., & Lladó, J. (2014). Tumor necrosis factor alpha: A link between neuroinflammation and excitotoxicity. *Mediators of Inflammation*, 2014(8), 861231-12 pages.

Otte C, Gold SM, Penninx BW, Pariante CM, Etkin A, Fava M, Mohr DC, Schatzberg AF. 2016 Major depressive disorder. Nat Rev Dis Primers. Sep 15;2:16065. doi: 10.1038/nrdp.2016.65. PMID: 27629598.

Page, M. J., Bester, J., & Pretorius, E. (2018). The inflammatory effects of TNF-α and complement component 3 on coagulation. *Scientific Reports*, 8(1), 1812-1819.
Paschaki, M., Cammas, L., Muta, Y., Matsuoka, Y., Mak, S. S., Rataj-Baniowska, M., Fraulob, V., Dollé, P., & Ladher, R. K. (2013). Retinoic acid regulates olfactory progenitor cell fate and differentiation. Neural development, 8, 13. https://doi.org/10.1186/1749-8104-8-13
Pasquale, E. B. (1997). The Eph family of receptors. *Current Opinion in Cell Biology*, 9, 608-615.
Pasquale, E. B. (2005). Eph receptor signaling casts a wide net on cell behaviour. *Nature Reviews*, 6, 462-475.
Pasquale, E. B. (2008). Eph-Ephrin Bidirectional Signaling in Physiology and Disease. *Cell*, 133(1), 38–52. https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.03.011.
Pawson, T., and Scott, J.D. (1997). Signaling through scaffold, anchoring, and adaptor proteins. Science 278, 2075-2080.
Paykel E. S. (2001). Stress and affective disorders in humans. Seminars in clinical neuropsychiatry, 6(1), 4–11. https://doi.org/10.1053/scnp.2001.19411
Pera, E. M., Acosta, H., Gouignard, N., Climent, M., & Arregi, I. (2014). Active signals, gradient formation and regional specificity in neural induction. Experimental Cell Research, 321(1), 25–31. https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2013.11.018
Perdiguero, E. G., Klapproth, K., Schulz, C., Busch, K., Azzoni, E., Crozet, L., ... Rodewald, H. R. (2015). Tissue-resident macrophages originate from yolk-sac-derived erythro-myeloid progenitors. *Nature*, 518(7540), 547-551. doi: 10.1038/nature13989.
Pergaris, A., Danas, E., Goutas, D., Sykaras, A. G., Soranidis, A., & Theocharis, S. (2021). The clinical impact of the EPH/Ephrin system in cancer: Unwinding the thread. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(16), 8412. https://doi.org/10.3390/ijms22168412
Perry, V. H., & Holmes, C. (2014). Microglial priming in neurodegenerative disease. *Nature Reviews Neurology*, 10(4), 217–224.
Peyron, C., Petit, J. M., Rampon, C., Jouvet, M., & Luppi, P. H. (1998). Forebrain afferents to the rat dorsal raphe nucleus demonstrated by retrograde and anterograde tracing methods. *Neuroscience*, 82, 443-468.
Planagumà, J., Haselmann, H., Mannara, F., Petit-Pedrol, M., Grünewald, B., Aguilar, E., Röpke, L., Martín-García, E., Titulaer, M. J., Jercog, P., Graus, F., Maldonado, R., Geis, C., & Dalmau, J. (2016). Ephrin-B2 prevents N-methyl-D-aspartate receptor antibody effects on memory and neuroplasticity. Annals of Neurology, 80(3), 388–400. https://doi.org/10.1002/ana.24721
Ponomarev, E. D., Maresz, K., Tan, Y., & Dittel, B. N. (2007). CNS-derived interleukin-4 is essential for the regulation of autoimmune inflammation and induces a state of alternative activation in microglial cells. *Journal of Neuroscience*, 27(40), 10714–10721. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1922-07.2007.
Poon, M. M., & Chen, L. (2008). Retinoic acid-gated sequence-specific translational control by RARalpha. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 105(51), 20303–20308. https://doi.org/10.1073/pnas.0807740105

Porro, C., Cianciulli, A., & Panaro, M. (2020). The regulatory role of IL-10 in neurodegenerative diseases. *Biomolecules*, 10(7), 1017.

Pozzi, S., Benedusi, V., Maggi, A., & Vegeto, E. (2006). Estrogen action in neuroprotection and brain inflammation. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1089, 302-323. doi: 10.1196/annals.1386.035

Pribiag, H., and Stellwagen, D. (2014). Neuroimmune regulation of homeostatic synaptic plasticity. Neuropharmacology 78, 13-22.

Qi, X. R., Zhao, J., Liu, J., Fang, H., Swaab, D. F., & Zhou, J. N. (2015). Abnormal retinoid and TrkB signaling in the prefrontal cortex in mood disorders. Cerebral cortex (New York, N.Y. : 1991), 25(1), 75–83. https://doi.org/10.1093/cercor/bht203.

Qin, H., Noberini, R., Huan, X., Shi, J., Pasquale, E., & Song, J. (2009). Structural characterization of the EphA4-Ephrin-B2 complex reveals new features enabling Eph-Ephrin binding promiscuity. *The Journal of Biological Chemistry*, 285, 644-654.

Qin, X.-Y., Fang, H., Shan, Q.-H., Qi, C.-C., & Zhou, J.-N. (2020). All-trans Retinoic Acid-induced Abnormal Hippocampal Expression of Synaptic Genes SynDIG1 and DLG2 is Correlated with Anxiety or Depression-Like Behavior in Mice. International Journal of Molecular Sciences, 21(8), 2677. https://doi.org/10.3390/ijms21082677

Raetz, C. R., & Whitfield, C. (2002). Lipopolysaccharide endotoxins. *The Annual Review of Biochemistry*, 71, 635-700.

Raison, C. L., Capuron, L., & Miller, A. H. (2006). Cytokines sing the blues: inflammation and the pathogenesis of depression. *Trends in Immunology*, 27(1), 24–31. https://doi.org/10.1016/j.it.2005.11.006

Ray, A. (2016). Cytokines and their role in health and disease: A brief overview. *MOJ Immunology*, 4(2). https://doi.org/10.15406/moji.2016.04.00121

Reifen, R., Nur, T., Ghebermeskel, K., Zaiger, G., Urizky, R., & Pines, M. (2002). Vitamin A deficiency exacerbates inflammation in a rat model of colitis through activation of nuclear factor-kappaB and collagen formation. *Journal of Nutrition*, 132(9), 2743-2747. doi: 10.1093/jn/132.9.2743.

Ribeiro, A., Ribeiro, J. P., & Von Doellinger, O. (2018). Depression and psychodynamic psychotherapy. *Revista Brasileira de Psiquiatria*, 40, 105–109.

Rice, J. B., Stoll, L. L., Li, W. G., Denning, G. M., Weydert, J., Charipar, E., ... Weintraub, N. L. (2003). Low-level endotoxin induces potent inflammatory activation of human blood vessels: inhibition by statins. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 23(9), 1576-1582. doi: 10.1161/01.ATV.0000081741.38087.F9.

Rietschel, E. T., Kirikae, T., Schade, F. U., Mamat, U., Schmidt, G., Loppnow, H., ... Brade, H. (1994). Bacterial endotoxin: molecular relationships of structure to activity and function. *The FASEB Journal*, 8(2), 217-225.

Rochette-Egly C. (2015). Retinoic acid signaling and mouse embryonic stem cell differentiation: Cross talk between genomic and non-genomic effects of RA. Biochimica et biophysica acta, 1851(1), 66–75. https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2014.04.003

Romanovsky, A. A. (2000). Thermoregulatory manifestations of systemic inflammation: Lessons from vagotomy. *Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical*, 85(1), 39–48. https://doi.org/10.1016/S1566-0702(00)00218-6.

Ronnback, C., & Hansson, E. (2019). The importance and control of low-grade inflammation due to damage of cellular barrier systems that may lead to systemic inflammation. *Frontiers in Neurology*, 10, 533.

Ross, M. H., & Pawlina, W. (2010). Histology: A text and atlas: With correlated cell and molecular biology (6th ed.). Philadelphia: Lip pincott Williams & Wilkins

Rubio, F. J., Ampuero, E., Sandoval, R., Toledo, J., Pancetti, F., & Wyneken, U. (2013). Long-term fluoxetine treatment induces input-specific LTP and LTD impairment and structural plasticity in the CA1 hippocampal subfield. Frontiers in Cellular Neuroscience, 7. https://doi.org/10.3389/fncel.2013.00066

Rutenburg, S., Skarnes, R., Palmkrio, C., & Fine, J. (1967). Detoxification of endotoxin by perfusion of liver and spleen. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 125, 455-459.

Sabatini, B. L., Maravall, M., & Svoboda, K. (2001). Ca2+ signaling in dendritic spines. *Current Opinion in Neurobiology*, 11, 349-356.

Sah, P., Faber, E.S., Lopez De Armentia, M., & Power, J. (2003). The amygdaloid complex: anatomy and physiology. *Physiological Reviews*, 83, 803-834.

Sakai, Y., Crandall, J. E., Brodsky, J., McCaffery, P. (2004). 13-cis retinoic acid (accutane) suppresses hippocampal cell survival in mice. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1021, 436–440.

Salter, M. W., & Beggs, S. (2014). Sublime microglia: expanding roles for the guardians of the CNS. Cell, 158(1), 15–24. https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.06.008.

Samarut, E., Fraher, D., Laudet, V., & Gibert, Y. (2015). ZebRA: An overview of retinoic acid signaling during zebrafish development. Biochimica et biophysica acta, 1849(2), 73–83. https://doi.org/10.1016/j.bbagrm.2014.05.030

Samuels, B. A., Mendez-David, I., Faye, C., David, S. A., Pierz, K. A., Gardier, A. M., Hen, R., & David, D. J. (2016). Serotonin 1A and Serotonin 4 Receptors: Essential Mediators of the Neurogenic and Behavioral Actions of Antidepressants. The Neuroscientist : a review journal bringing neurobiology, neurology and psychiatry, 22(1), 26–45. https://doi.org/10.1177/1073858414561303

Sánchez, M. M., Ladd, C. O., & Plotsky, P. M. (2001). Early adverse experience as a developmental risk factor for later psychopathology: evidence from rodent and primate models. Development and psychopathology, 13(3), 419–449. https://doi.org/10.1017/s0954579401003029.

Santello, M., & Volterra, A. (2012). TNFalpha in synaptic function: switching gears. Trends in Neurosciences 35, 638-647.

Satoh, M., Ando, S., Shinoda, T., & Yamazaki, M. (2008). Clearance of bacterial lipopolysaccharides and lipid A by the liver and the role of arginino-succinate synthase. *Innate Immunity*, 14, 51-60.

Sawada, M., Suzumura, A., Hosoya, H., Marunouchi, T., & Nagatsu, T. (1999). Interleukin-10 inhibits both production of cytokines and expression of cytokine receptors in microglia. *Journal of Neurochemistry*, 72(4), 1466–1471. https://doi.org/10.1046/j.1471- 4159.1999.721466.x.

Schafer, D. P., & Stevens, B. (2013). Phagocytic glial cells: sculpting synaptic circuits in the developing nervous system. Current opinion in neurobiology, 23(6), 1034–1040. https://doi.org/10.1016/j.conb.2013.09.012

Scheller, J., Chalaris, A., Schmidt-Arras, D., & Rose-John, S. (2011). The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1813 (5), 878–888.

Schultz, C., & Engelhardt, M. (2014). Anatomy of the Hippocampal Formation. In K. Szabo, M. G. Hennerici, & J. Bogousslavsky (Eds.), *The Hippocampus in Clinical Neuroscience*, 1st Edition, (pp. 6-17). Karger. https://doi.org/10.1159/000360925.

Segal, M. (2005). Dendritic spines and long-term plasticity. Nat. Rev. Neurosci. 6, 277–284.

Seguin-Devaux C, Hanriot D, Dailloux M, Latger-Cannard V, Zannad F, Mertes P-M, Longrois D and Devaux Y (2005), "Retinoic acid amplifies the host immune response to LPS through increased T lymphocytes number and LPS binding protein expression", Molecular and Cellulae Endocrinology, Vol. 245, pp. 67-76.

Segura, I., Essmann, C. L., Weinges, S., & Acker-Palmer, A. (2007). Grb4 and GIT1 transduce EphrinB reverse signals modulating spine morphogenesis and synapse formation. *Nature Neuroscience*, 10, 301-310.

Seigel, T. A., Cocchi, M. N., Salciccioli, J., Shapiro, N. I., Howell, M., Tang, A., & Donnino, M. W. (2012). Inadequacy of temperature and white blood cell count in predicting bacteremia in patients with suspected infection. *The Journal of Emergency Medicine*, 42(3), 54-59. doi: 10.1016/j.jemermed.2010.05.038.

Seiradake, E., Harlos, K., Sutton, G., Aricescu, A.R., & Jones, E.Y., 2010. An extracellular steric seeding mechanism for Eph-Ephrin signaling platform assembly. *Nature Structural & Molecular Biology*, 17, 398-402.

Seligman, M. E., & Maier, S. F. (1967). Failure to escape traumatic shock. Journal of experimental psychology, 74(1), 1–9. https://doi.org/10.1037/h0024514

Semmler, A., Hermann, S., Mormann, F., Weberpals, M., Paxian, S. A., Okulla, T., ... Heneka, M. T. (2008). Sepsis causes neuroinflammation and concomitant decrease of cerebral metabolism. *Journal of Neuroinflammation*, 5(1), 38. https://doi.org/10.1186/1742-2094-5-38

Sen J, Harpavat S, Peters MA, Cepko CL. Retinoic acid regulates the expression of dorsoventral topographic guidance molecules in the chick retina. Development. 2005 Dec;132(23):5147-59. doi: 10.1242/dev.02100. Epub 2005 Oct 26. PMID: 16251210.

Seney, M. L., Huo, Z., Cahill, K., French, L., Puralewski, R., Zhang, J., ... Sibille, E. (2018). Opposite molecular signatures of depression in men and women. *Biological Psychiatry*, 84(1), 18–27. https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2018.01.017

Serrats, J., Schiltz, J. C., García-Bueno, B., van Rooijen, N., Reyes, T. M., & Sawchenko, P. E. (2010). Dual roles for perivascular macrophages in immune-to-brain signaling. *Neuron*, 65(1), 94–106. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2009.11.032

Sharma A, Patro N, Patro IK (2016).Lipopolysaccharide-Induced Apoptosis of Astrocytes: Therapeutic Intervention by Minocycline. Cell Mol Neurobiol. 2016 May;36(4):577-92. doi: 10.1007/s10571-015-0238-y. Epub 2015 Jul 19. PMID: 26188416.

Sheng, J. G., Mrak, R. E., & Griffin, W. S. T. (1998). Enlarged and phagocytic, but not primed, interleukin-1α-immunoreactive microglia increase with age in

normal human brain. *Acta Neuropathologica*, 95(3), 229–234. https://doi.org/10.1007/s004010050792

Sheppard, O., Coleman, M. P., & Durrant, C. S. (2019). Lipopolysaccharide-induced neuroinflammation induces presynaptic disruption through a direct action on brain tissue involving microglia-derived interleukin 1 beta. *Journal of Neuroinflammation*, 16(1), 106-106.

Shin, H.-H., Lee, J.-E., & Choi, H.-S. (2007). Absence of 4-1BB increases cell influx into the peritoneal cavity in response to LPS stimulation by decreasing macrophage IL-10 levels. *FEBS Letters*, *581*(22), 4355–4360. https://doi.org/10.1016/j.febslet.2007.08.015

Shintani, F., Kanba, S., Nakaki, T., Nibuya, M., Kinoshita, N., Suzuki, E., ... Asai, M. (1993). Interleukin-1 beta augments release of norepinephrine, dopamine, and serotonin in the rat anterior hypothalamus. *The Journal of Neuroscience*, 13(8), 3574–3581. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.13-08-03574.1993

Shirato K, Ujike M, Kawase M, Matsuyama S. (2015) Identification of CCL2, RARRES2 and EFNB2 as host cell factors that influence the multistep replication of respiratory syncytial virus. Virus Res. Dec 2;210:213-26. doi: 10.1016/j.virusres.2015.08.006. Epub 2015 Aug 12. PMID: 26277777.

Shrum, B., Anantha, R. V, Xu, S. X., Donnelly, M., Haeryfar, S. M., McCormick, J. K., & Mele, T. (2014). A robust scoring system to evaluate sepsis severity in an animal model. *BMC Research Notes*, 7(1), 233. https://doi.org/10.1186/1756-0500-7-233

Sim, K., Lau, W. K., Sim, J., Sum, M. Y., & Baldessarini, R. J. (2015). Prevention of Relapse and Recurrence in Adults with Major Depressive Disorder: Systematic Review and Meta-Analyses of Controlled Trials. The international journal of neuropsychopharmacology, 19(2), pyv076. https://doi.org/10.1093/ijnp/pyv076

Sippy, B. D., Hofman, F. M., Wallach, D., & Hinton, D. R. (1995). Increased expression of tumor necrosis factor-alpha receptors in the brains of patients with AIDS. *Journal of acquired immune deficiency syndromes and human retrovirology : official publication of the International Retrovirology Association*, 10(5), 511–521.

Slattery, D. A., & Cryan, J. F. (2014). The ups and downs of modelling mood disorders in rodents. *Institute for Laboratory Animal Research Journal*, 55 (2), 297–309.

Smith, R. S. (1991). The macrophage theory of depression. *Medical Hypotheses*, 35(4), 298–306. https://doi.org/10.1016/0306-9877(91)90272-Z

Sohail, M. U., Yassine, H. M., Sohail, A., & Thani, A. A. A. (2019). Impact of physical exercise on gut microbiome, inflammation, and the pathobiology of metabolic disorders. *Review of Diabetic Studies*, 15(1), 35–48. https://doi.org/10.1900/RDS.2019.15.35

Song, C., & Wang, H. (2011). Cytokines mediated inflammation and decreased neurogenesis in animal models of depression. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, 35(3), 760-768.

Song, N. N., Huang, Y., Yu, X., Lang, B., Ding, Y. Q., & Zhang, L. (2017). Divergent Roles of Central Serotonin in Adult Hippocampal Neurogenesis. Frontiers in cellular neuroscience, 11, 185. https://doi.org/10.3389/fncel.2017.00185

Spalding, K. L., Bergmann, O., Alkass, K., Bernard, S., Salehpour, M., & Huttner, H. B. (2013). Dynamics of hippocampal neurogenesis in adult humans. *Cell*, 153(6), 1219-1227.

Sriram, K., and O'Callaghan, J.P. (2007). Divergent roles for tumor necrosis factor-alpha in the brain. J Neuroimmune Pharmacol 2, 140-153.

Starling J &, Koo J. (2005) .Evidence based or theoretical concern? Pseudotumor cerebri and depression as acitretin side effects. J Drugs Dermatol. Nov-Dec;4(6):690-6. PMID: 16302554.

Steen, E. H., Wang, X., Balaji, S., Butte, M. J., Bollyky, P. L., & Keswani, S. G. (2020). The role of the anti-inflammatory cytokine interleukin-10 in tissue fibrosis. *Advances in Wound Care*, 9(4), 184-198.

Steinmetz, C.C., and Turrigiano, G.G. (2010). Tumor necrosis factor-alpha signaling maintains the ability of cortical synapses to express synaptic scaling. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience 30, 14685-14690.

Stellwagen, D., & Malenka, R.C. (2006). Synaptic scaling mediated by glial TNF-alpha. Nature 440, 1054-1059.

Stephensen, C. B. (2001). Vitamin A, infection, and immune function. *The Annual Review of Nutrition,* 21, 167-192.

Stephenson-Jones, M., Floros, O., Robertson, B., & Grillner, S. (2012). Evolutionary conservation of the habenular nuclei and their circuitry controlling the dopamine and 5-hydroxytryptophan (5-HT) systems. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(3), E164-73. https://doi.org/10.1073/pnas.1119348109

Steven, S., Dib, M., Roohani, S., Kashani, F., Münzel, T., & Daiber, A. (2017). Time Response of Oxidative/Nitrosative Stress and Inflammation in LPS-Induced Endotoxaemia—A Comparative Study of Mice and Rats. International Journal of Molecular Sciences, 18(10), 2176. https://doi.org/10.3390/ijms18102176

Steward, O. (1976). Topographic organization of the projections from the entorhinal area to the hippocampal formation of the rat. J. Comp. Neurol. 167, 285–314.

Stubbs, D. J., Yamamoto, A. K., & Menon, D. K. (2013). Imaging in sepsis-associated encephalopathy—insights and opportunities. *Nature Reviews Neurology*, 9(10), 551-561. https://doi.org/10.1038/nrneurol.2013.177

Suzuki, K. (2018). Cytokine response to exercise and its modulation. *Antioxidants*, 7(1), 17. https://doi.org/10.3390/antiox7010017

Suzuki, K. (2019). Characterization of exercise-induced cytokine release, the impacts on the body, the mechanisms and modulations. *International Journal of Sports and Exercise Medicine*, 5(3). https://doi.org/10.23937/2469-5718/1510122

Suzuki, K., Nakaji, S., Yamada, M., Totsuka, M., Sato, K., & Sugawara, K. (2002). Systemic inflammatory response to exhaustive exercise. Cytokine kinetics. *Exercise Immunology Review*, 8, 6–48.

Swindale, N. (1981). Dendritic spines only connect. *Trends in Neurosciences*, 4, 240-241.

Swindell, E. C., Thaller, C., Sockanathan, S., Petkovich, M., Jessell, T. M., & Eichele, G. (1999). Complementary domains of retinoic acid production and degradation in the early chick embryo. Developmental biology, 216(1), 282–296. https://doi.org/10.1006/dbio.1999.9487

Swindell, E. C., Thaller, C., Sockanathan, S., Petkovich, M., Jessell, T. M., & Eichele, G. (1999). Complementary domains of retinoic acid production and degradation in the early chick embryo. Developmental Biology, 216(1), 282–296. https://doi.org/10.1006/dbio.1999.9487

Takamura, R., Watamura, N., Nikkuni, M., & Ohshima, T. (2017). All-trans retinoic acid improved impaired proliferation of neural stem cells and suppressed microglial activation in the hippocampus in an Alzheimer's mouse model. Journal of Neuroscience Research, 95(3), 897–906. https://doi.org/10.1002/jnr.23843

Takasu, M. A., Dalva, M. B., Zigmond, R. E., and Greenberg, M. E. (2002). Modulation of NMDA receptor-dependent calcium influx and gene expression through EphB receptors. *Science*, 295, 491-495.

Tang, X. H., & Gudas, L. J. (2011). Retinoids, retinoic acid receptors, and cancer. *Annual Review of Pathology*, 6, 345–364.

Tang, Y., & Weidong, L. (2016). Differential roles of M1 and M2 microglia in neurodegenerative diseases. *Molecular Neurobiology*, 53(2), 1181–1194. https://doi.org/10.1007/s12035-014-9070-5.

Tettamanti, G., Cattaneo, A. G., Gornati, R., Eguileor, M., Bernardini, G., & Binelli, G. (2010). Phylogenesis of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in vertebrates. *Gene*, 450(1-2), 85-93.

Thacher, S., Vasudevan, J., & Chandraratna, R. (2000). Therapeutic applications for ligands of retinoid receptors. *Current Pharmaceutical Design*, *6*(1), 25–58. https://doi.org/10.2174/1381612003401415

Thase, M.E. (2006). Preventing relapse and recurrence of depression: A brief review of therapeutic options. *CNS Spectrums*, 11:, 2–21. doi: 10.1017/S1092852900015212.

Theodosiou, M., Laudet, V., Schubert, M. (2010). From carrot to clinic: an overview of the retinoic acid signaling pathway. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 67, 1423-1445. DOI: 10.1007/s00018-010-0268-z.

Torii, A., Miyake, M., Morishita, M., Ito, K., Torii, S., & Sakamoto, T. (2004). Vitamin A reduces lung granulomatous inflammation with eosinophilic and neutrophilic infiltration in Sephadex-treated rats. *European Journal of Pharmacology*, *497*(3), 335–342. https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2004.06.056

Toth, Z., Seress, L., Toth, P., Ribak, C. E., & Gallyas, F. (1997). A common morphological response of astrocytes to various injuries: "dark" astrocytes. A light and electron microscopic analysis. *The Journal für Hirnforschung*, 38(2), 173-186.

Tremblay, M., Riad, M., Bouvier, D., Murai, K. K., Pasquale, E. B., Descarries, L., & Doucet, G. (2007). Localization of EphA4 in axon terminals and dendritic spines of adult rat hippocampus. *The Journal of Comparative Neurology*, 501(5), 691–702. https://doi.org/10.1002/cne.21263

Tremblay, M., Riad, M., Chierzi, S., Murai, K. K., Pasquale, E. B., & Doucet, G. (2009). Developmental course of EphA4 cellular and subcellular localization in the postnatal rat hippocampus. Journal of Comparative Neurology, 512(6), 798–813. https://doi.org/10.1002/cne.21922

Trent, S., Drew, C. J., Mitchell, P. J., & Bailey, S. J. (2009). Chronic treatment with 13-cis-retinoic acid changes aggressive behaviours in the resident-intruder paradigm in rats. European neuropsychopharmacology : the journal of the European College of Neuropsychopharmacology, 19(12), 876–886. https://doi.org/10.1016/j.euroneuro.2009.07.003

Trivedi, M. H., Rush, A. J., Wisniewski, S. R., Nierenberg, A. A., Warden, D., Ritz, L., ... Fava, M. (2006). Evaluation of outcomes with citalopram for depression

using measurement-based care in STAR*D: implications for clinical practice. *The American Journal of Psychiatry*, 163, 28–40. doi: 10.1176/appi.ajp.163.1.28.

Trotta, T., Porro, C., Calvello, R., and Panaro, M.A. (2014). Biological role of Toll-like receptor-4 in the brain. Journal of Neuroimmunology 268, 1-12.

Ueno, H., Takahashi, Y., Murakami, S., Wani, K., Matsumoto, Y., Okamoto, M., & Ishihara, T. (2022). Effect of simultaneous testing of two mice in the tail suspension test and forced swim test. Scientific Reports, 12(1), 9224. https://doi.org/10.1038/s41598-022-12986-9

Ullrich, A., & Schlessinger, J. (1990). Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. *Cell*, 61(2), 203–212. https://doi.org/10.1016/0092-8674(90)90801-K

Umschweif, G., Greengard, P., & Sagi, Y. (2021). The dentate gyrus in depression. *European Journal of Neuroscience*, 53(1), 39–64. https://doi.org/10.1111/ejn.14640.

Urvalek, A. M., & Gudas, L. J. (2014). Retinoic acid and histone deacetylases regulate epigenetic changes in embryonic stem cells. The Journal of biological chemistry, 289(28), 19519–19530. https://doi.org/10.1074/jbc.M114.556555

van Lier, D., Geven, C., Leijte, G. P., & Pickkers, P. (2019). Experimental human endotoxemia as a model of systemic inflammation. *Biochimie*, 159, 99–106. https://doi.org/10.1016/j.biochi.2018.06.014

Vaughan, D.W.,& Peters, A. (1974). Neuroglial cells in the cerebral cortex of rats from young adulthood to old age: An electron microscope study. *The Journal of Neurocytology,* 3, 405–429. https://doi.org/10.1007/BF01098730

Vearing, C.J. & Lackmann, M. (2005). "Eph receptor signalling; dimerisation just isn't enough". *Growth Factors (Chur, Switzerland).* **23,** 67-76.

Vereker, E., Campbell, V., Roche, E., McEntee, E., and Lynch, M.A. (2000). Lipopolysaccharide inhibits long term potentiation in the rat dentate gyrus by activating caspase-1. J Biol Chem 275, 26252-26258.

Verkhratsky, A., & Nedergaard, M. (2018). Physiology of astroglia. *Physiological Reviews*, 98(1), 239–389. https://doi.org/10.1152/physrev.00042.2016.

Vermot, J., & Pourquié, O. (2005). Retinoic acid coordinates somitogenesis and left-right patterning in vertebrate embryos. Nature, 435(7039), 215–220. https://doi.org/10.1038/nature03488

Vitkovic, L., Bockaert, J., & Jacque, C. (2001). Inflammatory cytokines. Journal of Neurochemistry, 74(2), 457–471. https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2000.740457.x.

Vollmayr, B., & Henn, F. A. (2001). Learned helplessness in the rat: improvements in validity and reliability. Brain research. Brain research protocols, 8(1), 1–7. https://doi.org/10.1016/s1385-299x(01)00067-8

Vollmayr, B., and Henn, F. A. (2001). Learned helplessness in the rat: improvements in validity and reliability. Brain Res. Protoc. 8, 1–7. doi: 10.1016/S1385-299X(01)00067-8

Vose, L., & Stanton, P. (2016). Synaptic plasticity, metaplasticity and depression. Current Neuropharmacology, 15(1), 71–86. https://doi.org/10.2174/1570159X14666160202121111.

Walf, A. A., and Frye, C. A. (2007). The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents. Nat. Protoc. 2, 322–328. doi: 10.1038/nprot.2007.44

Wang CC, Campbell S, Furner RL, Hill DL. Disposition of all-trans- and 13-cis-retinoic acids and n-hydroxyethylretinamide in mice after intravenous administration. Drug Metab Dispos. 1980 Jan-Feb;8(1):8-11. PMID: 6102031.

Wang, C., Zong, S., Cui, X., Wang, X., Wu, S., Wang, L., ... Lu, Z. (2023). The effects of microglia-associated neuroinflammation on Alzheimer's disease. *Frontiers in Immunology*, 14, 1117172. doi: 10.3389/fimmu.2023.1117172.

Wang, H. F., & Liu, F. C. (2005). Regulation of multiple dopamine signal transduction molecules by retinoids in the developing striatum. Neuroscience, 134(1), 97–105. https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2005.04.008

Wang, H. U., Chen, Z. F. & Anderson, D. J. (1998). Molecular distinction and angiogenic interaction between embryonic arteries and veins revealed by ephrin-B2 and its receptor Eph-B4. *Cell*, 93, 741–753.

Wang, H.-X., & Wang, Y.-P. (2016). Gut microbiota-brain axis. *Chinese Medical Journal*, 129(19), 2373–2380. PubMed. https://doi.org/10.4103/0366-6999.190667

Wang, J., Asensio, V.C., and Campbell, I.L. (2002). Cytokines and chemokines as mediators of protection and injury in the central nervous system assessed in transgenic mice. Current topics in microbiology and immunology 265, 23-48.

Wang, T. W., Zhang, H., & Parent, J. M. (2005). Retinoic acid regulates postnatal neurogenesis in the murine subventricular zone-olfactory bulb pathway. *Development*, 132(12), 2721-2732.

Webb, C. A., Weber, M., Mundy, E. A., & Killgore, W. D. S. (2014). Reduced gray matter volume in the anterior cingulate, orbitofrontal cortex and thalamus as a function of mild depressive symptoms: a voxel-based morphometric analysis. *Psychological Medicine*, 44(13), 2833–2843. https://doi.org/10.1017/S0033291714000348

Wesselingh, S. L., Power, C., Glass, J. D., Tyor, W. R., McArthur, J. C., Farber, J. M., Griffin, J. W., & Griffin, D. E. (1993). Intracerebral cytokine messenger RNA expression in acquired immunodeficiency syndrome dementia. *Annals of neurology*, 33(6), 576–582. https://doi.org/10.1002/ana.410330604

Wesselingh, S. L., Takahashi, K., Glass, J. D., McArthur, J. C., Griffin, J. W., & Griffin, D. E. (1997). Cellular localization of tumor necrosis factor mRNA in neurological tissue from HIV-infected patients by combined reverse transcriptase/polymerase chain reaction in situ hybridization and immunohistochemistry. *Journal of neuroimmunology*, 74(1-2), 1–8. https://doi.org/10.1016/s0165-5728(96)00160-9

Wiedermann, U., Hanson, L. A., Kahu, H., & Dahlgren, U. I. (1993). Aberrant T-cell function in vitro and impaired T-cell dependent antibody response in vivo in vitamin A-deficient rats. *Immunology*, 80(4), 581-586. PMID: 8307607; PMCID: PMC1422259.

Wietrzych, M., Meziane, H., Sutter, A., Ghyselinck, N., Chapman, P. F., Chambon, P., & Krezel, W. (2005). Working memory deficits in retinoid X receptor gamma-deficient mice. Learning & memory (Cold Spring Harbor, N.Y.), 12(3), 318–326. https://doi.org/10.1101/lm.89805.

Wilkinson, D. Multiple roles of eph receptors and ephrins in neural development. Nat Rev Neurosci 2, 155–164 (2001). https://doi.org/10.1038/35058515

Willner, P., & Mitchell, P. J. (2002). The validity of animal models of predisposition to depression. *Behavioural Pharmacology*, 13 (3), 169–188.

Willner, P., Muscat, R., & Papp, M. (1992). Chronic mild stress-induced anhedonia: a realistic animal model of depression. Neuroscience and biobehavioral reviews, 16(4), 525–534. https://doi.org/10.1016/s0149-7634(05)80194-0.

Wilson, L., Gale, E., Chambers, D., & Maden, M. (2004). Retinoic acid and the control of dorsoventral patterning in the avian spinal cord. Developmental Biology, 269(2), 433–446. https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2004.01.034

Workman, E. R., Niere, F., & Raab-Graham, K. F. (2018). Engaging homeostatic plasticity to treat depression. *Molecular Psychiatry*, 23(1), 26–35. https://doi.org/10.1038/mp.2017.225

Wu, B., De, S. K., Kulinich, A., Salem, A. F., Koeppen, J., Wang, R., Barile, E., Wang, S., Zhang, D., Ethell, I., & Pellecchia, M. (2017). Potent and Selective EphA4 Agonists for the Treatment of ALS. Cell chemical biology, 24(3), 293–305. https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2017.01.006

Wu, X.-R., Zhang, Y., Liu, X.-D., Han, W.-B., Xu, N.-J., & Sun, S. (2020). EphB2 mediates social isolation-induced memory forgetting. Translational Psychiatry, 10(1), 389. https://doi.org/10.1038/s41398-020-01051-6

Wu, Y., Wei, Z., Li, Y., Wei, C., Li, Y., Cheng, P., Xu, H., Li, Z., Guo, R., Qi, X., Jia, J., Jia, Y., Wang, W., & Gao, X. (2019). Perturbation of Ephrin Receptor Signaling and Glutamatergic Transmission in the Hypothalamus in Depression Using Proteomics Integrated With Metabolomics. Frontiers in neuroscience, 13, 1359. https://doi.org/10.3389/fnins.2019.01359

Xie, J., van Hoecke, L., & Vandenbroucke, R. E. (2022). The impact of systemic inflammation on Alzheimer's disease pathology. *Frontiers in Immunology*, 12, 796867. doi: 10.3389/fimmu.2021.796867.

Xu, Y., Sheng, H., Tang, Z., Lu, J., & Ni, X. (2015). Inflammation and increased IDO in hippocampus contribute to depression-like behavior induced by estrogen deficiency. *Behavioural Brain Research*, 288, 71-78. doi: 10.1016/j.bbr.2015.04.017.

Yadid, G., Nakash, R., Deri, I., Tamar, G., Kinor, N., Gispan, I., & Zangen, A. (2000). Elucidation of the neurobiology of depression: insights from a novel genetic animal model. Progress in neurobiology, 62(4), 353–378. https://doi.org/10.1016/s0301-0082(00)00018-6

Yang, H., and Chen, C. (2008). Cyclooxygenase-2 in synaptic signaling. Current Pharmaceutical Design 14, 1443-1451.

Yang, L. M., Hu, B., Xia, Y. H., Zhang, B. L., & Zhao, H. (2007). Lateral habenula lesions improve the behavioral response in depressed rats via increasing the serotonin level in dorsal raphe nucleus. *Behavioural Brain Research*, 188(1), 84-90.

Yeckel, M. F., & Berger, T. W. (1990). Feedforward excitation of the hippocampus by afferents from the entorhinal cortex: redefinition of the role of the trisynaptic pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87(15), 5832–5836. https://doi.org/10.1073/pnas.87.15.5832

Yee, A. X., Hsu, Y.-T., & Chen, L. (2017). A metaplasticity view of the interaction between homeostatic and Hebbian plasticity. *Philosophical Transactions of the*

Royal Society B: Biological Sciences, 372(1715), 20160155. https://doi.org/10.1098/rstb.2016.0155.

Yirmiya, R., Pollak, Y., Morag, M., Reichenberg, A., Barak, O., Avitsur, R., Shavit, Y., Ovadia, H., Weidenfeld, J., Morag, A., Newman, M. E., & Pollmächer, T. (2000). Illness, cytokines, and depression. Annals of the New York Academy of Sciences, 917, 478–487. https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2000.tb05412.x.

Yoshii, A., & Constantine-Paton, M. (2007). BDNF induces transport of PSD-95 to dendrites through PI3K- AKT signaling after NMDA receptor activation. *Nature Neuroscience*, 10(6), 702-711.

Yu Y, Sun B (2020). Autophagy-mediated regulation of neutrophils and clinical applications. Burns Trauma. Jan 16;8:tkz001. doi: 10.1093/burnst/tkz001. PMID: 32341923; PMCID: PMC7175771.

Zhang, J. C., Yao, W., Qu, Y., Nakamura, M., Dong, C., Yang, C., Ren, Q., Ma, M., Han, M., Shirayama, Y., Hayashi-Takagi, A., & Hashimoto, K. (2017). Increased EphA4-ephexin1 signaling in the medial prefrontal cortex plays a role in depression-like phenotype. Scientific reports, 7(1), 7133. https://doi.org/10.1038/s41598-017-07325-2

Zhang, J., Yao, W., Qu, Y., Nakamura, M., Dong, C., Yang, C., Ren, Q., Ma, M., Han, M., Shirayama, Y., Hayashi-Takagi, A., & Hashimoto, K. (2017). Increased EphA4-ephexin1 signaling in the medial prefrontal cortex plays a role in depression-like phenotype. Scientific Reports, 7(1), 7133. https://doi.org/10.1038/s41598-017-07325-2

Zhang, R. X., Han, Y., Chen, C., Xu, L. Z., Li, J. L., Chen, N., Sun, C. Y., Chen, W. H., Zhu, W. L., Shi, J., & Lu, L. (2019). Correction: EphB2 in the medial prefrontal cortex regulates vulnerability to stress. Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology, 44(7), 1339–1343. https://doi.org/10.1038/s41386-019-0364-1

Zhang, R.-X., Han, Y., Chen, C., Xu, L.-Z., Li, J.-L., Chen, N., Sun, C.-Y., Chen, W.-H., Zhu, W.-L., Shi, J., & Lu, L. (2016). EphB2 in the Medial Prefrontal Cortex Regulates Vulnerability to Stress. Neuropsychopharmacology, 41(10), 2541–2556. https://doi.org/10.1038/npp.2016.58

Zhang, Y., Chen, X., Gueydan, C., Han, J. (2018). Plasma membrane changes during programmed cell deaths. *Cell Research*, 28, 9–21. doi: 10.1038/cr.2017.133.

Zhanmu, O., Yang, X., Gong, H., & Li, X. (2020). Paraffin-embedding for large volume bio-tissue. *Scientific Reports*, 10(1), 12639. https://doi.org/10.1038/s41598-020-68876-5

Zhao, C., Deng, W., & Gage, F. H. (2008). Mechanisms and functional implications of adult neurogenesis. *Cell*, 132(4), 645-660. https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.01.033.

Zhao, J., Bi, W., Xiao, S., Lan, X., Cheng, X., Zhang, J., ... Zhu, L. (2019). Neuroinflammation induced by lipopolysaccharide causes cognitive impairment in mice. *Scientific Reports*, 9(1), 5790. https://doi.org/10.1038/s41598-019-42286-8

Zhao, Y., Pan, Y., Tang, M., & Lin, W. (2018). Blocking p38 Signaling Reduces the Activation of Pro-inflammatory Cytokines and the Phosphorylation of p38 in the Habenula and Reverses Depressive-Like Behaviors Induced by Neuroinflammation. Frontiers in Pharmacology, 9. https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00511.

Zhen, L., Shao, T., Luria, V., Li, G., Li, Z., Xu, Y., & Zhao, X. (2018). EphB2 Deficiency Induces Depression-Like Behaviors and Memory Impairment: Involvement of NMDA 2B Receptor Dependent Signaling. Frontiers in pharmacology, 9, 862. https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00862

Zhong Y, Zhang X, Hu X, Li Y (2018). Effects of Repeated Lipopolysaccharide Treatment on Growth Performance, Immune Organ Index, and Blood Parameters of Sprague-Dawley Rats. J Vet Res. Dec 10;62(3):341-346. doi: 10.2478/jvetres-2018-0048. PMID: 30584614; PMCID: PMC6295989.

Zilcha-Mano, S., Dinger, U., McCarthy, K. S., Barrett, M. S., & Barber, J. P. (2014). Changes in well-being and quality of life in a randomized trial comparing dynamic psychotherapy and pharmacotherapy for major depressive disorder. *Journal of Affective Disorders*, 152–154, 538–542. doi: 10.1016/j.jad.2013.10.015.

Ziv, Y., Ron, N., Butovsky, O., Landa, G., Sudai, E., Greenberg, N., Cohen, H., Kipnis, J., & Schwartz, M. (2006). Immune cells contribute to the maintenance of neurogenesis and spatial learning abilities in adulthood. Nature neuroscience, 9(2), 268–275. https://doi.org/10.1038/nn1629.

Zou, J. Y., & Crews, F.T. (2005). TNFα potentiates glutamate neurotoxicity by inhibiting glutamate uptake in organotypic brain slice cultures: neuroprotection by NFκB inhibition. *Brain Research*, 1034, 11–24.

Zunszain, P.A., Hepgul, N., & Pariante, C.M. (2013). Inflammation and depression. *Current Topics in Behavioral Neurosciences*, 14, 135-151. doi: 10.1007/7854_2012_211

Zweifach, B. W., & Janoff, A. (1965). Bacterial endotoxemia. *Annual Review of Medicine,* 16, 201-220.

7. SİMGELER VE KISALTMALAR

ADAM 10 : Disintegrin ve metalloproteinaz bölge-içeren protein 10

ADH : Alkol Dehidrojenaz

AFY : Akut Faz Yanıt

AMPAR : α-amino-3-hidroksi-5-metil-4-izoksazolepropiyonik Asit Reseptörü

AP-1 : Aktivatör Protein-1

APL : Akut Promiyelositik Lösemi

ATRA : All-Trans Retinoik Asit

BDNF : Brain Derived Neurotrophic Factor (Beyinden Kaynaklı Nörotrofik Faktör)

CA : Cornu Ammonis

Cg : Singulat Korteks

DCX : Doublecortin

DG : Dentat Girus

ECM : Ekstra Selüler (Cellular) Matrix

Eph : Ephrin Reseptörü

Eph A4 : Ephrin Reseptörü A4

Eph B2 : Ephrin Reseptörü B2

FN : Fibronektin

FST : Force Swim Test (Yüzme Testi)

GDP : Guanizin Difosfat

GEF : Guanin Değişim Faktörü

GFAP : Glial Fibriler Asidik Protein

GPI : Glikozilfosfatidilinositol

GTF : Guanizin Trifosfat

HIP : Hipokampüs

HPA : Hipotalamik Hipofizer Adrenal Aksis

Iba-1 : İyonize Kalsiyum Bağlayıcı Adaptör Molekül-1

IFN : Interferon

IL : İnterlökin

IL-1β : İnterlökin 1β

IL-6 : İnterlökin 6

KBB : Kan Beyin Bariyeri

LBD : Ligand Bağlanma Alanı

LPS : Lipopolisakkarid

LTD : Long Term Depression

LTP : Long Term Potentation

MAOI : Monoamin Oksidaz İnhibitörü

MDB : Major Depresif Bozukluk

MMP-9 : Matrix Metalloproteinaz-9

MSS : Merkezi Sinir Sistemi

NAc : Nükleus Accumbens

NF-κB : Nükleer Faktör Kappa B

NGF : Neuron Growth Factor (Beyin Büyüme Faktörü)

NMDAR : N-Metil-D-Aspartat Reseptörü

NT : Nörotrofin

PAMP : Patojenle İlişkili Moleküler Proteinler

PDZ : Primer Desidüel Zone

PET : Pozitron Emisyon Tomografisi

PFC : Prefrontal Korteks

PGE : Prostoglandin

PRR : Pattern Recognition Receptor (Motif-Tanıma Reseptörleri)

RA : Retinoik Asit

RALDH : Retinaldehit Dehidrojenaz

RAR : Retinoik Asit Reseptör

RBP : Retinol Bağlayıcı Protein

RTK : Reseptör Tirozin Kinaz

RXR : Retinoik X Reseptör

SGZ : Subgranüler Zon

STRA : Stimulating Trans Retinoic Acid

SVZ : Subventriküler Zon

TLR : Toll Like Reseptör

TNF-α : Tümör Nekroz Faktör Alfa

TNFR1 : Tümör Nekroz Faktör Alfa Reseptör-1

TNFR2 : Tümör Nekroz Faktör Alfa Reseptör-2

TST : Tail Suspantion Test (Kuyruk Süspansiyon Testi)

8. EKLER

KULLANILAN SOLÜSYONLARIN VE BOYALARIN HAZIRLANIŞI EK 1.

PBS (Sorenson'un Fosfat Tamponu)

İki farklı solüsyon, Solüsyon A ve Solüsyon B hazırlanır.

1000 ml Solüsyon A için:

[Na2HPO412H2O (0,13 M), (Merck)] 46,54 gr tartılarak, 1000 ml dH2O içerisinde çözdürülür. Not: Solüsyon A her zaman taze hazırlanır.

1000 ml Solüsyon B için:

[KH2PO4 (0,13 M), (Merck)] 17,68 gr tartılarak, 1000 ml dH2O içerisinde çözdürülür. Bu solüsyon + 4 ^{o}C'de saklanarak stok solüsyon olarak kullanılabilir.

Taze hazırlanan Solüsyon A üzerine solüsyon B eklenerek pH 7,4'e ayarlanır.

PBS-T Tamponu (%0.5lik Triton-X100)

İki farklı solüsyon, Solüsyon A ve Solüsyon B hazırlanır.

1000 ml Solüsyon A için:

[Na2HPO412H2O (0,13 M), (Merck)] 46,54 gr tartılarak, 1000 ml dH2O içerisinde çözdürülür. Not: Solüsyon A her zaman taze hazırlanır.

1000 ml Solüsyon B için:

[KH2PO4 (0,13 M), (Merck)] 17,68 gr tartılarak, 1000 ml dH2O içerisinde çözdürülür. Bu solüsyon + 4 ^{o}C'de saklanarak stok solüsyon olarak kullanılabilir.

Taze hazırlanan Solüsyon A'nın üzerine 500 µl Triton-X100 eklenerek karıştırıldıktan sonra, üzerine solüsyon B eklendikten sonra pH 7,4'e ayarlanır.

%4'lük Paraformaldehit (PFA)

1000 ml %4' lük PFA solüsyonu için:

40 gram toz haldeki paraformaldehit 200 ml dH2O içerisinde ısıtılarak ve manyetik karıştırıcı kullanılarak çözdürülür. Solüsyonun sıcaklığı 58 ^{o}C'de olduğunda ısıtma işlemi sonlandırılır ve çözelti berraklaşana kadar NaOH eklenerek karıştırılır. Solüsyon filtre edildikten sonra PBS ile 1000 ml'e tamamlanır. Elde edilen fiksatifin pH değeri 7,4 olacak şekilde NaOH veya HCl kullanılarak ayarlanır.

Not: Taze hazırlanmalıdır.

%10'luk At Serumu +%0,2 Triton-X100

1000 ml %10'luk blocking serum için:

Ticari olarak temin edilen inaktive formdaki 100 ml normal at serumu sıcak su banyosunda bekletilerek 37°C °C'de getirilir. Isıtılan serumun içerisine %0,2 Triton–X100 ve %0,1 sodyum azid eklenerek homojenize edilen karışıma yaklaşık 900 ml PBS tamponu da eklenerek1000 ml'e tamamlanır.

Not: Hazırlanan %10'luk At Serumu +4 °C'de saklanır.

Sodyum Sitrat Tamponu

1000 ml tampon için:

17,85 gr Trinatrium sitrat pentahidrat 1000 ml dH2O su içinde çözdürülür, HCl yardımıyla pH 6,0 'ya ayarlanır.

%3'lük Hidrojen Peroksit

10 ml solüsyon için:

9 ml PBS tampon içerisinde 1 ml %30'luk H2O2 karıştırılarak hazırlanır.

Krezil Viyole

100 ml boyama solüsyonu için:

0.5 gram toz halindeki krezil viyole, 100 ml dH2O çözdürüldükten sonra filtre kağıdıyla süzdürülür.

Sodyum Asetat Tamponu

100 ml solüsyon için:

1.36 gram Sodium acetate, trihydrate (MW 136.1) 100 dH2O içinde çözdürülür, glacial asetik asit ile pH 4,2 ye ayarlanır.

Metyl Green

100 ml boyama solüsyonu için:

0.5 gram toz halindeki Metyl green, 100 ml pH 4,2'lik sodyum asetat tamponunda çözdürüldükten sonra filtre kağıdıyla süzdürülür.

ETİK ONAY BELGESİ EK 2.

T.C.
BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU
Görükle Yerleşkesi, 16059 Nilüfer/ BURSA-TÜRKİYE
ARAŞTIRMA BAŞVURUSU ONAYI

BAŞVURU BİLGİLERİ	ARAŞTIRMANIN ADI	*Sıçanlarda Deneysel Sistemik İnflamasyonda All-Trans Retinoik Asit (ATRA)'in Hipokampustaki Etkilerinin EphA4 ve EphB2 Ekspresyonu ile Araştırılması*
	PROJE YÜRÜTÜCÜSÜ KURUMU	Prof. Dr. Semiha ERSOY BUÜ Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji AD
	YARDIMCI ARAŞTIRICILAR	Doktr. Öğr. Senem Esin YAVAŞ
	ARAŞTIRMANIN NİTELİĞİ	Senem Esin YAVAŞ'ın Doktora Tez Projesi
	ARAŞTIRMANIN SÜRESİ	20.11.2023 – 20.05.2024
	KULLANILACAK HAYVAN TÜRÜ VE SAYISI	62 Adet Dişi Sıçan

	Belge Adı	Tarihi
DEĞERLENDİRİLEN İLGİLİ BELGELER	ARAŞTIRMA BAŞVURU FORMU	02.11.2023

KARAR BİLGİLERİ	**Karar No : 2023 - 12 / 09** **Tarih: 07.11.2023** Yukarıda başvuru bilgileri verilen araştırma projesi gerekçe, amaç ve yöntemler dikkate alınarak görüşüldü ve ilgili belgeler incelendi. Projenin etik açıdan uygun olduğuna, çalışmanın aşağıdaki hususlar dikkate alınarak yürütülmesine ve sorumlu araştırıcıya iletilmesine oy birliği/oy çokluğu ile karar verildi. 1) Projede herhangi bir değişiklik gerektiğinde kurulumuzdan onay alınması, 2) Projede çalışacağı bildirilen araştırıcılarda değişiklik olduğunda kurulumuzdan onay alınması, 3) Deney hayvanları üzerinde yapılacak girişimin başlangıç ve bitiş tarihinin bildirilmesi, 4) Çalışma süresinde tamamlanamaz ise ek süre talebinde bulunulması, 5) Çalışma tamamlandığında sonuç raporunun gönderilmesi.

ÜYELER

Unvanı / Adı / Soyadı EK Üyeliği	Uzmanlık Dalı	Kurumu	İlişki (*)	İmza		Düşünceler
				Kabul	Ret	
Prof. Dr. Gökhan GÖKTALAY Başkan	Tıp- Farmakoloji	Tıp Fakültesi	☐ E ■ H			
Dr.Öğr. Üyesi Sezer ERER KAFA Üye	Tıp - Tıp Tarihi ve Etik	Tıp Fakültesi	☐ E ■ H			
Dr.Öğr. Üyesi Diğdem YÖYEN ERMİŞ Üye	Tıp- İmmunoloji	Tıp Fakültesi	☐ E ■ H			
Prof. Dr. Veli Yılgör ÇIRAK Üye	Veteriner-Parazitoloji	Veteriner Fakültesi	☐ E ■ H			
Prof. Dr. Özgür ÖZYİĞİT Üye	Veteriner-Patoloji	Veteriner Fakültesi	☐ E ■ H			
Doç. Dr. Arda SÖZCÜ Üye	Ziraat- Zootekni	Ziraat Fakültesi	☐ E ■ H			
Prof. Dr. Nilüfer ÇİNKILIÇ Üye	Fen Edebiyat - Biyoloji	Fen Edebiyat Fakültesi	☐ E ■ H			
Nedim SÖNMEZ Üye	Sivil Toplum Kuruluş Üyesi	Emekli	☐ E ■ H			
Filiz TORUN Üye	Sivil Üye	Emekli	☐ E ■ H			
Faruk KÜÇÜKYILDIZ Üye	Veteriner Hekim	BUÜ-DENHAB	☐ E ■ H			

9. TEŞEKKÜR

Tez çalışmamın planlanlanması, düzenlenmesinde ve sonuçlarının yorumlanmasındaki destekleri için, hem eğitim hem de özel hayatımda desteklerini ve bilgilerini benden esirgemeyen, bütün özverisi ve inancıyla yanımda olan ve bana güç veren, danışman hocam Prof. Dr. Semiha ERSOY'a,

Doktora eğitimimin ders aşamasındaki katkılarının dışında her zaman bilgi ve tecrübelerini benden sakınmayan, tez çalışmamın her aşamasındaki katkılarından dolayı değerli hocalarıma, başta Anabilim Dalı başkanımız Prof. Dr. Özhan EYİGÖR'e, Anabilim Dalımızın öğretim üyesi ve aynı zamanda tez izleme komitemde de yer alan Prof. Dr. Zehra MİNBAY'a, Prof. Dr. Berrin AVCI'ya, Dr. Öğr. Üyesi Duygu GÖK YURTSEVEN'e ve Dr. Öğr. Üyesi Sema SERTER KOÇOĞLU'na,

Doktora eğitimi sürecimin bir kısmında bilgilerinden yararlanabildiğim Anabilim Dalımızın değerli emekli hocaları, Prof. Dr. Zeynep KAHVECİ ve Prof. Dr. İlkin ÇAVUŞOĞLU'na,

Bursa Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalının personeli olan tüm arkadaşlarıma, en başta tezimin deney aşamasındaki desteklerinden dolayı doktora öğrencisi Uzm. Bio. Seda IŞIKLAR'a ve desteğini hep yanımda hissettiğim ve çok değer verdiğim Uzm. Bio. Ayşe AKBAŞ'a, Arş. Grv. Dr. Doruk BAŞAR ve canım arkadaşım yüksek lisans öğrencisi Çiğdem USTA'ya,

Bilgi ve tecrübelerini benden esirgemeyen Tıp Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalı hocalarından öncelikle tez izleme komitemde de olan Prof. Dr. Mehmet CANSEV'e, davranış laboratuvarlarını bize açan Prof. Dr. Gökhan GÖKTALAY'a ve Arş. Grv. Cansu KOÇ'a, Bursa Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Ahmet AKKOÇ'a ve tüm Veteriner Patoloji ailesine, ayrıca, Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Dr. Öğr. Üyesi Ayşen ÇAKIR'a,

Eğitimim sürecinde kolaylıkla ulaşabildiğim, Bursa Uludağ Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü personeline ve başta sorumlu Vet. Hek. Faruk KÜÇÜKYILDIZ ve DEHYUAM'nin tüm personeline, Tez araştırmamın gerçekleştirilebilmesi için desteklerinden dolayı Bursa Uludağ Üniversitesi BAP Birimine,

Manevi desteğinin yanı sıra özellikle deneylerimin gerçekleştirilmesinde ve tez çalışma sürecimin her aşamasında yanımda olan, bu hayattaki en büyük destekçim, aynı zamanda Uludağ Üniversite Veteriner Fakültesi Patoloji Anabilim Dalında doktora sonrası araştırmacısı olan eşim Dr. Özkan YAVAŞ'a ve en büyük varlığım canım kızım Melisa YAVAŞ'a,

Hayatımın her aşamasında yanımda olan, bana sonsuz güvenen ve destekleyen aileme ve fikirleri benim için çok kıymetli olan canım ablam Vet. Hek. Elif Rana YILDIZ'a

Sonsuz teşekkür ve saygılarımı sunuyorum.

Bu tezi beni ben yapan kişilere: Biricik kızım Melisa YAVAŞ ve canım eşim Özkan YAVAŞ'a, beni yetiştiren ve bu günlere getiren aileme ve danışman hocama ithaf ediyorum; beni hayal edebileceğimden daha iyi ve daha güçlü yaptınız.

10. ÖZGEÇMİŞ

Lise eğitimini Çatalca Anadolu Lisesinde tamamladı. 2016 yılında, Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesinden, "Küçük Hayvan Hekimi" sertifikasıyla mezun oldu. Bursa Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji anabilim dalında doktora programına, YÖK 100/2000 "Moleküler Patoloji" öncelikli alan bursiyeri olarak başladı. Doktora programının tez döneminde, TÜBİTAK BİDEB 2218 yurtiçi doktora sonrası programını kazandı. Evli ve bir kız çocuk annesidir.

Bilimsel ve Mesleki Kuruluşlara Üyelikleri:

Türk Histoloji ve Embriyoloji Derneği, üye (2017-halen)