



**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ**



**KRONİK ARALIKLI SOĞUK STRESİN PERİPUBERTAL
DÖNEMDEKİ SIÇANLARIN BEYNİNDE KORTİZOL
ARACILI OKSİDATİF STRES, İNFLAMASYON VE
ANKSİYODEPRESİF BENZERİ DAVRANIŞLARA ETKİSİ**

Dr. Merve Deniz DEĞİRMENCİ

**FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI
TIPTA UZMANLIK TEZİ**

**DANIŞMAN
Dr. Öğr. Üyesi Emel GÜNEŞ**

ANKARA

2021

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ**

**KRONİK ARALIKLI SOĞUK STRESİN PERİPUBERTAL
DÖNEMDEKİ SIÇANLARIN BEYNİNDE KORTİZOL
ARACILI OKSİDATİF STRES, İNFLAMASYON VE
ANKSİYODEPRESİF BENZERİ DAVRANIŞLARA ETKİSİ**

Dr. Merve Deniz DEĞİRMENCİ

**FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI
TIPTA UZMANLIK TEZİ**

**DANIŞMAN
Dr. Öğr. Üyesi Emel GÜNEŞ**

**Bu araştırma Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Müdürlüğü' nün
21L0230005 proje numarası ile desteklenmiştir.**

ANKARA

2021

Ankara Üniversitesi
Tıp Fakóltesi Dekanlığı' na,

Tıpta Uzmanlık Tezi olarak hazırlayıp sunduğum “KRONİK ARALIKLI SOĞUK STRESİN PERİPUBERTAL DÖNEMDEKİ SIÇANLARIN BEYNİNDE KORTİZOL ARACILI OKSİDATİF STRES, İNFLAMASYON VE ANKSİYODEPRESİF BENZERİ DAVRANIŞLARA ETKİSİ” başlıklı tez; bilimsel ahlak ve değere uygun olarak tarafımdan yazılmıştır. Tezimin fikir/hipotezi tümüyle tez danışmanım ve bana aittir. Tezde yer alan araştırma tarafımda yapılmış olup, tüm cümleler, yorumlar bana aittir.

Bu tez çalışmasıyla ilgili tüm süreçler Ankara Üniversitesi Rektörlüğü Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından, 22/07/2020 tarihinde, 2020-13-116 numaralı kararla onaylanmıştır.

Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı: Merve Deniz DEĞİRMENCİ

Tarih: 23.08.2021

İmza:

ÖZGÜNLÜK RAPORU

Uzmanlık tezi

Yazar Merve Deniz Değirmenci

Gönderim Tarihi: 12-Ağu-2021 03:15PM (UTC+0300)

Gönderim Numarası: 1630603492

Dosya adı: tez_yaz_m_12.08.2021_1.docx (8.59M)

Kelime sayısı: 29703

Karakter sayısı: 197980

Uzmanlık tezi

ORJİNALLİK RAPORU

%**6**

BENZERLİK ENDEKSİ

%**4**

İNTERNET KAYNAKLARI

%**2**

YAYINLAR

%**3**

ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

KABUL ONAY SAYFASI

ANKARA ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ TEZ SINAVI TUTANAĞI

I. UZMANLIK ÖĞRENCİSİNİN	
Adı, Soyadı: Merve Deniz DEĞİRMENCİ	Sınav tarihi: 23 / 08 / 2021
Anabilim/Bilim Dalı: Fizyoloji Anabilim Dalı	
Tez Danışmanı: Dr. Öğr. Üyesi Emel GÜNEŞ	

II. TEZ İLE İLGİLİ BİLGİLER
Tezin Başlığı: KRONİK ARALIKLI SOĞUK STRESİN PERİPUBERTAL DÖNEMDEKİ SIÇANLARIN BEYNİNDE KORTİZOL ARACILI OKSİDATİF STRES, İNFLAMASYON VE ANKSİYODEPRESİF BENZERİ DAVRANIŞLARA ETKİSİ
Tezin Niteliği: ☒ Ana Dal Uzmanlık Tezi ☐ Yan Dal Uzmanlık Tezi
Kaçıncı tez sınavı olduğu: ☐ 1 ☒ 2 ☐ 3

III. KARAR
Yapılan tez sınavı sonucunda yukarıda belirtilen tezin “Tıpta Uzmanlık Tezi” olarak ☒ Kabulüne ☐ Reddine ☐ Düzeltmeler yapıldıktan sonra tekrar değerlendirilmesine ☒ Oy birliği ☐ Oy çokluğu ile karar verilmiştir.

IV. AÇIKLAMALAR
<i>Lütfen, tezin reddi veya düzeltme istenmesi durumunda gerekçeli açıklamalarınızı buraya yazınız.</i>

Jüri Başkanı

Prof. Dr. Metehan ÇİÇEK
Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi
Fizyoloji Anabilim Dalı

Jüri Üyesi

Dr. Öğr. Üyesi Emel GÜNEŞ
Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi
Fizyoloji Anabilim Dalı

Jüri Üyesi

Doç. Dr. Bilge PEHLİVANOĞLU
Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi
Fizyoloji Anabilim Dalı

ÖNSÖZ

Stres, çevresel etkilerin organizmanın uyum kapasitesini zorlayarak biyolojik değişikliklere neden olduğu bir süreçtir. Stres, günlük hayatımızı etkilediği gibi pek çok hastalığın patofizyolojisinde yer alır. Anksiyete bozuklukları ve depresyon gibi psikiyatrik hastalıklarla ilişkilidir. Bu çalışmada deney hayvanlarında stres modeli oluşturularak stresin beyinde yol açabileceği sonuçların gösterilmesi amaçlanmıştır. Bu araştırma Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Müdürlüğü'nün 21L0230005 proje numarası ile desteklenmiştir.

Tezimin danışmanlığını üstlenen, bilgi ve tecrübelerini bana aktaran, her zaman destekleyici ve akademik gelişimime yardımcı olan değerli hocam Emel Güneş'e çok teşekkür ederim.

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı'nda uzmanlık eğitimime katkıda bulunan ve laboratuvar imkânları sunan değerli hocam Metin Baştuğ'a ve tüm değerli hocalarıma çok teşekkür ederim.

Psikiyatrik hastalıklarda hayvan modelleri üzerine olan tecrübesiyle tez çalışmamın başından sonuna kadar destekleyen Hasan Çalışkan'a çok teşekkür ederim.

Verilerimin analizinde bana yardımcı olan ve her zaman destekleyen sevgili eşim Sinan Değirmenci'ye ve aileme çok teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

ETİK BEYAN	ii
ÖZGÜNLÜK RAPORU	iii
KABUL ONAY SAYFASI	iv
ÖNSÖZ	v
İÇİNDEKİLER	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
TABLolar DİZİNİ	xiv
1. TÜRKÇE ÖZET	1
2. ABSTRACT	2
3. GİRİŞ VE AMAÇ	3
4. GENEL BİLGİLER	5
4.1. Stres	5
4.2. Deneysel Stres Modelleri	9
4.3. Anksiyete ve Nörobiyolojisi	13
4.4. Oksidatif Stres ve Beyinde Etkileri	17
4.5. Stres Modellerinde Anksiyete	17
4.6. Depresyon ve Nörobiyolojisi	19
4.7. Stres Modellerinde Depresyon	21
5. GEREÇ VE YÖNTEM	25
5.1. Deney Hayvanları	25
5.2. Stres Modeli	25
5.3. Davranış Testleri	26
5.4. Hematolojik Parametreler	31
5.5. Beyin Doku Örneklerinde Moleküler Testler	31
5.6. İstatistiksel Yöntemler	36
6. BULGULAR	37
6.1. Açık Alan Testi Bulguları	37
6.2. Yükseltilmiş Artı Labirent Test Bulguları	43
6.3. Aydınlik Karanlık Kutusu Testi	48
6.4. Şeker Seçim Testi	49
6.5. Zorunlu Yüzme Testi	50
6.6. Hemogram Testi	53
6.7. Moleküler Bulgular	54
6.8. Moleküler Ölçümler ve Davranış Testleri Arasında Korelasyon	68
7. TARTIŞMA	72

7.1. Açık Alan Testi Bulgularının Değerlendirilmesi	73
7.2. Yükseltilmiş Artı Labirent Bulgularının Değerlendirilmesi	74
7.3. Aydınlık Karanlık Kutusu Bulgularının Değerlendirilmesi	76
7.4. Şeker Seçim Testi Bulgularının Değerlendirilmesi	76
7.5. Zorunlu Yüzme Testi Bulgularının Değerlendirilmesi	77
7.6. Hemogram Testi Bulgularının Değerlendirilmesi	79
7.7. BDNF Bulgularının Değerlendirilmesi	81
7.8. Kortizol Bulgularının Değerlendirilmesi	84
7.9. İnflamasyon Bulgularının Değerlendirilmesi	86
7.10. Oksidatif Stres Bulgularının Değerlendirilmesi	88
8. SONUÇ VE ÖNERİLER	91
9. KAYNAKLAR	94



SİMGELER VE KISALTMALAR

ACTH	: Adrenokortikotropik hormon
AAT	: Açık alan testi
AKK	: Aydınlık karanlık kutusu
BDNF	: Beyin kaynaklı nörotrofik faktör
CRH	: Kortikotropin salgılatıcı hormon
CRP	: C reaktif protein
DSG	: Doğum sonrası gün
GABA	: γ -amino-bütirik asit
GR	: Glukokortikoid reseptör
HPA	: Hipotalamus hipofiz adrenal
IL-1β	: İnterlökin-1 beta
KASS	: Kronik aralıklı soğuk stres
MDB	: Major depresif bozukluk
OSI	: Oksidatif stres indeksi
PFK	: Prefrontal korteks
ROS	: Reaktif oksijen ürünleri
SD	: Sprague-Dawley
SEM	: Ortalamanın standart hatası
ŞST	: Şeker seçim testi
TAS	: Total antioksidan durum
TOS	: Total oksidan durum
TNF-α	: Tümör nekroz faktör alfa
YAL	: Yükseltilmiş artı labirent
ZYT	: Zorunlu yüzme testi

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 4.1. Akut stres cevabı yolakları. (Antoun ve ark., 2017) kaynağından dilimize uyarlanmıştır (7).	6
Şekil 4.2. Glukokortikoid reseptörlerinin beyinde yoğun olarak bulunduğu yerler gösterilmiştir. (McEwen ve ark., 2015) kaynağındaki bilgiler derlenerek çizilmiştir (13).	8
Şekil 4.3. Akut ve kronik stresin beyindeki etkileri. Stres ve glukokortikoid sisteminin düzgün işlemesi öğrenme, bellek ve duygudurum düzenlenmesi gibi normal beyin fonksiyonları açısından oldukça önemlidir ancak bu sistemin artmış ve uzamış aktivasyonu hastalıklara yol açabilir (Gray ve ark., 2017) kaynağından dilimize uyarlanmıştır (14).	9
Şekil 4.4. Hayvanlarda strese neden olmak için kullanılan akut ve kronik stres modelleri. (Jaggi ve ark., 2011) kaynağından dilimize uyarlanmıştır (17).	10
Şekil 4.5. Türkiye Ruh Sağlığı Profili-1 çalışmasına göre son bir yıldaki depresyon ve anksiyete bozuklukları tanılarının cinsiyete göre dağılımı (35).	13
Şekil 4.6. Limbik sistem bileşenleri insular korteks, singulat korteks, orbital frontal korteks, hipokampus, amigdala gibi beyin yapılarını içermektedir. (A) Korteksin lateral görünümü. (B) Orta hattan sagittal kesit. NAc, nukleus accumbens; OFC, orbital frontal korteks; PAG, periaquaduktal gri; VTA, ventral tegmental area. (Martin ve ark., 2009) kaynağından uyarlanmıştır (36).	15
Şekil 4.7. HPA aksı. Amigdala HPA aks aktivitesini artırırken, hipokampus baskılamaktadır. (Martin ve ark., 2009) kaynağından uyarlanmıştır (36). Siyah çizgi inhibisyon bağlantısı; noktalı çizgi uyarıcı bağlantı; noktalar ve kısa çizgiler dolaylı yoldan inhibisyon bağlantısını göstermektedir.	16
Şekil 5.1. Deney protokolü şeması, ZYT: Zorunlu yüzme testi, MGT: misket gömme testi, AAT: Açık alan testi, YAL: Yükseltilmiş artı labirent, AKK: aydınlık karanlık kutusu, ŞST: Şeker seçim testi, DSG: doğum sonrası gün.	26
Şekil 5.2. Açık alan test düzeneği.	27
Şekil 5.3. Yükseltilmiş artı labirent deney düzeneği.	29

Şekil 5.4. Beyin doku örneklerinin diseksiyonu.....	31
Şekil 6.1. Açık alan testinde kontrol ve kronik aralıklı soğuk stres gruplarında iki ayak üzerine kalkma davranışının incelenmesi, (A) toplam iki ayak üzerine kalkma davranış sayıları, (B) destek almadan iki ayak üzerine kalkma sayısı, (C) destekli olarak iki ayak üzerine kalkma sayısı, (D) iki ayak üzerine kalkana kadar geçen süre. A, C ve D için grafik değerleri ortalama $\pm$ SEM $*p<0,05$ şeklinde, B için grafik değerleri median ve interquartile range $*p<0,05$ şeklinde verilmiştir. KASS: kronik aralıklı soğuk stres grubu.....	38
Şekil 6.2. Açık alan testinde sıçanın destekli olarak iki ayak üzerine kalkma davranışı.	39
Şekil 6.3. Açık alan testinde kontrol ve soğuk stres gruplarında sıçanların (A) toplam katedilen mesafe parametresinin karşılaştırılması, (B) ortalama hız parametresinin karşılaştırılması, grafik değerleri ortalama $\pm$ SEM $*p<0,05$ şeklinde verilmiştir.	40
Şekil 6.4. Açık alan testinde kontrol ve soğuk stres gruplarında sıçanların (A) merkezde geçirilen süre, (B) periferde geçirilen sürelerinin karşılaştırılması, grafik değerleri ortalama $\pm$ SEM $*p<0,05$ şeklinde verilmiştir.....	41
Şekil 6.5. Açık alan testinde sıçanın perifer bölgede hareketsiz kalma davranışı.....	41
Şekil 6.6. Açık alan testinde kontrol ve soğuk stres gruplarında sıçanların merkez bölgeye girme sayılarının karşılaştırılması, grafik değerleri ortalama $\pm$ SEM $*p<0,05$ şeklinde verilmiştir.	42
Şekil 6.7. Açık alan testinde kontrol ve soğuk stres gruplarında sıçanların (A) merkezi ilk terketme süresi, (B) merkez bölgeye tekrar girme süresi, grafik değerleri ortalama $\pm$ SEM $*p<0,05$ şeklinde verilmiştir.....	43
Şekil 6.8. Yükseltilmiş artı labirent testinde kontrol ve soğuk stres gruplarında sıçanların (A) açık kolda geçirilen süre, (B) kapalı kolda geçirilen süre, grafik değerleri ortalama $\pm$ SEM $*p<0,05$ şeklinde verilmiştir.....	44
Şekil 6.9. Yükseltilmiş artı labirent testinde sıçanın açık kolda gözlenmesi.	44
Şekil 6.10. Yükseltilmiş artı labirent testinde kontrol ve soğuk stres gruplarında sıçanların (A) toplam açık ve kapalı kol geçiş sayısı, (B) açık kola girme sayısı, A için grafik değerleri ortalama $\pm$ SEM $*p<0,05$ şeklinde, B için grafik değerleri median ve interquartil range $*p<0,05$ şeklinde verilmiştir.....	45

Şekil 6.11. Yükseltilmiş artı labirent testinde kontrol ve soğuk stres gruplarında sıçanların açık kolu ilk terketme süresi, grafik değerleri ortalama $\pm$ SEM * $p<0,05$ şeklinde verilmiştir.	46
Şekil 6.12. Yükseltilmiş artı labirent testinde kontrol ve soğuk stres gruplarında sıçanların (A) araştırma amaçlı aşağı bakma davranışı, (B) strese bağlı gergin duruş sayısı, grafik değerleri ortalama $\pm$ SEM * $p<0,05$ ** $p<0,001$ şeklinde verilmiştir.	47
Şekil 6.13. Yükseltilmiş artı labirent testinde kontrol ve soğuk stres gruplarında sıçanların anksiyete indeksi, grafik değerleri ortalama $\pm$ SEM * $p<0,05$ şeklinde verilmiştir.	47
Şekil 6.14. Aydınlik karanlık kutusu testinde kontrol ve soğuk stres gruplarında sıçanların (A) aydınlık alanda geçirilen süre, (B) karanlık alanda geçirilen süre, grafik değerleri ortalama $\pm$ SEM * $p<0,05$ şeklinde verilmiştir.	48
Şekil 6.15. Aydınlik karanlık kutusu testinde kontrol ve soğuk stres gruplarında sıçanların aydınlık karanlık geçiş sayısı, grafik değerleri ortalama $\pm$ SEM şeklinde verilmiştir.	49
Şekil 6.16. Şeker seçim testinde kontrol ve soğuk stres gruplarında sıçanların günlük takipte sükrözlu su tüketim oranı.	49
Şekil 6.17. Zorunlu yüzme testinde kontrol ve soğuk stres gruplarında sıçanların (A) yüzme süresi, (B) tırmanma süresi, (C) hareketsiz kalma süresi, (D) toplam hareketlilik süresi, grafik değerleri ortalama $\pm$ SEM * $p<0,05$ şeklinde verilmiştir.	51
Şekil 6.18. Zorunlu yüzme testinde kontrol ve soğuk stres gruplarında sıçanların ilk hareketsizliğe geçiş süresi, grafik değerleri ortalama $\pm$ SEM * $p<0,05$ şeklinde verilmiştir.	52
Şekil 6.19. Zorunlu yüzme testinde sıçanların (A) tırmanma davranışı, (B) suyun üzerinde hareketsiz kalma davranışı bulguları.	52
Şekil 6.20. Kontrol ve soğuk stres gruplarında sıçanların eritrosit dağılım genişliği (RDW), grafik değerleri ortalama $\pm$ SEM * $p<0,05$ şeklinde verilmiştir.	53
Şekil 6.21. Kontrol ve soğuk stres gruplarında nötrofil lenfosit oranları, grafik değerleri ortalama $\pm$ SEM şeklinde verilmiştir.	54
Şekil 6.22. Kontrol ve soğuk stres gruplarında sıçanların serum kortizol düzeyi, grafik değerleri ortalama $\pm$ SEM * $p<0,05$ şeklinde verilmiştir.	55

Şekil 6.23. Kontrol ve soğuk stres gruplarında sıçanların (A) hipokampus, (B) prefrontal korteks, (C) striatum, (D) talamus kortizol düzeyleri, grafik değerleri ortalama $\pm$ SEM * $p<0,05$ şeklinde verilmiştir.....	56
Şekil 6.24. Kontrol ve soğuk stres gruplarında sıçanların (A) hipokampus, (B) prefrontal korteks, (C) striatum, (D) talamus IL-1 β düzeyleri, grafik değerleri ortalama $\pm$ SEM * $p<0,05$ şeklinde verilmiştir.....	57
Şekil 6.25. Kontrol ve soğuk stres gruplarında sıçanların (A) hipokampus, (B) prefrontal korteks, (C) striatum, (D) talamus TNF- α düzeyleri, grafik değerleri ortalama $\pm$ SEM * $p<0,05$ şeklinde verilmiştir.....	58
Şekil 6.26. Kontrol ve soğuk stres gruplarında sıçanların (A) hipokampus, (B) prefrontal korteks, (C) striatum, (D) talamus ROS düzeyleri, grafik değerleri ortalama $\pm$ SEM * $p<0,05$ şeklinde verilmiştir.....	60
Şekil 6.27. Kontrol ve soğuk stres gruplarında sıçanların (A) hipokampus, (B) prefrontal korteks, (C) striatum, (D) talamus MDA düzeyleri, grafik değerleri ortalama $\pm$ SEM * $p<0,05$ şeklinde verilmiştir.....	61
Şekil 6.28. Kontrol ve soğuk stres gruplarında sıçanların (A) hipokampus, (B) prefrontal korteks, (C) striatum, (D) talamus protein karbonil (PK) düzeyleri, grafik değerleri ortalama $\pm$ SEM * $p<0,05$ şeklinde verilmiştir.....	62
Şekil 6.29. Kontrol ve soğuk stres gruplarında sıçanların (A) hipokampus, (B) prefrontal korteks, (C) striatum, (D) talamus total antioksidan seviyeleri (TAS), grafik değerleri ortalama $\pm$ SEM * $p<0,05$ şeklinde verilmiştir.....	63
Şekil 6.30. Kontrol ve soğuk stres gruplarında sıçanların (A) hipokampus, (B) prefrontal korteks, (C) striatum, (D) talamus total oksidan seviyeleri (TOS), grafik değerleri ortalama $\pm$ SEM * $p<0,05$ şeklinde verilmiştir.....	65
Şekil 6.31. Kontrol ve soğuk stres gruplarında sıçanların (A) hipokampus, (B) prefrontal korteks, (C) striatum, (D) talamus oksidatif stres indeksi (OSI), grafik değerleri ortalama $\pm$ SEM * $p<0,05$ şeklinde verilmiştir.....	66
Şekil 6.32. Kontrol ve soğuk stres gruplarında sıçanların (A) hipokampus, (B) prefrontal korteks, (C) striatum, (D) talamus beyin kaynaklı natriüretik faktör (BDNF), grafik değerleri ortalama $\pm$ SEM * $p<0,05$ şeklinde verilmiştir.....	67

- Şekil 6.33.** Kronik aralıklı soğuk stres uygulanan sıçanlarda yüzme süresi ve prefrontal kortekste ölçülen BDNF düzeyleri arasında korelasyon, Pearson katsayısı= 0,77 ve $p<0,05$. 69
- Şekil 6.34.** Kronik aralıklı soğuk stres uygulanan sıçanlarda hareketsiz kalma süresi ve prefrontal kortekste ölçülen BDNF düzeyleri arasında korelasyon, Pearson katsayısı= -0,73 ve $p<0,05$69
- Şekil 6.35.** Kronik aralıklı soğuk stres uygulanan sıçanlarda merkezde geçirilen süre ve prefrontal kortekste ölçülen BDNF düzeyleri arasında korelasyon, Pearson katsayısı= 0,72 ve $p<0,05$70
- Şekil 6.36.** Kronik aralıklı soğuk stres uygulanan sıçanlarda anksiyete indeksi ve prefrontal kortekste ölçülen BDNF düzeyleri arasında korelasyon, Pearson katsayısı= -0,8 ve $p<0,05$. .71
- Şekil 6.37.** Kronik aralıklı soğuk stres uygulanan sıçanlarda hipokampusta ölçülen kortizol ve BDNF düzeyleri arasında korelasyon, Pearson katsayısı= -0,75 ve $p<0,05$71

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 4.1. Normal ve patolojik anksiyetenin fonksiyonel anatomisi. (Martin ve ark., 2009) kaynağından uyarlanmıştır (36).....	15
Tablo 4.2. Daha önce literatürde soğuk stres modeli ve beyindeki ve davranışlara olan etkileri ile ilgili yapılmış çalışmalar.	22
Tablo 5.1. Kronik aralıklı soğuk stres modeli uygulama protokolü.	26
Tablo 6.1. Moleküler testlerin beyin farklı bölgelerinde, kronik aralıklı soğuk stres grubu sıçanlarda kontrol grubuna göre kıyaslandığında bulunan sonuçların özeti.....	68

1. TÜRKÇE ÖZET

Kronik Aralıklı Soğuk Stresin Peripubertal Dönemdeki Sıçanların Beyninde Kortizol Aracılı Oksidatif Stres, İnflamasyon Ve Anksiyodepresif Benzeri Davranışlara Etkisi

Amaç: Tehdit altında homeostaz durumu olarak tanımlanan stres, depresyon ve anksiyete gibi psikiyatrik hastalıkların patofizyolojisinde önemli bir risk faktörüdür. Bu çalışmanın amacı; adolesan dönemde kronik aralıklı soğuk stres maruziyetinin beyinde yol açtığı inflamasyon, oksidatif stres, anksiyete ve depresyon benzeri davranışları incelemektir.

Gereç ve Yöntem: Adolesan dönem erkek sıçanlar, modifiye edilmiş kronik aralıklı soğuk stres modeline maruz bırakılmıştır. Soğuk maruziyeti kademeli artırılmış ve 21 gün boyunca günde 1 saat olarak uygulanmıştır. Sıçanlar kontrol ve stres grubu olarak iki gruba ayrılmıştır. Anksiyete benzeri davranışlar açık alan testi, yükseltilmiş artı labirent, aydınlık karanlık kutusu testlerinde; depresyon benzeri davranışlar şeker seçim testi, zorunlu yüzme testlerinde değerlendirilmiştir. Prefrontal korteks, striatum, talamus ve hipokampusta; tümör nekroz faktörü- α , interlökin-1 β , beyin kaynaklı natriüretik faktör, reaktif oksijen ürünleri, malondialdehit, total oksidan ve antioksidan seviyesi, kortizol düzeyleri değerlendirilmiştir.

Bulgular: Çalışmamızda kronik aralıklı soğuk strese maruz bırakılan adolesan dönem sıçanlarda kontrol grubuna kıyasla, anksiyete ve depresyon benzeri davranışlarda artış, prefrontal korteks ve striatumda azalmış BDNF düzeyi, prefrontal kortekste artmış kortizol düzeyi, hipokampus ve talamusta artmış IL-1 β düzeyi, striatumda artmış protein karbonil düzeyi, prefrontal korteks ve talamusta azalmış TAS gösterilmiştir.

Sonuç: Adolesan dönem, strese duyarlılığın arttığı önemli bir nörogelişimsel dönemdir. Bu çalışmada adolesan dönem erkek sıçanlarda kronik aralıklı soğuk stres uygulamasının hem anksiyete hem de depresyon benzeri davranışlara yol açabildiği ve bazı beyin bölgelerinde inflamasyon ve oksidatif stres artışına neden olabileceği gösterilmiştir.

Anahtar Kelimeler: anksiyete, depresyon, inflamasyon, oksidatif stres, soğuk stres

2. ABSTRACT

The effect of chronic intermittent cold stress on cortisol-mediated oxidative stress, inflammation and anxiodepressive-like behavior in the brain of rats in the peripubertal period

Aim: Stress, defined as a threatened homeostasis state, is an important risk factor in the pathophysiology of psychiatric diseases such as depression and anxiety. The aim of this study is to examine the effects of chronic intermittent cold stress exposure on depression and anxiety-like behaviors, inflammation and oxidative stress in the brain.

Materials and Methods: Adolescent male rats were exposed to a modified chronic intermittent cold stress model. Cold exposure was gradually increased and applied 1 hour a day for 21 days. The rats were divided into two groups as control and stress groups. Anxiety-like behaviors are determined by open field test, elevated plus maze, light-dark box tests. Depression-like behaviors were confirmed by the sucrose preference test and the forced swimming tests. In the prefrontal cortex, striatum, thalamus and hippocampus; tumor necrosis factor- α , interleukin-1 β ; brain derived natriuretic factor, reactive oxygen substrats, malondialdehyde, total oxidane and antioxidant level and cortisol levels were evaluated.

Results: In this study, adolescent rats exposed to chronic intermittent cold stress, compared to control group, showed an increase in anxiety and depression-like behaviors, decreased BDNF levels in the prefrontal cortex and striatum, increased cortisol levels in the prefrontal cortex, increased IL-1 β levels in the hippocampus and thalamus, increased protein carbonyl levels in the striatum, and decreased TAS in the prefrontal cortex and thalamus.

Conclusions: Adolescence is an important neurodevelopmental period in which sensitivity to stress increases. In this study, it was shown that chronic intermittent cold stress application in adolescent male rats can lead to both anxiety and depression-like behaviors and may cause inflammation and oxidative stress increase in some brain regions.

Key Words: anxiety, depression, inflammation, oxidative stress, cold stress

3. GİRİŞ VE AMAÇ

Stres kaynaklı hastalıkların mekanizması ve tedavisi, kronik hastalıkların seyrinde stresin rolü, strese yanıtta fizyolojik süreçlerin araştırılması için deney hayvanlarında stres modelleri oluşturulması önem taşımaktadır. Stresin etkileri; deneğin yaşına ve türüne, maruz bırakılan stresörün çeşidine, süresine bağlıdır. Adolesan dönemde hipotalamus hipofiz adrenal aksının ve diğer beyin bölgelerinin hızlı gelişiminin, bu hassas gelişim dönemiyle ilişkili davranış değişikliklerinde nörobiyolojik bir rol oynadığı bildirilmiştir. Bu çalışmanın amacı, adolesan dönemde kronik aralıklı soğuk stres maruziyetinin beyinde yol açtığı inflamasyon ve oksidatif stresle birlikte, depresyon ve anksiyete benzeri davranışlara olan etkisini incelemektir. Bu çalışma, strese maruz kalındığında ortaya çıkan hormonal yanıtların davranış süreçlerini hangi yönde etkilediğini araştırmayı kapsar. Değerlendirilen hipotezler:

1. Kronik stres maruziyeti, glukokortikoid salgısında artışa yol açar. Serumda kortizol düzeyi stres maruziyeti ile artar.

2. Peripubertal dönemde kronik aralıklı soğuk stres maruziyeti adolesan beyinde prefrontal korteks, hipokampus, striatum ve talamus bölgelerinde nöroinflamasyon ve oksidatif stres düzeylerinde artışa yol açar.

2. Kronik strese maruz bırakılan peripubertal sıçanlarda kontrol grubuna göre depresyon ve anksiyete benzeri davranışlarda artış olur.

3. Beyinde glukokortikoid reseptörlerince zengin olan prefrontal korteks, hipokampus, striatum ve talamusun stresin etkilerine duyarlılıkları karşılaştırıldığında glukokortikoid reseptörlerinin yoğun olduğu hipokampus daha duyarlıdır.

4. Stres grubunda beyinde beyin kaynaklı natriüretik faktör (BDNF) düzeyi azalır. BDNF düzeyleri ve depresyon testi sonuçları korelasyon gösterir.

5. Stres düzeyinin belirteci olabileceği düşünölen nötrofil lenfosit oranı, kronik stres maruziyetinde artar.

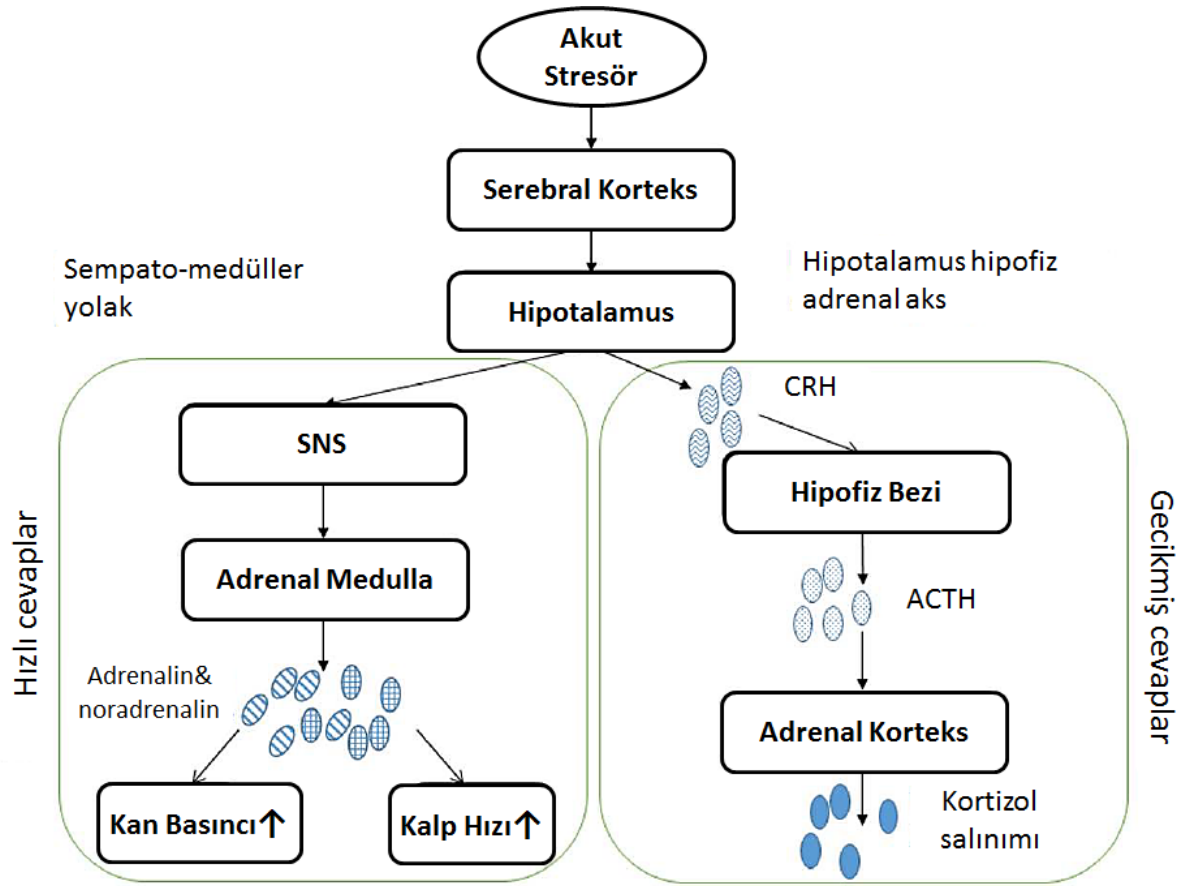


4. GENEL BİLGİLER

4.1. Stres

Stres, fizyolojik ve davranışsal değişikliklere yol açan, çeşitli adaptif cevapların etkinleştirildiği, organizmanın bir tehdit altındaki homeostaz durumudur. Biyolojik stresin ilk bilimsel açıklamasını yapan bilim insanı Hans Selye, stresi çok çeşitli zararlı etkenler tarafından üretilen semptomların kesişimini temsil eden spesifik olmayan bir fenomen olarak tanımlamıştır. Selye, stres tepkisinin açlık, soğuk ve pek çok farklı stresör tarafından oluşturulabileceğini ve stresin belirleyicilerinin spesifik olmadığını belirtmiştir (1). Daha sonra, John Wayne Mason, psikososyal stresörlerin önemi ve stresin duygusal yönlerini birleştirerek orijinal Selye konseptini değiştirmiştir. Stres yanıtını, Selye'nin savunduğu gibi spesifik olmayan yanıttan ziyade; spesifik hormonal, davranışsal ve fizyolojik bir yanıt olarak tanımlamıştır (2). Stres tepkisi, homeostazda bozulmayla başa çıkmak için vücuttaki fizyolojik ve metabolik adaptasyonda çeşitli mekanizmaları içeren, organize edilmiş bir süreçtir (3). Richard Lazarus bir durumun potansiyel olarak tehdit edici olup olmadığını belirlemede bilişsel değerlendirme süreçlerinin merkezi olduğunu savunmuştur. Ona göre stres tepkisi, organizmanın başa çıkma yeteneğini aştığında gelişmektedir (4).

Akut stres, başlıca iki ana yolun; hipotalamus hipofiz adrenal (HPA) aksı ve sempatik adreno-medüller sistem aktivasyonuna bağlı olarak biyolojik olayları tetiklemektedir (Şekil 4.1). Duygusal veya fiziksel stres, HPA aksı aktivasyonu yoluyla akut artmış plazma kortizol düzeylerine yol açmaktadır. Stres uyarısı ile hipotalamustan Kortikotropin Salgılatıcı Hormon (CRH) salgılanmakta ve hipofiz bezinden salgılanan Adrenokortikotropik Hormon (ACTH) etkisi ile adrenal kortekste kortizol üretilmektedir. Negatif geribesleme ile CRH ve ACTH baskılanmakta ve kortizol düzeyi normal sınırlar içinde tutulmaktadır. Stres hormonu olan kortikosteroidlerin sirkadyen salınımı bulunmaktadır. Kortizol düzeyinde en büyük pik, uyanmadan hemen önce gözlenir. İnsan gibi diüurnal canlılarda sabah, sıçan gibi noktürnal canlılarda akşam en yüksek düzeyleri görülmektedir (5). Akut strese verilen yanıt, organizmanın hayatta kalması için kritiktir. Organizma, tehdiye maruz kaldığında karaciğerden glukoz depolarının salınmasını uyararak enerji depolarını harekete geçirir (6).



Şekil 4.1. Akut stres cevabı yolları. (Antoun ve ark., 2017) kaynağından dilimize uyarlanmıştır (7).

Strese tekrarlayan maruziyet sonrası başlangıçtaki adaptif cevap yerini, oluşan biyolojik ve davranışsal yanıtların organizmaya zarar vermeye başladığı maladaptif duruma bırakmaktadır. Aynı stresöre tekrarlayan maruziyet yani kronik stres durumu HPA aksında düzenlenmenin bozulmasına yol açabilmektedir (3).

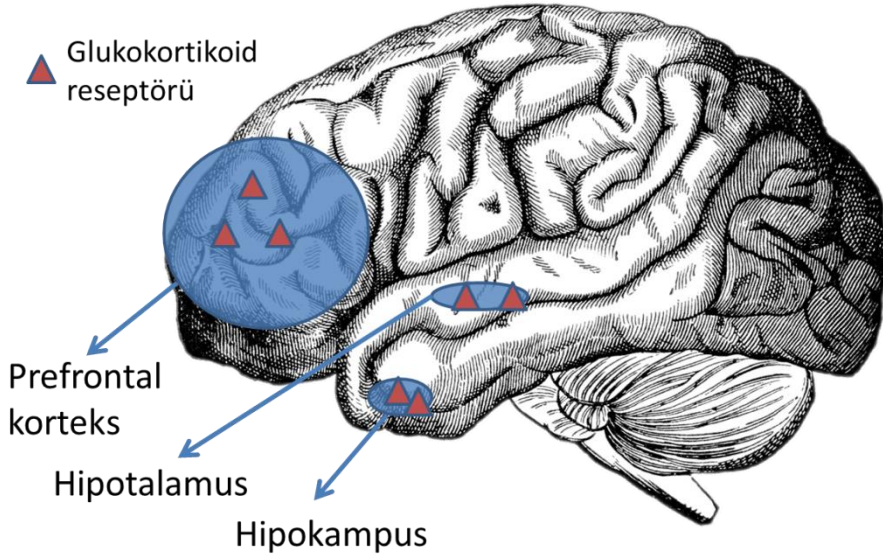
Allostatik yük kavramı, 1993 yılında McEwen ve Stellar tarafından tanımlanmıştır (8). Stresör maruziyeti sonrası homeostazisin yeniden sağlanması için fizyolojik ve biyokimyasal adaptasyona allostatik denilmektedir. Kortikosteroidler, katekolaminler, parasempatik sistem, proinflamatuvar ve antiinflamatuvar sitokinler, metabolik hormonlar bu yanıttan sorumludur. Allostatik yük ise aynı mediyatörlerin uzun süreli olarak fazla kullanımı veya iyi düzenlenememesi durumunda gerçekleşir. Bu, bireyler kontrol edilemeyen veya öngörülemeyen kronik stresli durumlarla karşı karşıya kaldıklarında ortaya çıkar. Bu strese uyumsuz yanıtın major psikiyatrik bozuklukların patofizyolojisini oluşturabileceği kabul edilmektedir (9).

4.1.1. Stresin Beyinde Oluşturduğu Etkiler

Hipokrat'ın; iyi sađlđđın fizyolojik işlevi uyumlu bir dengede sŸrdŸrmeye bağlı olduğu varsayımı, Claude Bernard' ın i ortamın homeostatik dŸzenleme ile sabit tutulması gerektiği hipotezinden başlayarak, stresin fizyolojik ve psikolojik refah Ÿzerindeki zararlı etkisi uzun zamandır kabul edilmiştir. Beyin stres sistemlerinin ve savunma davranışının aktivasyonu, homeostaza yŸnelik tehditlerden kurtulmak için kritiktir (10).

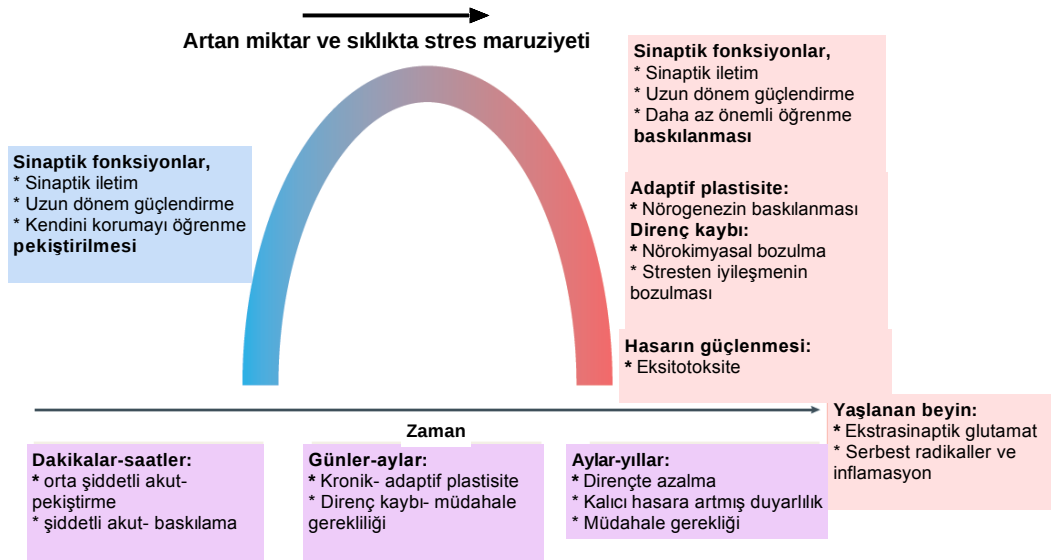
Stres hormonu olan glukokortikoidlerin fizyolojik etkileri çok geniştir. Sinir sisteminde homeostazın sağlanması ve strese yanıtta Ÿnemli işlevleri bulunmaktadır (11). Beyin, stresin ve strese adaptasyonun merkez organıdır, ŸnkŸ hangi uyaranın tehdit edici olduğunu belirler ve strese karşı davranışsal ve fizyolojik tepkileri dŸzenler. Hipokampus ve medial prefrontal korteks (mPFC) gibi beyin bŸlgelerinin nŸroendokrin ve strese davranışsal yanıtın dŸzenlenmesinde doğrudan rol oynadığı bilinmektedir (12).

Adrenal bezlerden salgılanan glukokortikoidlere hŸcresel cevap, reseptŸrleri aracılığıyla gerçekleşmektedir. Glukokortikoid reseptŸrleri (GR) beyinde pek çok bŸlgede bulunur. Adrenal steroid reseptŸrlerin beyinde en fazla ifade edildiği bŸlgeler, hipokampus ve hipotalamustur (şekil 4.2). Hipokampusta fizyolojik etkileri; bellek ve nŸroenezin dŸzenlenmesi, dendrit diken oluşumu, Ÿđrenmeyle ilgili olumlu etkiler ve strese yanıtın sağlanmasıdır. Glutamat, GABA, noradrenalin, dopamin gibi nŸrotransmitterler; BDNF gibi nŸrotrofik faktŸrlerle ilişkilidir (13). Kortikosteron seviyelerindeki fizyolojik sirkadiyen dalgalanmalar, serebral kortekste sinaps dŸngŸsŸne pozitif olarak aracılık eder ve motor Ÿđrenmeyi dŸzenlemektedir. Beyindeki glukokortikoid seviyelerinin doğru dŸzenlenmesi uygun nŸronal işleyiş için gereklidir (14).



Şekil 4.2. Glukokortikoid reseptörlerinin beyinde yoğun olarak bulunduğu yerler gösterilmiştir. (McEwen ve ark., 2015) kaynağındaki bilgiler derlenerek çizilmiştir (13).

Kortikosteron seviyelerindeki stresle ilişkili dalgalanmalar, normal fizyolojik ritimdeki salgılanmanın üzerine eklenmektedir ve literatürdeki veriler, stresin Şekil 4.3’ te gösterildiği gibi dendritik diken ve sinaps işlevini sürdürmek için gerekli olan sirkadiyen dalgalanmaları bozabileceğini göstermektedir (14). Örneğin, farelere sirkadiyen döngünün inaktif fazında yani kortikosteron konsantrasyonlarının düşük olması gerektiği dönemde ekzojen kortikosteron verildiğinde, dendritik diken stabilizasyonu bozulmaktadır. Aksine, normal fizyolojik sirkadiyen pik sırasında kortikosteron düzeylerini artırmak aynı etkiye sahip değildir (5). Bu nedenle, stresin zamanlaması ve süresi çok önemlidir.

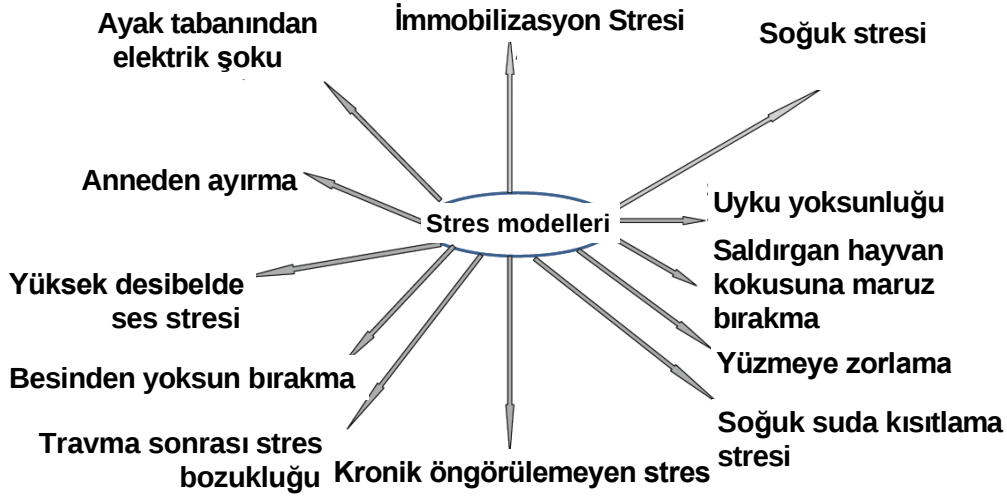


Şekil 4.3. Akut ve kronik stresin beyindeki etkileri. Stres ve glukokortikoid sisteminin düzgün işlemesi öğrenme, bellek ve duygudurum düzenlenmesi gibi normal beyin fonksiyonları açısından oldukça önemlidir ancak bu sistemin artmış ve uzamış aktivasyonu hastalıklara yol açabilir (Gray ve ark., 2017) kaynağından dilimize uyarlanmıştır (14).

Adolesan dönem, beynin stresin etkilerine en duyarlı olduğu dönemdir (15). Adolesan dönemde, amigdala genç yetişkinliğe kadar gelişmeye devam eder ve bu dönemin sonunda frontal lob önemli bir maturasyona uğrar. Sonuç olarak, yetişkinliğe geçiş sırasında maruz kalınan stres, frontal lob üzerinde büyük etkilere sahip olabilir. Araştırmalar, adolesan dönemde gonadal hormonlardaki pubertal değişiklikler ve HPA aksının yetişkinliğe kadar devam edebilen duyarlılığı nedeniyle strese karşı oldukça savunmasız olduğunu göstermektedir; bu etki, güçlendirme veya kuluçka etkileri olarak adlandırılmaktadır (16).

4.2. Deneysel Stres Modelleri

Klinik öncesi hayvan modelleri, strese yanıt olarak vücuttaki fizyolojik veya patofizyolojik değişiklikleri anlamak ve stres yönetimi için yeni farmakolojik ajanların geliştirilmesi için çok önemlidir. Çeşitli akut ve kronik hayvan modelleri insanlara benzer şekilde hayvanlarda stres durumunu taklit etmek için oluşturulmuştur (Şekil 4.4). Sıklıkla kullanılan modeller; immobilizasyon, kısıtlama, ayak tabanından elektrik şoku, sosyal izolasyon stresi, soğuk stres modelleridir (17).



Şekil 4.4. Hayvanlarda strese neden olmak için kullanılan akut ve kronik stres modelleri. (Jaggi ve ark., 2011) kaynağından dilimize uyarlanmıştır (17).

Hayvanlarda stres değerlendirmesi; davranışsal düzeyde açık alan, sosyal etkileşim, delikli tahta testi kullanılarak; biyokimyasal seviyede plazma kortikosteron ve ACTH ölçülerek; fizyolojik düzeyde besin alımı, vücut ağırlığı, adrenal bez ağırlığı ve mide ülseri ölçülerek yapılmaktadır (3).

4.2.1. İmmobilizasyon Stresi

Kvetnansky ve çalışma arkadaşları, laboratuvar hayvanlarında stresi indüklemek için fareleri ve sıçanları belirli bir süre boyunca hareketsiz hale getirerek altın standart bir protokol geliştirmiştir (18). Daha sonra bu model, kemirgenler için en sık kullanılan stres modellerinden biri haline gelmiştir. Tipik bir immobilizasyon prosedürü, düz tahta üzerinde yüzüstü pozisyonda fare veya sıçanın dört ekstremitelerinin yapışkan bir bantla sabitlenmesini içerir. Bu model, hem akut hem de kronik stresi indüklemek için yaygın olarak kullanılmaktadır. İmmobilizasyon, karmaşık bir stres etkeni olup hem fiziksel hem de psikolojik boyutları vardır. Günlerce tekrarlanan immobilizasyon maruziyetlerinde, hayvanlar strese alışma belirtileri geliştirme ve çok daha erken mücadele etmeyi bırakma eğilimindedir. İmmobilizasyondan kurtulmaya çalışma sürecinde mücadele ve kas gücü, stresin fiziksel bileşenlerini içerir. Öte yandan, hareketsiz pozisyon sırasında sınırlı hareket ve açık bir alana maruz kalma, psikolojik stresi içerir. Hareketsizleştirme, laboratuvar fareleri ve sıçanlar tarafından iyi tolere edilir ve haftalarca hatta aylara yayılan kronik stres çalışmalarında

kullanılır. Bu stres etkeni, vücuttaki strese duyarlı sistemleri, HPA aksı ve sempatik sinir sistemini aktive etmek için yeterince yoğundur. Bu tip fiziksel ve psikolojik stres, özellikle stres kaynaklı nörodejenerasyon, travma sonrası bozukluklar ve bağışıklık sisteminin deregölasyonunu incelemek için faydalıdır (19). Bu modelin kısıtlılığı, ayak tabanından elektrik şoku veya soğuk stresi gibi diğler stres modellerin aksine, stres etkeni şiddetinin değıştirilememesidir (3).

4.2.2. Kısıtlama Stresi

Kısıtlama stresi, hayvanların belirli bir süre hareket etmesine izin verilmeyen, immobilizasyon stresinin modifiye edilmiş şeklidir. Nöral ve endokrin yanıtlar, kısıtlama stresinin immobilizasyondan daha az yoğun olduğunu göstermiştir. Kısıtlama stresi, sıçanlarda kronik ve akut stresin indüksiyonu için daha yaygın kullanılan modellerden biridir (20). Kısıtlama, deney hayvanını iyi havalandırılmış plastik bir tüpe veya tel örgülü bir kaba yerleştirmeyi içerir. Hayvanın hareket aralığı ciddi şekilde sınırlı olmasına rağmen, ekstremiteler sabitlenmemiş ve hayvan kapalı bir alanda kalmıştır. Bu model, uzun süreli uzay uçuşu sırasında meydana gelen fizyolojik değışiklikleri taklit etmek için uzun süre ağırlıksız olmanın hayvan modeli olarak da kullanılmıştır (21).

4.2.3. Ayak Tabanından Elektrik Şoku

Ayak tabanından elektrik şoku stresörü hem fiziksel hem de duygusal bileşenleri içerir ve doğrudan (fiziksel stres) ve dolaylı stresör (psikolojik stres) olarak kullanılır. Hem akut hem de kronik; hafif veya şiddetli stres üretmek için çeşitli derecelerde kullanılmıştır. Ayak tabanından elektrik şoku, temel olarak, bir aparatta elektrikli ızgara zeminde ayağa, değışken yoğunluk ve farklı süreli akut veya kronik elektrik şoku maruziyetini içermektedir (3).

4.2.4. Sosyal İzolasyon Stresi

Erken yaşam olaylarının, sonraki yaşam kalitesi üzerinde derin sonuçları vardır (22). Sıçanlarda yenidoğan izolasyonunun yol açtığı erken yaşam stresinin, akut ve uzun süreli bilişsel ve davranışsal etkilere neden olduğu gösterilmiştir (23). Sıçanların izole olarak yetiştirilmesi, sosyal yoksunluğun hayvan modelidir ve sosyal yoksunluğa maruz bırakılan kemirgenler, yeni bir çevreye tepki olarak aşırı hareketlilik ve bozulmuş araştırma amaçlı

davranış gibi anormal davranışlar sergiler (24). Annenin yokluğunda korumanın olmaması yavruları stresörlere karşı daha savunmasız hale getirir. Ayrıca, erken yaşam stresi madde bağımlılığına karşı savunmasızlığı artırır ve bu bazı çalışmalarda kullanılmıştır (25). Tipik bir yenidoğan izolasyon prosedüründe, yavru doğumdan sonraki ikinci günde kafesten çıkarılır ve 1 saat boyunca opak plastik bir kaba (9 cm çapında ve 8 cm derinliğinde) tek tek yerleştirilir. Bu izolasyon prosedürü, kronik strese neden olmak için 8 gün boyunca tekrarlanır (26).

4.2.5. Soğuk Stres

İnsanlar ve hayvanlar, ani soğuk hava değişimine tepki olarak stres reaksiyonları yaşamaktadır (27). Deney hayvanlarında soğuk su veya soğutucu kullanılarak oluşturulan ani sıcaklık düşüşü, stresi tetiklemek için sıklıkla kullanılmıştır. Soğuk ortamda barındırma yönteminde, sıçanlar sıcaklığı 4°C' de olan bir soğutucuda tutulmaktadır. Sıcaklıktaki bu keskin düşüş, stres tepkisinin gelişmesiyle sonuçlanan adrenokortikoid seviyelerinde hızlı bir artışa neden olmuştur (17). Soğuk stres, düşük çevre sıcaklığına maruz kalma süresine göre akut soğuk stres ve kronik soğuk stres olarak sınıflandırılmaktadır. Soğuk stres çalışmaları için hayvan modelleri oluşturmak amacıyla laboratuvarlarda kronik aralıklı soğuğa (KAS) maruz kalma kullanılmıştır. Soğuk stresin sıçan beynindeki nöroimmün reaktiviteyi duyarlı hale getirdiği ve karaciğer, iskelet kası, kahverengi yağ doku ve kalp gibi soğuğa duyarlı organların metabolizma hızını artırdığı bildirilmiştir (28). Soğuk stres maruziyetinden hemen sonra erişkin sıçanlarda açık alan testinde (AAT) anksiyete ilişkili davranışlar gözlemlendiği raporlanmıştır (29). Strese maruz bırakılan hayvanların davranışı kritik olarak stres etkeni türüne bağlı olmasına rağmen, stres etkeni olarak soğuk, çalışmalarda nispeten daha az kullanılmıştır (30).

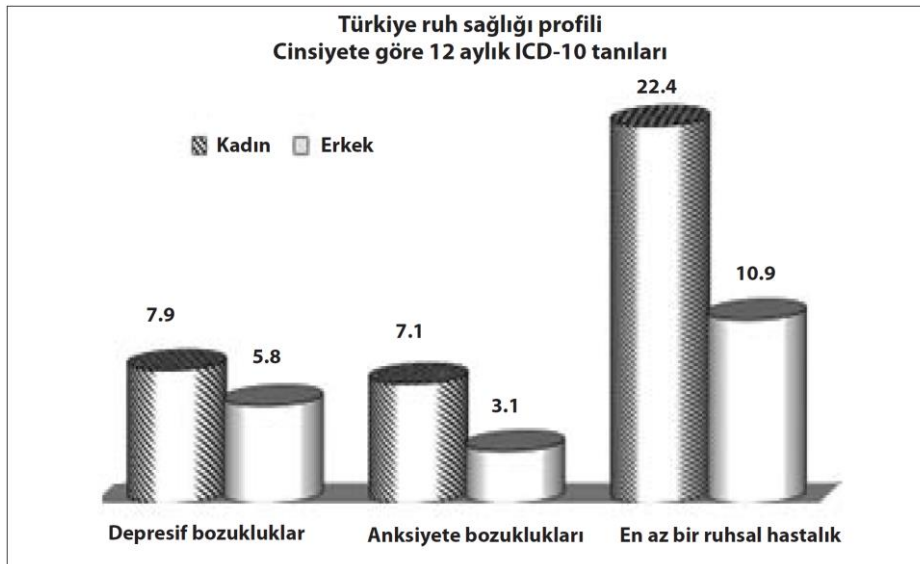
Stres modelleri, strese yanıt olarak vücuttaki fizyolojik veya patofizyolojik değişiklikleri anlamak için çok önemlidir (3). Ekzojen kortikosteron uygulaması, özellikle gen ifadesi değişiklikleriyle ilgili olarak *in vivo* stres deneyimini tam olarak yansıtmamaktadır. Sistemik kortikosteron uygulaması ve yüzme / kısıtlama stresi uygulaması farklı genlerde ifade değişikliğine neden olmaktadır. Bu nedenle planlanan araştırmada deney hayvanında stres modeli kullanılarak stresin etkilerinin daha iyi modellenmesi amaçlanmıştır. Daha önce yapılmış bir çalışmada akut stresin, glukokortikoid reseptör aktivasyonu üzerinden sıçan dorsal subikulumunda kısa ve uzun dönem sinaptik plastisiteyi bozduğu, kortikosteron uygulamasının aynı etkiyi oluşturmadığı gösterilmiştir (31).

Kronik ve yoğun stres düzeylerine maruz kalan kemirgenler, insanlarda duygudurum ve anksiyete bozukluklarının altında yatan nörobiyolojik mekanizmaları incelemek için kullanılmıştır (32).

4.3. Anksiyete ve Nörobiyolojisi

Anksiyete, bir organizmanın aktif olarak kaçınmaya çalıştığı uyaranlara beyin tepkisi anlamına gelmektedir (33). Anksiyete, tehlikeden kaçınmayı kolaylaştırıp adaptif bir yanıt olduğu durumlarda patolojik değildir. Organizmanın tehlikeye verdiği tepki ve tehdit durumunda aktive olan beyin devreleri adaptif özellikler taşımaktadır ancak, işleyişin bozulmasına yol açtığına adaptif özelliğini kaybetmektedir. Bu durum; sık, şiddetli ve ısrarcı hale geldiğinde ortaya çıkmaktadır (33). Anksiyete bozuklukları, Ruhsal Bozuklukların Teşhis ve İstatistik El Kitabı'nda tanımlanmış ve sınıflandırılmıştır (34).

Anksiyete bozuklukları kroniktir ve komorbiditesi yüksektir. “Türkiye Ruh Sağlığı Profili” çalışması, ülkemizde yapılmış ülke çapında büyük ölçekli ilk ve tek psikiyatrik epidemiyolojik çalışmadır. Bu çalışmanın verilerine göre, Şekil 4.5’te görüldüğü gibi son bir yılda anksiyete bozuklukları tanısı toplumumuzda kadınlarda %7,1, erkeklerde %3,1 oranındadır (35).



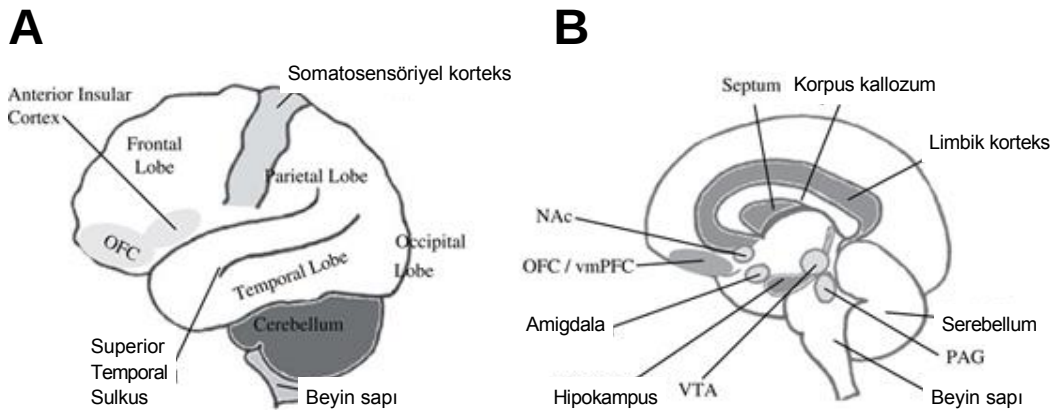
Şekil 4.5. Türkiye Ruh Sağlığı Profili-1 çalışmasına göre son bir yıldaki depresyon ve anksiyete bozuklukları tanılarının cinsiyete göre dağılımı (35).

Duygudurum ve anksiyete bozuklukları, çeşitli nöroendokrin, nörotransmitter ve nöroanatomik bozukluklarla karakterizedir. Limbik bölge, beyin sapı ve daha yüksek kortikal beyin bölgelerindeki nörotransmitter ve nöropeptid içeren devreler arasında karmaşık bağlantılar vardır. Beyin yapısında, işlevinde veya nörotransmitter sinyal yollarında değişiklikler, çevresel etkilere ve altta yatan genetik yatkınlıktan kaynaklanabilir; bu tür değişiklikler psikopatoloji riskini artırabilmektedir (36).

Duygudurum ve anksiyete bozuklukları semptomlarının, daha yüksek bilişsel merkezlerden ziyade, beynin duygusal merkezlerindeki aktivite dengesindeki bozulmadan kaynaklandığı düşünülmektedir. Beynin daha yüksek bilişsel merkezleri, frontal lobda bulunur. Prefrontal frontal korteks (PFK) planlama, karar verme, davranışlar için sonuçları tahmin etme ve sosyal davranış anlama ve yönetme gibi yürütücü işlevlerden sorumludur. Orbitofrontal korteks bilgileri kodlar, dürtüleri kontrol eder ve ruh halini düzenler. Ventromedial PFK, ödül işleme ve duygulara içgüdüsel yanıtta yer alır. Sağlıklı beyinde, bu frontal kortikal bölgeler, duygusal işleme yapılarını inhibe edici yukarıdan aşağı kontrolü yoluyla dürtüleri, duyguları ve davranışları düzenler (37).

Duyguları işleyen beyin yapıları limbik sistem olarak adlandırılır (Şekil 4.6). Limbik korteks, insular korteksi ve singulat korteksi içerir. Limbik korteks, ağrının duyusal, duygusal ve bilişsel bileşenlerini bütünleştirir ve iç bedensel durumla ilgili bilgileri işler (38, 39). Hipokampus, başka bir limbik sistem yapısıdır; hipotalamik stres yanıt sistemi üzerinde tonik inhibe edici kontrole sahiptir ve hipotalamik-hipofiz-adrenal (HPA) aksı için negatif geribildirimde rol oynar. Hipokampal hacim ve nöroenez (yeni hücrelerin büyümesi) duygudurum ve anksiyete bozuklukları ile bağlantılıdır, stres duyarlılığı ve esnekliği ile ilişkilendirilmiştir. Amigdala, duygusal olarak belirgin dış uyaranları işler ve uygun davranışsal tepkiyi başlatır. Amigdala, korku ve saldırganlığın ifade edilmesinin yanı sıra türe özgü savunma davranışından da sorumludur, ayrıca duygusal ve korku ile ilgili anıların oluşmasında rol oynar. Amigdalanın merkezi çekirdeği, limbik korteks dahil olmak üzere kortikal bölgelerle yoğun şekilde birbirine bağlıdır. Ayrıca hipokampus, talamus ve hipotalamustan da girdi alır (36). Anksiyete bozukluklarında, limbik bölgelerde, özellikle amigdalada fonksiyonel hiperaktivite ve yüksek kortikal yürütücü bölgelerin, uyaranlara limbik yanıtı normalleştirememesi gözlenmektedir (Tablo 4.1). Bu beyin bölgeleri arasında iletişimi sağlayan nörotransmitterler önemlidir. Anksiyete bozukluğu olan hastalarda duyguları işleyen beyin bölgelerindeki artan aktivite, γ -amino-bütirik asit (GABA) tarafından

azalmış inhibitör sinyallemeden veya glutamat tarafından artan uyarıcı nörotransmisyon kaynaklanabilir (40).



Şekil 4.6. Limbik sistem bileşenleri insular korteks, singulat korteks, orbital frontal korteks, hipokampus, amigdala gibi beyin yapılarını içermektedir. (A) Korteksin lateral görünümü. (B) Orta hattan sagittal kesit. NAc, nukleus accumbens; OFC, orbital frontal korteks; PAG, periaquaduktal gri; VTA, ventral tegmental area. (Martin ve ark., 2009) kaynağından uyarlanmıştır (36).

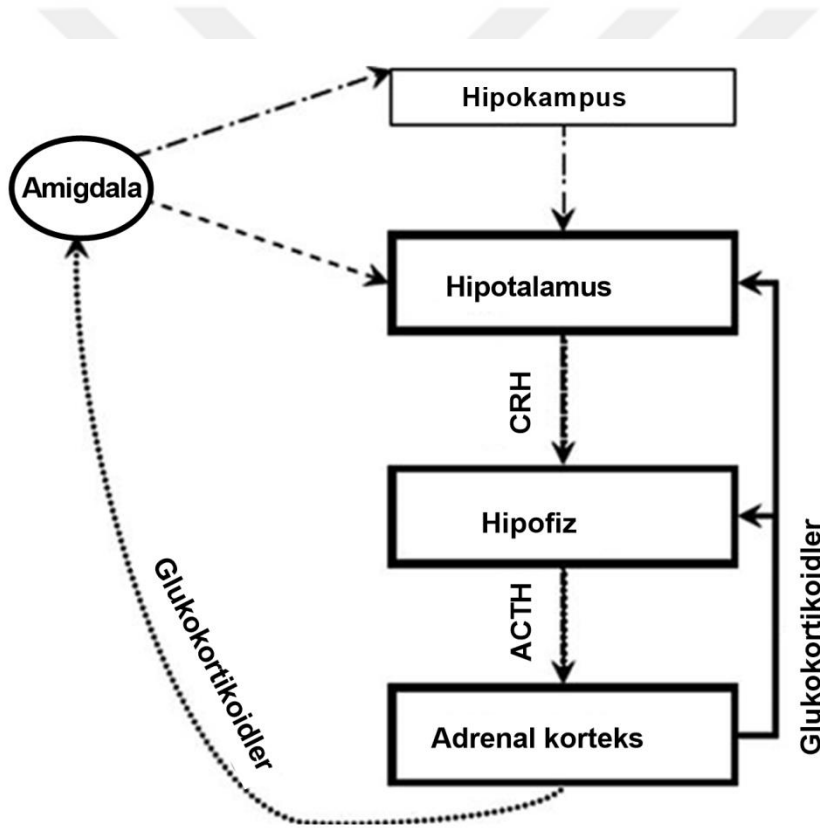
Tablo 4.1. Normal ve patolojik anksiyetenin fonksiyonel anatomisi. (Martin ve ark., 2009) kaynağından uyarlanmıştır (36).

Anatomik Bölge	Normal ve Patolojik Anksiyete
Insular korteks	Akut anksiyete ventral insulayı aktive eder
Singulat korteks	Akut anksiyete posterior singulat korteks aktivasyonunu azaltır, anterior singulat korteks üzerinde aktivitesi yoktur
Amigdala	Semptomların ortaya çıkması sırasında aktivitesi artar Anksiyete ile en çok ilişkisi olan bölge sağ amigdaladır

Monoaminerjik sistemler üzerinde etkili olan ilaçların çalışılmış anksiyolitik ve antidepresan özellikleri, duygudurum ve anksiyete bozukluklarının patogenezinde serotonin, norepinefrin ve dopaminin etkili olduğunu göstermektedir. Ürünleri monoaminerjik sinyali

düzenleyen genler, duygudurum ve anksiyete bozukluklarının patofizyolojisinde araştırma alanı haline gelmiştir ve bunların antidepresan ilaçların etki mekanizması için kritik olduğu düşünülmektedir (41).

Hipotalamik paraventriküler çekirdeğin parvoselüler nöronlarındaki CRH, strese yanıt olarak HPA aksı için birincil sekretagogdur. HPA aksında, CRH paraventriküler çekirdekten salınır ve sistemik olarak salgılanan ve adrenal korteksten glukokortikoid üretimini ve salınımını aktive eden adrenokortikotropik hormonun (ACTH) üretimini ve salınmasını sağlamak için ön hipofizdeki reseptörlere etki eder. HPA aks aktivitesi, amigdala ve hipokampus dahil olmak üzere çok sayıda diğer limbik sistem yapıları tarafından düzenlenir; amigdala HPA aks aktivitesini artırırken, hipokampus baskılamaktadır (Şekil 4.7).



Şekil 4.7. HPA aksı. Amigdala HPA aks aktivitesini artırırken, hipokampus baskılamaktadır. (Martin ve ark., 2009) kaynağından uyarlanmıştır (36). Siyah çizgi inhibisyon bağlantısı; noktalı çizgi uyarıcı bağlantı; noktalar ve kısa çizgiler dolaylı yoldan inhibisyon bağlantısını göstermektedir.

4.4. Oksidatif Stres ve Beyinde Etkileri

Oksidatif stres; oksidanlar ve antioksidanlar arasında, pro-oksidan durum lehine bir dengesizlik olarak tanımlanmaktadır (42). Yüksek oksidan konsantrasyonları, proteinler, lipitler ve nükleik asitler gibi hücre bileşenlerine zarar verebilmektedir (43). Bu tür hasarlar normal hücre fonksiyonlarında bozulma, hatta hücre ölümüne yol açmaktadır (42). Beyin, insanlar için toplam vücut ağırlığının sadece %2' sini temsil eder, ancak toplam oksijen tüketimimizin yaklaşık %20' sini oluşturur. Oksijen metabolizmasına olan yüksek bağımlılığına rağmen, merkezi sinir sistemi çeşitli faktörlerden dolayı oksidatif strese karşı oldukça savunmasızdır: Nöronların sınırlı yenilenme kapasitesinin olması, nöron membranlarının doymamış yağ asidinden zengin olması, nörotransmitterlerin kolaylıkla otooksidasyona uğraması, mikrogliaların reaktif oksijen ürünleri (ROS) üretebilmesi, antioksidan sistemlerin göreceli olarak zayıf olması bu faktörlerdendir (9). HPA aks aktivasyonu, hücrel oksidatif stresi indüklemektedir. Stresle artan glukokortikoidler nöronlarda reseptörlerine bağlanır, glukokortikoide duyarlı elemanlar yoluyla gen transkripsiyonunu düzenlemek için çekirdeğe veya mitokondriye translokasyon yapar. Mitokondriyal membran potansiyelini, kalsiyum tutma kapasitesini ve mitokondriyal oksidasyonu artırır (44). Böylece strese cevapta hücrel enerji üretimi artar. Kronik stres ve yüksek düzeyde kortikosteron ise, serbest radikal üretimini, mitokondri fragmentasyonunu artırır (45). Mitokondri fonksiyonunu bozmaktadır.

Oksidatif stresin, anksiyete patofizyolojisinin major bileşeni olabileceği ortaya atılmıştır (9). Hayvan modellerinde, redoks dengesi ile ilgili genetik veya farmakolojik müdahaleler anksiyete ilişkili davranış değişikliklerine yol açmıştır. Farelerde reaktif oksijen ürünlerinin düzenlenmesinden sorumlu olan p66Shc geninin silinmesinin, daha düşük oksidatif stres seviyelerine ve yükseltilmiş artı labirent testi ile değerlendirilen azalmış anksiyete benzeri davranışa neden olduğunu göstermiştir (46). Başka bir çalışmada sükröz ile zenginleştirilmiş diyetin frontal kortekste protein oksidasyonunu arttırdığı ve sıçanlarda anksiyete benzeri davranışı indüklediği gösterilmiştir (47).

4.5. Stres Modellerinde Anksiyete

Farklı deneysel stres modellerinde, stres maruziyetinin anksiyete benzeri davranışlara yol açtığı gösterilmiştir. Strese maruz kalan hayvanlarda gözlenen anksiyete; hayvanların

biyolojik arka planı, sinir sistemindeki değişiklikler ve farklı stresörlerle ilişkili olarak belirtilmiştir. Anksiyetenin, kısıtlama stresi, çevresel sıcaklığın neden olduğu tekrarlanan soğuk stresi, sosyal stres vb. gibi birçok stres türünün neden olduğu olumsuz bir duygu olduğu düşünülmektedir (48).

Kemirgenlerde anksiyete benzeri davranışların değerlendirilmesinde yükseltilmiş artı labirent (YAL), açık alan testi (AAT), aydınlık karanlık kutusu (AKK) düzenekleri sıklıkla kullanılmaktadır (49). Yükseltilmiş artı labirent düzeneğinin açık kolları üzerinde harcanan zaman yüzdesi, stresli hayvanlarda azalmış bulunmaktadır. Anksiyete düzeyi, alıcıların başa çıkma stratejilerine göre farklılık gösterir. Farklı tür, cinsiyet, yaş veya aileye sahip sıçanlar, yükseltilmiş artı labirentte farklı davranışlar sergiler (48).

Yapılan bir çalışmada kronik öngörülemez stres modelinde stres maruziyeti ile Sprague-Dawley (SD) sıçanlarda kortizol düzeyinin arttığı ve YAL testinde anksiyete benzeri davranışların arttığı gösterilmiştir (50). Travma sonrası stres bozukluğu modelinde AAT ve YAL test düzeneklerinde anksiyete benzeri davranışlar raporlanmış ve amigdala, prefrontal korteks, globus pallidus ve superior colliculus gibi stres-anksiyete tepkisi ile ilgili olan beyin bölgelerinde uzun süreli bozulmalar saptanmıştır (51).

Soğuk stres modelinde yapılmış çalışmalara bakıldığında farelerde soğuk stresin YAL testinde anksiyete ilişkili davranışlara yol açtığı, diazepam ve alprazolam ile bu cevabın inhibe edildiği gözlenmiştir (52). Soğuk stres farelerde anksiyete benzeri davranışlara yol açmış ve CRH enjeksiyonu anksiyojenik etki göstermiştir (53).

Adolesan dönem, beynin stresin etkilerine en duyarlı olduğu dönemdir (15). Adolesan dönemde kronik stres ve bunun anksiyete benzeri davranışlara olan etkisini inceleyen iki çalışma vardır. Periadolesan dönemde sporadik stres erişkin sıçanlarda YAL testinde anksiyete ilişkili davranışlara yol açmıştır (54). Adolesan dönemde kronik sosyal stres erişkin farelerde YAL testinde anksiyete ilişkili davranışlara yol açmış, dentat girus subgranular bölgesinde bölünen hücre sayısında (BrdU-pozitif) azalmaya yol açmıştır (55). Bu çalışmalarda soğuk stres modeli kullanılmamıştır ve beyinde oksidatif stres ile inflamasyon düzeyleri değerlendirilmemiştir.

4.6. Depresyon ve Nörobiyolojisi

Majör depresif bozukluk (MDB) oldukça yaygın bir psikiyatrik durumdur ve dünya çapında yaklaşık 350 milyon insan etkilenmektedir (56). Bu hastalıktan kaynaklanan önemli sosyal yüke rağmen, MDB' nin oluşumu ve ilerlemesi hakkındaki bilimsel anlayışımızda hala önemli boşluklar vardır. Mevcut tanı sistemleri, hastalardaki davranış kalıplarını oluşturan nörobiyolojik değişiklikleri yeterince yansıtmamaktadır (57). Ek olarak, MDB ve diğer psikiyatrik bozukluklar genellikle birden fazla beyin bölgesinde (prefrontal korteks, hipokampus, amigdala, nükleus akübens), farklı hücre tiplerinde (nöronlar, astrositler ve mikroglia) ve çeşitli biyokimyasal işlevlerde (gen ifadesi, biyoenerjetik ve bağışıklık tepkisi) değişiklikleri içeren multifaktöriyel bir kökene sahiptir (58).

Türkiye'de depresyon önemli bir hastalık yükü oluşturmaktadır. Ülkemizde Sağlık Bakanlığı tarafından yapılmış Türkiye Kronik Hastalıklar ve Risk Faktörleri Çalışması'nın verilerine göre toplumumuzda depresif bozukluk sıklığı %9' dur (59).

Depresyon, günlük yaşam aktivitelerini olumsuz etkileyen yaygın bir ruhsal bozukluktur. Depresyon, dünya genelinde engellilikle geçen yılların ikinci önde gelen nedenidir. Depresyon aynı zamanda önemli ekonomik yük ile ilişkilidir (60). Depresif bozukluk, intihar düşüncesi ve artmış intihar davranışı riski ile ilişkilendirilmiştir. Mortalite oranı yüksektir (61).

Depresyon, Dünya Sağlık Örgütü tarafından bildirildiği üzere dünya nüfusunun %3,5' inden fazlasını etkileyen ciddi bir psikiyatrik bozukluktur. Stres, özellikle bazı genetik yatkınlığı olan bireylerde duygudurum ve anksiyete bozukluklarının gelişiminde önemli bir risk faktörü olarak kabul edilmektedir (62).

Anksiyete patofizyolojisinde önemli bir yere sahip limbik sistemin, depresyonun patogenezinde de önemli bir rolü vardır. Depresyonla ilgili yapılan son çalışmalarda limbik sistemde önemli bir merkez olan hipokampustaki işlev bozukluğunun, majör depresif bozukluğun (MDB) nöropatolojisinde önemli olduğu ileri sürülmektedir. Major depresyonun hipokampusta atrofiye yol açtığı gösterilmiştir. Hipokampus, öğrenme ve bellekte kritik bir rol oynar ve hipokampal hacim kaybının büyüklüğü (bazı çalışmalarda yaklaşık %20 (63)), major depresyona eşlik eden bazı bilişsel bozulmaları açıklamaya yardımcı olur (64).

MDB'nin ana semptomları, depresif ruh hali, konsantrasyon kaybı, anormal iştah, uyku bozukluğu ve anhedonidir. Bu bozukluğun mekanizmaları için monoamin hipotezi, hipotalamik-hipofiz-adrenal (HPA) ekseninin düzensizliği hipotezi ve beyin kaynaklı nörotrofik faktörü (BDNF) içeren bir hipotez önerilmiştir (58).

Serebrospinal sıvılardaki monoamin seviyesi hastaların bir kısmında azalmıştır; ayrıca depresyon benzeri semptomlar, seçici serotonin geri alım inhibitörleri, serotonin ve norepinefrin geri alım inhibitörleri gibi ilaçlar ile azalmıştır (65). Bu bulgular, depresyon benzeri semptomların beyindeki monoamin seviyelerinin azalmasıyla bağlantılı olduğunu göstermektedir.

Kronik stres ve stresli yaşam olayları, kronik glukokortikoid salınımına neden olur ve depresyonu tetikler gibi görünmektedir. Depresyon hastalarının yaklaşık yarısında HPA aksının aşırı aktivasyonu bulunmuştur (66). Depresyon patofizyolojisinde HPA aksının düzensizliğinin rolünü destekleyen çalışmalar mevcuttur (67). Stresin neden olduğu kronik glukokortikoid salınımı, merkezi glukokortikoid reseptör seviyelerini / fonksiyonunu değiştirir. GR' deki değişikliklerin, GR geninin epigenetik modifikasyonu ile indüklendiği bildirilmektedir (68). Bu değişiklikler, hipokampus hacminde azalmaya ve prefrontal korteks, striatum ve amigdala gibi duygu ve bellek ile ilgili diğer beyin alanlarında anormalliklere, nörojenezi veya nöroplastisiteyi değiştirerek depresyona neden olmaktadır (69).

BDNF' nin depresyonla ilişkisi bazı gözlemlere dayanılarak önerilmiştir: Depresif hastaların beyinlerinin ölüm sonrası analizi, azalmış BDNF içeriği göstermektedir ve depresyon tanılı hastalarda dolaşımda azalmış BDNF konsantrasyonu bildirilmiştir (70). BDNF'deki bu azalmaya stres kaynaklı glukokortikoid artışı aracılık ediyor gibi görünmektedir (71). Ayrıca antidepresan tedavinin stres sonrası hipokampustaki azalmış BDNF içeriğini geri kazandırdığı da bildirilmektedir (58). Bununla birlikte, BDNF hipotezi ile tutarsız sonuçlar da vardır: BDNF reseptöründen yoksun ön beyin spesifik TrkB nakavt fareleri, depresif olmaktan çok hiperaktif davranışlar sergilemiştir (72). Antidepresan fluoksetinin sıçan hipokampusundaki BDNF seviyeleri üzerinde hiçbir etkisi olmamıştır (73).

Çeşitli klinik çalışmalar nöroinflamasyonun anksiyete, depresyon ve nörodejeneratif hastalıklar gibi nörolojik bozuklukların patogenezinde rol oynadığını bildirmiştir. Mikrogliaların anormal aktivasyonu; tümör nekroz faktörü- α , interlökin-1 β ve Nükleer Faktör

Kappa B gibi inflamatuvar moleküller üretilmesine yol açabilmektedir (74). Proinflamatuvar sitokinlerin salınmasından, stres yanıtı sırasında bu olayların başlatılmasından sorumlu hücrel mekanizmalar yeterince anlaşılmamasına rağmen nöroinflamasyon, depresyon ve anksiyete bozukluğu gibi nöropsikiyatrik bozuklukların gelişmesine katkıda bulunabilir (75). Artmış sitokin üretiminin önemli ve zararlı bir sonucu, artan reaktif oksijen türlerinin oluşmasıdır (76). Nöroinflamatuvar durumlarla ilişkili mikrogial hücre sayısında artışın, farklı psikojenik stres faktörlerinin neden olduğu glukokortikoid seviyesinde artma gibi değişikliklere bağlı olduğu ortaya atılmıştır (77).

Son yıllarda yayınlanan çalışmalar anksiyodepresif komorbidite üzerinde durmaktadır. Depresyon ve anksiyete gibi duygudurum bozuklukları sıklıkla birlikte görülmektedir. Depresif bozukluklar ve anksiyete bozuklukları arasında komorbidite yaygındır. Komorbidite hastalık şiddetinde artış, kroniklik ve günlük yaşamdaki bozukluklarla ilişkilidir. Hastalıklardan birinin varlığının, diğerini geliştirmek için bir risk faktörü olduğu iyi bilinmektedir (78).

4.7. Stres Modellerinde Depresyon

Stresli olaylar, duygudurum bozukluklarının gelişimi için en önemli predispozan faktörlerden biri olarak kabul edilmektedir (79). Depresyonun bazı semptomları (örneğin değersizlik hissi, intihar düşüncesi) hayvanlarda modellenemese de, modellemenin yapısal ve farmakolojik geçerliliği oldukça yüksektir. Kronik strese, hatta tek bir stres dönemine maruz kalma, standart antidepresan tedavilerle tersine çevrilebilen, spesifik depresyon benzeri davranış değişikliklerine neden olabilmektedir. Temel klinik semptomlardan depresif ruh hali ve anhedoniye benzeyen depresyon benzeri semptomlar; zorunlu yüzme ve kuyruk süspansiyon testleri (hareketsizlik süresi ölçümü) ve şeker seçim testi (%1-%2 sükröz çözeltisi tüketimi) kullanılarak kemirgen modellerinde değerlendirilmektedir (80). Stresin neden olduğu depresyon modelleri, stres etkeni özelliklerine (örneğin, fiziksel veya sosyal), süresine (akut veya kronik) ve maruz kalma zamanına (erken yaşam veya yetişkin dönem) göre sınıflandırılabilir. Akut stres (örneğin yüzmeye zorlama stresi) depresif dönemleri tetikleyebilse de, depresif bozukluk semptomlarının ortaya çıkmasının genellikle kronik stresli yaşam olaylarıyla ilişkili olduğuna dair çok sayıda klinik gözlem vardır (81). Kronik stres paradigmalarında, kemirgenler günlük insan yaşamının stresli olaylarını taklit eden doğal

stresörlere maruz kalmaktadır (82). Sıklıkla, aynı stres paradigması, insanlarda yüksek komorbiditeye sahip olan hem anksiyeteyi hem de depresyonu modellemektedir (83).

Sosyal stres modellerinden elde edilen kanıtlar stresin etkisiyle, hipokampus CA3 ve CA1 piramidal nöronlarında diken yoğunluğunda azalma olduğunu ve bunun hayvanlarda gözlenen depresyon benzeri davranışlarla ilişkili olduğunu bildirmiştir (84). Erişkin Sprague Dawley (SD) sıçanlarda kronik öngörülemez hafif strese maruziyette, sirkadyen ritimde bozulma ve şeker seçim testinde sükröz tüketiminde azalma gözlenmiştir (85).

Daha önce erişkin SD sıçanlarda soğuk stresin, zorunlu yüzme testinde depresyon benzeri davranışlara yol açtığı gösterilmiştir, bu çalışmada stresin BDNF düzeylerine etkisi olmamıştır (69). Peripubertal dönem sıçanlarda ise kronik aralıklı soğuk stres maruziyeti ve depresyon benzeri davranışlara etkisini inceleyen çalışma bulunmamaktadır.

Literatürde soğuk stres modeli ve beyinde moleküler düzeyde ve/veya davranışlara olan etkilerini inceleyen çalışmalar Tablo 4.2’ de derlenmiştir.

Tablo 4.2. Daha önce literatürde soğuk stres modeli ve beyindeki ve davranışlara olan etkileri ile ilgili yapılmış çalışmalar.

Çalışma	Deney hayvanı	Soğuk stres protokol	Davranış testi	Hormon	Beyinde moleküler çalışma	Sonuç
(86)	Erişkin erkek Sprague-Dawley sıçan	14 gün boyunca, günde 6 saat, 4° C	-	Plazma kortizol, ACTH	Hipotalamus ve prefrontal kortekste IL1 β , IL6, COX2, CxCl1, MCP1, GAPDH gen ifadesi, IL6 ve IL1 β protein düzeyi	Soğuk stresin pro-inflamatuar sitokin cevabına etkisi olmadı, Lipopolisakkarit pro-inflamatuar sitokin cevabını artırdı.
(28)	5 haftalık erkek Spargue-Dawley sıçan	14 gün boyunca, günde 6 saat, 4° C	-	-	Hipokampus, korteks ve serebellumda ATP, ROS düzeyi	Soğuk stres grubunda beyinde ATP ve ROS arttı.
(87)	7 haftalık erkek fareler	14 gün boyunca günde 2 saat, 4° C	-	Serum kortizol, ACTH	Hipotalamusta HSP70, c-Fos, NF-kB, IL-9, IL-13, PGE1, PG 2	Soğuk stres grubunda, IL-9, IL-13, PGE2, NF-kB, HSP70 arttı. Diğerleri

						değişmedi.
(88)	Erişkin Sprague-Dawley sıçan	14 gün boyunca, günde 6 saat, 4° C	-	Plazma kortizol, ACTH	Hipotalamusta IL-6 protein ve mRNA, STAT3 fosforilasyonu, SOCS3 mRNA	Soğuk stres grubunda IL-6 mRNA arttı, diğerleri değişmedi.
(89)	1 aylık erkek Wistar albino sıçan	4 hafta boyunca, günde 2 saat, 5 °C	-	-	Frontoparietal kortekste MDA, protein karbonil, AOPP, protein miktarı, H2O2	Soğuk stres grubunda MDA, protein karbonil, AOPP, H2O2 arttı.
(90)	Erişkin erkek fareler	30 gün boyunca kronik 4° C	-	Östrojen	Hipokampusta c-fos, COX2, MAP1LC3, Iba1, NF-κB-p65, CD11b, IL-1β, IL-6, GPR30, MAP1LC3, Iba1	Soğuk stres grubunda oksidatif stres ilişkili c-fos ve COX2 ifadesi, MAP1LC3, Iba1-işaretli mikrogliya, IL-1β arttı.
(91)	Adolesan 5 haftalık dişi ve erkek fareler	7 gün boyunca günde 3 saat, 4 °C	-	Hipokampus kortizol	Hipokampus MAP2, MDA	Soğuk stres grubunda MAP2, MDA arttı.
(92)	Erişkin erkek fareler	6 gün boyunca saat 9.00-16.00 arasında 1 saatlik aralıklarla 24°C ve 4°C maruziyet	Zorunlu yüzme testi	-	-	Soğuk stres grubunda depresyon benzeri davranış arttı.
(52)	Erişkin erkek fareler	6 gün boyunca saat 9.00-16.00 arasında 1 saatlik aralıklarla 24°C ve 4°C maruziyet	Yükseltilmiş art labirent testi	-	-	Soğuk stres grubunda açık kolda geçirilen süre azaldı.
(69)	Erişkin erkek Sprague-Dawley sıçan	5 gün boyunca 17.30- 10.00 arasında 4°C de maruziyet 10.00-17.30 arasında 30 dakikalık aralıklarla 22°C ve 4°C maruziyet	Zorunlu yüzme testi	-	Hipokampusta BDNF	Soğuk stres grubunda depresyon benzeri davranış arttı. BDNF değişmedi.
(53)	Erişkin erkek fare	6 gün boyunca saat 9.00-16.00 arasında 1 saatlik	Zorunlu yüzme testi, Yükseltilmiş artı	-	-	Soğuk stres grubunda anksiyete benzeri davranış arttı.

		aralıklarla 24°C ve 4°C maruziyet	labirent testi			
(93)	Adolesan SD sıçan	Kronik değişken stres modeli (soğuk maruziyeti 4°C'de 1, 2 veta 4 saat boyunca)	Moris su labirenti testi	Plazma kortizol	Hipokampus reseptör ve BDNF mRNA, TrkB	Değişken stres grubunda Moris testi yanıtı bozuldu. BDNF değişmedi.

5. GEREÇ VE YÖNTEM

5.1. Deney Hayvanları

Bu çalışma Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı'nda gerçekleştirilmiştir. Çalışmaya Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından etik onay alınmasından sonra başlanmıştır. Yirmi bir günlük 16 adet Wistar türü erkek sıçanlar Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Üretim ve Araştırma Laboratuvarı'ndan temin edilmiştir. Deney hayvanları, Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarı'nda 23 ± 2 °C oda sıcaklığında, 12 saat aydınlık 12 saat karanlık döngüsünde, su ve standart pellet yemlerine kısıtlama olmaksızın tutulmuştur. Sıçanların 1 hafta süresince ortama adaptasyonu sağlanmıştır. Sıçanlar iki gruba ayrılarak, birinci grup kontrol grubu, ikinci grup stres modeli uygulanacak grup olarak belirlenmiştir. Her gruptaki deney hayvanı sayısı 8 olacak şekilde düzenlenmiştir. Ankara Üniversitesi 22.07.2020 tarihli ve 2020-13-116 sayılı karar numarası ile alınan etik kurul onayı Ek 1' de verilmiştir.

5.2. Stres Modeli

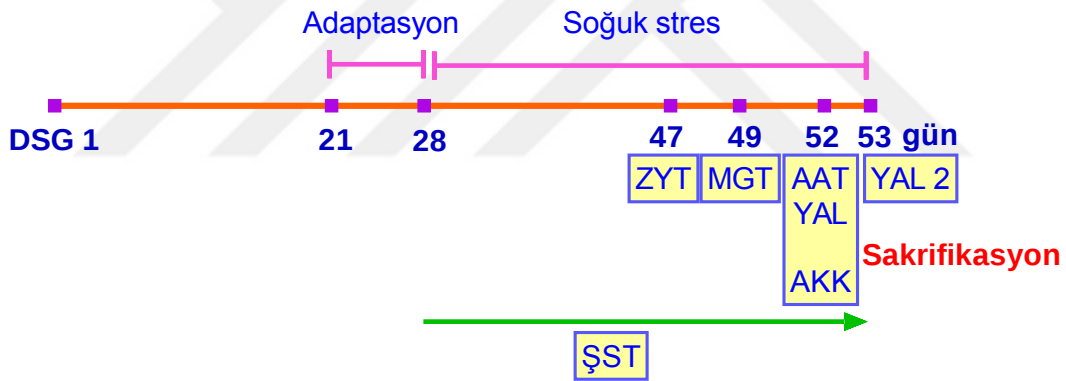
Sıçanlarda stresin fizyolojik parametrelere olan etkisini değerlendirebilmek için stres modeli oluşturulmuştur. Kronik aralıklı soğuk stres modeli uygulanmıştır (94). Bu model 28 günlük sıçanlara göre modifiye edilmiştir. Sıçanlar için doğumdan sonraki 28 ve 42. günler arası peripubertal dönemdir (95). Yirmi sekiz günlük sıçanlar için literatürdeki çalışmalarda uygulanmış en kısa 7 dakika ve en fazla 1 saat soğuğa maruziyet derlenerek kronik aralıklı soğuk stres modeli oluşturulmuştur (93, 96). Deney protokolü 25 gün sürmüştür. Soğuk maruziyeti ilk gün 7 dakika olmak üzere takip eden günlerde 15 dakika, 30 dakika, 45 dakika ve 21 gün boyunca günde 1 saat olarak uygulanmıştır (Tablo 5.1). Stres grubundaki sıçanlar kafeslerinde yiyecek ve su ile beraber sıcaklığı kontrol edilen haznede günde 1 saat boyunca 4°C de tutulmuştur. Araştırmamızda stres maruziyeti, sıçanlarda kortizol düzeyinin düşük olduğu sabah saatlerinde uygulanmış ve sirkadyen ritmin önemi gözetilmiştir. Her gün saat 9.00'da soğuk uygulanmaya başlanmıştır. Bu saatlerin dışında sıçanlar standart ortamlarında tutulmuştur. Kontrol grubundaki sıçanlar stres grubuna soğuk uygulanan süre boyunca aynı koşullarda oda sıcaklığında tutulmuştur.

Tablo 5.1. Kronik aralıklı soğuk stres modeli uygulama protokolü.

Doğum sonrası günler (DSG)	Soğuk uygulama süresi
28. gün	7 dakika
29. gün	15 dakika
30. gün	30 dakika
31. gün	45 dakika
32-53. gün	60 dakika

Hayvanların davranış testleri yapılmış ve hayvanlar, son soğuk uygulamasından sonra, saat 12.00’de, 50 mg/kg sodyum tiyopental anestezisi uygulanarak sakrifiye edilmiş, kan ve beyin doku örnekleri alınmıştır.

Deney protokolü şeması Şekil 5.1’ de özetlenmiştir.



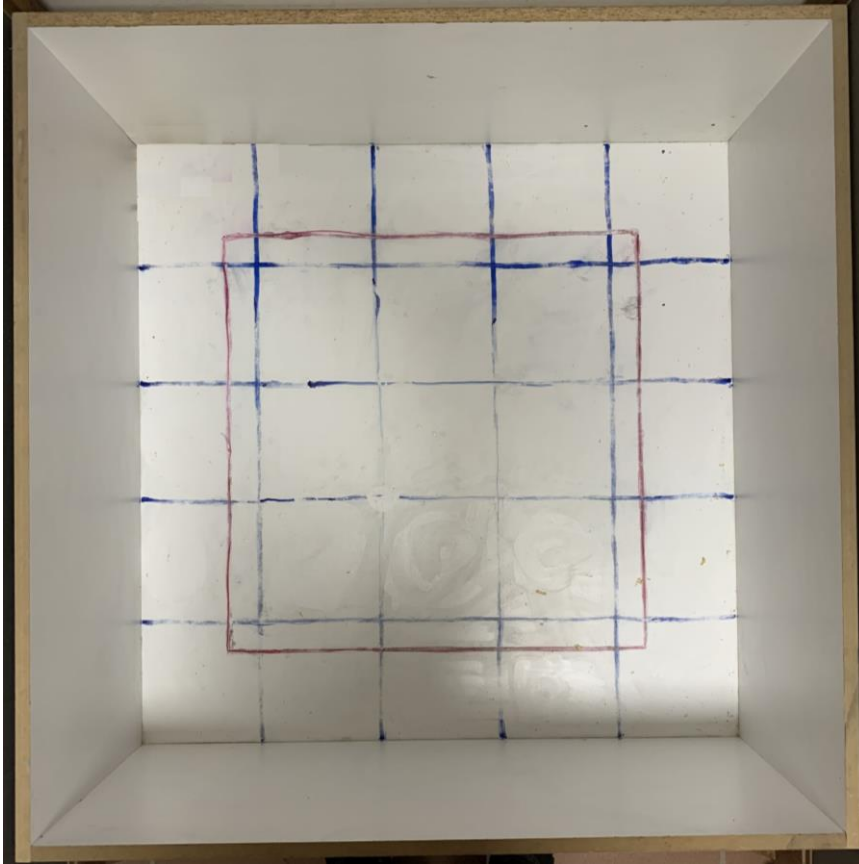
Şekil 5.1. Deney protokolü şeması, ZYT: Zorunlu yüzme testi, MGT: misket gömme testi, AAT: Açık alan testi, YAL: Yükseltilmiş artı labirent, AKK: aydınlık karanlık kutusu, ŞST: Şeker seçim testi, DSG: doğum sonrası gün.

5.3. Davranış Testleri

5.3.1. Anksiyete Testleri

5.3.1.1. Açık Alan Testi

Açık alan testi, genel lokomotor aktivite seviyelerini, kaygıyı ve hayvanlarda keşfetme istekliliğini ölçmek için kullanılan deneysel bir testtir. 100 x 100 cm ölçülerinden oluşan kare bir açık alan düzeneği oluşturulmuştur. Alan, kenarları 20 cm olan karelere bölümlendirilmiştir (Şekil 5.2). Açık alanın merkez bölgesi, perifer bölgeden ayrılması için farklı renkle çizilmiştir. Sıçanın kaçmasını önlemek için duvarları bulunmaktadır. Deneyler toplam 5 dakika sürmüştür ve kamera ile kaydedilmiştir. Test düzeneği, her hayvan için deney bittikten sonra %65 etanolle silinmiş ve 20 dakika boyunca havalandırılmıştır. Deney, sıçanın başlangıçta merkez bölgeye bırakılması ile başlamıştır. Deney, 11.00-12.00 saatleri arasında yapılmıştır. İki ayak üzerine toplam kalkma sayısı, destek almadan iki ayak üzerine kalkma sayısı, destekli olarak iki ayak üzerine kalkma sayısı, iki ayak üzerine kalkana kadar geçen süre, toplam katedilen mesafe, ortalama hız, merkezde geçirilen süre, periferde geçirilen süre, merkez bölgeye girme sayısı, merkezi ilk terketme süresi, merkez bölgeye tekrar girme süresi parametreleri değerlendirilmiştir.



Şekil 5.2. Açık alan test düzeneği.

5.3.1.2. Yükseltilmiş Artı Labirent

Yükseltilmiş artı labirent 1985 yılında Pellow ve arkadaşları tarafından tanımlanmıştır. İki açık ve iki kapalı koldan oluşan yükseltilmiş artı labirent, kemirgenlerin doğal olarak açık ve yüksek alanlardan hoşlanmamasına dayanmakta ve kaygı ölçümü için kullanılmaktadır (97). 50cm×10cm ölçülerinde açık kol, 50cm×50cm×10cm ölçülerinde kapalı kol ve yerden 50 cm yükseklikte deney düzeneği kullanılmıştır (Şekil 5.3). Deney düzeneği beyaz kokusuz tahtadan yapılmıştır. Sıçanlar, labirentin dört kolunun birleşim yerine, açık kola bakacak şekilde yerleştirilmiş ve kamera ile 5 dakika boyunca kaydedilmiştir. Deney bitiminde her hayvan için ortam, %65 etanolle silinmiş ve 20 dakika boyunca havalandırılmıştır. Daha sonra kaydedilen videolardan analiz yapılmıştır. Değerlendirilen parametreler, açık kolda geçirilen süre, kapalı kolda geçirilen süre, toplam açık ve kapalı kol geçiş sayısı, açık kola girme sayısı, açık kolu ilk terketme süresi, araştırma amaçlı aşağı bakma davranışı, strese bağlı gergin duruş sayısıdır. Saat 11.00- 12.00 arasında deneyler yapılmıştır.

YAL davranış ölçütlerini bütünleştiren bir indeks olan anksiyete indeksi aşağıdaki şekilde hesaplanmıştır:

$$\text{Anksiyete indeksi} = 1 - \left[\frac{\left(\frac{\text{açık kolda geçirilen süre}}{\text{toplam labirentte geçirilen süre}} \right) + \left(\frac{\text{açık kola girme sayısı}}{\text{toplam açık ve kapalı kol geçiş sayısı}} \right)}{2} \right]$$

Anksiyete indeksi değerleri, 0-1 arasında değişmektedir; sayısal değerinde artış, artan anksiyete benzeri davranışı ifade etmektedir (98).



Şekil 5.3. Yükseltilmiş artı labirent deney düzeneği.

5.3.1.3. Aydınlık Karanlık Kutusu

Aydınlık karanlık kutusu deney düzeneğinin iki bölmesi bulunmaktadır. 110 x 40 cm ölçülerinde aydınlatılan bölme ve karanlık bölme olmak üzere eşit iki bölmeden oluşmaktadır. Bir kapı iki bölmeyi birbirine bağlamaktadır. Deney, sıçanın aydınlatılan bölmeye konulmasıyla başlamıştır ve 5 dakika sürmüştür, bu süre boyunca sıçanların davranışı kamera ile kaydedilmiştir. Deneyler, 20.00-22.00 saatleri arasında yapılmıştır. Her deney sonrası ortam %65 etanol ile silinmiş ve 20 dakika havalandırılmıştır. Aydınlık alanda geçirilen süre, karanlık alanda geçirilen süre, aydınlık karanlık geçiş sayısı değerlendirilmiştir.

5.3.2. Depresyon Testleri

5.3.2.1. Şeker Seçim Testi

Belirli bir çözelti alımının, çözelti ve suyun toplam alımına oranı, tat tercihinin bir ölçüsü olarak kabul edilmektedir (99). Depresyon alanında yapılan birçok çalışma, %1-2 (ağırlık / hacim) süktroz çözeltisinin, farelerin veya sıçanların depresyonda olup olmadığını ayırt etmek için su yanında kemirgenlere sunmak için en uygun derişim olduğunu göstermektedir (99). Bu deneyde sıçanlar, serbest erişimleri olacak şekilde hem % 2derişiminde süktroz çözeltisi bulunan hem de normal su bulunan iki şişe arasında seçime maruz bırakılmıştır. %2 derişiminde süktroz içeren su çözeltisi ve normal su her kafese ayrı iki sulukla konulmuştur. Süktrozlu çözelti ve normal su içeren suluklar yeni cisimden korkmanın önlenmesi için 12 saatte bir yer değiştirilmiştir. Her gün saat 12.00'de tüketilen su miktarı, tüketilen süktroz çözeltisi miktarı ölçülmüştür. Her çözeltinin tüketilen miktarı kaydedilmiş ve şu formülle analiz edilmiştir: Süktroz tercihi (%) = (tüketilen süktroz solüsyonu miktarı / toplam tüketilen sıvı miktarı) × 100 (100). Tüm deney süresince 25 gün boyunca şeker seçim testi uygulanmıştır.

5.3.2.2. Zorunlu Yüzme Testi

Zorunlu yüzme testi düzeneğinde hayvanlar, kaçamayacakları su dolu bir cam tankta yüzdürülmektedir. Test iki aşamadan oluşmaktadır. İlk antrenman denemesi 15 dakika sürmektedir. Ardından 24 saat sonra 5 dakika süren test uygulaması yapılmaktadır. Sıçanın test uygulaması sırasında başını suyun üzerinde tutması için gerekenlerin dışında herhangi bir hareket yapmadan geçirdiği hareketsizlik süresi, yüzme davranışı süresi ve tırmanma davranışı süresi ölçülmektedir. Hareketsizlik, sıçanın su yüzeyinde kalmak için gereken minimum hareketi gerçekleştirdiği zamandır; yüzme, sıçanın su tankı içinde yatay olarak hareket ettiği zamandır ve tırmanma, sıçan duvarlara tırmanmaya çalışırken ön ayakların aktif olarak su yüzeyini kırdığı zamandır (101). Yüzme davranışının seçici serotonin geri alım inhibitörleri tarafından arttığı, tırmanma davranışının seçici norepinefrin geri alım inhibitörleri ile arttığı gösterildiğinden, yüzme ve tırmanma davranışlarının süresi ayrı ayrı ölçülmektedir. Deney düzeneğinde 30 cm su derinliği sağlanarak, sıçanların ayaklarıyla dibe dokunması ve kendilerini desteklemesi engellenmektedir (102). Zorunlu yüzme testi 1977 yılında tanımlanmıştır. 1996 yılında modifiye edilen şekliyle uygulanmıştır (103). Deneyde 50 cm yüksekliği, 25 cm genişliği olan dikdörtgen cam su tankı kullanılmıştır. Sıcaklığı 25 derece olan su ile doldurulmuştur. Her deneyden sonra tanktaki su değiştirilmiştir. Deney, kamera ile kaydedilmiştir. Tüm zorunlu yüzme testleri saat 11.00-12.00 arasında yapılmıştır. Her deneyden sonra sıçanlar ısıtıcı yardımıyla kurutulmuş ve kafeslerine alınmıştır.

Hareketsiz kalma süresi, tırmanma süresi, yüzme süresi, toplam hareketlilik süresi, ilk hareketsizliğe geçiş süresi parametreleri değerlendirilmiştir.

5.4. Hematolojik Parametreler

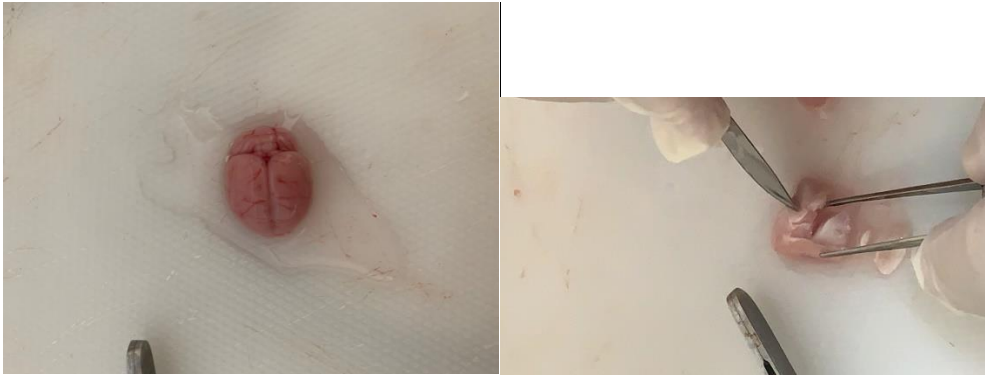
50 mg/kg sodyum tiyopental anestezi uygulaması ve parmak kısırtma testinden cevap alınamaması sonrası sıçanların toraks bölgesi açılarak kalpten 10 ml'lik enjektörle 5-6 ml kan örneği alınmıştır. Bu kanın 2 ml' si hematolojik ölçümler için 2 ml' lik K3 EDTA' lı tüpe aktarılmıştır. Kalan miktardan serum elde edilerek kortizol düzeyi ölçümü için saklanmıştır.

Tam kan sayım ölçümü, kan örnekleri alındıktan sonra 2 saat içinde Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Merkez Tanı Laboratuvarı' nda yapılmıştır.

Eritrosit dağılım genişliği (RDW) değeri ölçülmüştür. Periferik kanda ölçülen nötrofil ve lenfosit sayıları birbirine oranlanarak nötrofil-lenfosit oranı hesaplanmıştır.

5.5. Beyin Doku Örneklerinde Moleküler Testler

Sıçanların prefrontal korteks, striatum, talamus, hipokampus beyin bölgeleri ayrı ayrı çıkarılmıştır (Şekil 5.4). Prefrontal korteks, striatum, talamus, hipokampusta; mikroprotein miktarı; inflamasyon ile ilişkili tümör nekroz faktörü- α , interlökin-1 β ; nörotrofik faktör olan BDNF; oksidatif stres belirteçleri ROS, malondialdehit, total antioksidan seviyesi, total oksidan seviyesi ve kortizol düzeyleri değerlendirilmiştir.



Şekil 5.4. Beyin doku örneklerinin diseksiyonu.

5.5.1. Doku Homojenizasyonu

Diseke edilmiş beyin bölgeleri 1,5 ml' lik kapaklı tüplere alınmıştır. Analiz yapılncaya kadar -80 °C' de muhafaza edilmiştir. Homojenizasyon için fosfat tamponu kullanılmıştır. Derin dondurucudan çıkarılan dokular homojenizasyon işlemi için tartılarak 1/9 ağırlık hacim oranında; 0,1 gram doku için 0,9 ml 50 mmol fosfat tamponu (pH: 7,40) kullanılarak homojenize edildikten sonra 7000 devir/dakika hızda +4 °C' de 5 dakika boyunca santrifüj edilmiştir. Elde edilen süpernatantta inflamasyon, oksidatif stres belirteçleri, BDNF, kortizol düzeyleri ELISA ve kolorimetrik ölçümlerle değerlendirilmiştir. Protein derişimleri, Bradford yöntemi ile ölçülmüştür.

5.5.2. Moleküler Testler

5.5.2.1. Total Antioksidan Seviye (TAS)

Örneklerdeki TAS düzeyi, ticari kit ile (Katalog no: RL0017, Rel Assay, Türkiye) spektrofotometrede kolorimetrik olarak ölçülmüştür. Erel tarafından geliştirilen metod kullanılarak ölçümler yapılmıştır (104). Ölçümlerde üreticinin talimatları takip edilmiştir. Testin prensibi 660 nm' de absorbands değışiminin numunenin toplam antioksidan seviyesi ile ilişkili olmasına dayanmaktadır. Trolox eşdeğeri olarak adlandırılan stabil bir antioksidan standart solüsyonla kalibre edilmektedir.

Mikroplaka kuyucuklarına 18 µl örnek veya standart eklenmiştir. Üzerilerine 300 µl reaktif 1 (R1) maddesi ilave edilmiştir. 30 saniye bekledikten sonra mikroplaka okuyucu cihazında 660 nm dalga boyunda birinci okuma yapılmış, birinci absorbands değeri (A1) ölçülmüştür. 45 µl R2 maddesi eklendikten sonra 37°C' de 5 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında 660 nm dalga boyunda ikinci okuma yapılmış, A2 ölçülmüştür. TAS, mmol/l olarak hesaplanması için aşağıdaki formül kullanılmıştır:

$$A2-A1 = \Delta \text{ Abs Örnek veya Standart}$$

$$\text{Sonuç} = \frac{(\Delta \text{ Abs H}_2\text{O} - \Delta \text{ Abs Örnek})}{(\Delta \text{ Abs H}_2\text{O} - \Delta \text{ Abs Standart})}$$

5.5.2.2. Total Oksidan Seviye (TOS)

Örneklerdeki TOS düzeyi, ticari kit ile (Katalog no: RL0024, Rel Assay, Türkiye) spektrofotometrede kolorimetrik olarak ölçülmüştür. Erel tarafından geliştirilen metod uygulanarak yapılmıştır (105). Ölçümlerde üreticinin talimatları takip edilmiştir. Testin prensibi örnekte bulunan oksidanların, demir iyonu-şelatör kompleksini demir iyonuna oksitlemesine dayanmaktadır.

Mikroplaka kuyucuklarına 45 µl örnek veya standart eklenmiştir. Üzerine 300 µl R1 maddesi eklenmiştir. 30 saniye bekledikten sonra mikroplaka okuyucu cihazında 530 nm dalga boyunda birinci okuma yapılmış, A1 ölçülmüştür. 15 µl R2 maddesi eklendikten sonra 37°C'de 5 dakika inkübe edilmiş, sonrasında 530 nm dalga boyunda ikinci okuma yapılmış, A2 değeri ölçülmüştür. TOS, µmol/l olarak aşağıdaki formül ile hesaplanmıştır:

$$A2-A1 = \Delta \text{ Abs Örnek veya Standart}$$

$$\text{Sonuç} = \frac{(\Delta \text{ Abs Örnek})}{(\Delta \text{ Abs Standart})} \times 10^{\text{standart konsantrasyonu}}$$

5.5.2.3. Oksidatif Stres İndeksi (OSI)

Oksidatif stres indeksi (OSI), toplam oksidan seviyesi değerinin (TOS), toplam antioksidan seviyesi değerine (TAS) bölünmesi ile hesaplanmıştır (106). Hesaplanması için elde edilen TAS birimi µmol/l' ye dönüştürülmüştür.

$$\text{OSI} = \text{TOS} (\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ eşdeğeri/l}) / \text{TAS} (\mu\text{mol Trolox eşdeğeri/l})$$

5.5.2.4. Malondialdehit (MDA)

Reaktif oksijen ürünleri gibi serbest radikaller, hücrelerde lipitlere etki ederek lipidlerin peroksidasyonuna neden olmaktadır ve bunun sonucunda malondialdehit (MDA) gibi oldukça reaktif ürünler oluşmaktadır (107). Lipid peroksidasyonu, MDA gibi ikincil ürünlerin ölçümü ile dolaylı olarak değerlendirilmektedir. MDA' nın tiyobarbitürik asit (TBA) yöntemi ile analizi, lipid peroksidasyonunun değerlendirilmesi için yaygın olarak kullanılmaktadır. MDA-

TBA eklentisini oluşturmak için numunenin asidik koşullar altında ısıtılmasına dayanan bir spektrofotometrik testtir (108).

Doku homojenatlarında MDA miktarı, kolorimetrik kit (Otto Scientific, Katalog no: Otto1001) kullanılarak ölçülmüştür. Doku örneklerinde MDA miktarı, 90-100 °C' de TBA ile reaksiyona dayanan yöntemle belirlenmiştir. TBA test reaksiyonunda, MDA veya MDA benzeri maddeler ve TBA, 532 nm'de maksimum absorpsiyon ile reaksiyona girmekte ve pembe pigment üretmektedir. Reaksiyon, pH 2-3'te 90 °C' de 15 dakika boyunca gerçekleştirilmiştir. Numune, proteinin çökmesi için iki hacim soğuk %10 (ağırlık/hacim) trikloroasetik asit ile karıştırılmıştır. Çökelti, santrifüjleme ile topak haline getirilmiş ve süpernatantın bir aliquatı, kaynar su banyosunda 10 dakika boyunca eşit hacimde %0,67 (ağırlık/hacim) TBA ile reaksiyona sokulmuştur. Soğutulduktan sonra absorbans 532 nm' de okunmuştur. Sonuçlar nmol/g protein olarak ifade edilmiştir.

5.5.2.5. Protein Karbonil

Protein Karbonil Kolorimetrik Test Kiti (Elabscience, ABD, Katalog no: E-BC-K117-S) kullanılarak ölçülmüştür. Üreticinin talimatları uygulanmıştır. Oksidasyondan sonra protein karbonil içeriği artmış ve karbonil grubu 2,4-dinitrofenilhidrazin ile reaksiyona girerek kırmızımsı kahverengi bir çökelti oluşturmuştur. Absorbans, çökelti çözüldükten sonra 370 nm'de ölçülmüştür. Karbonil içeriği dolaylı olarak hesaplanmıştır. Birimi nmol/mg' dir.

5.5.2.6. Reaktif Oksijen Ürünleri (ROS)

Doku homojenatlarında ROS miktarı ticari ELISA kiti (Bioassay Technology Laboratory, Katalog no: E0900Ra) ile üreticinin talimatları doğrultusunda ölçülmüştür. Plaka, insan ROS modülatörü antikoru ile önceden kaplanmıştır. Numunede bulunan ROS modülatörü eklenmiş ve kuyucuklarda kaplanmış antikorlara bağlanmıştır. Daha sonra biyotinlenmiş ROS modülatörü eklenmiş ve numunedekine bağlanmıştır. Daha sonra Streptavidin-HRP eklenmiş ve biyotinlenmiş antikora bağlanmıştır. İnkübasyondan sonra bağlanmamış Streptavidin-HRP yıkanarak uzaklaştırılmıştır. Daha sonra substrat solüsyonu eklenmiş ve İnsan ROS modülatörü miktarıyla orantılı olarak renk gelişmiştir. Reaksiyon, asidik durdurma solüsyonunun eklenmesiyle sonlandırılmış ve 450 nm'de absorbans ölçülmüştür. Birimi ng/l' dir.

5.5.2.7. Beyin Kaynaklı Natriüretik Faktör (BDNF)

Doku örneklerinde BDNF miktarı ticari ELISA kiti (Elabscience, Katalog no: E-EL-R1235) kullanılarak üreticinin talimatnamesi doğrultusunda ölçülmüştür. Bu kitte sağlanan mikro ELISA plakası, sıçan BDNF' ye özgü bir antikorla önceden kaplanmıştır. Standartlar ve örnekler, mikro ELISA plaka kuyucuklarına eklenmiş ve spesifik antikor ile birleştirilmiştir. Daha sonra sıçan BDNF ve Avidin-HRP konjugatına özgü biyotinlenmiş antikor, her bir mikro plaka kuyucuğuna art arda eklenip ve inkübe edilmiştir. Serbest bileşenler yıkanmıştır. Substrat çözeltisi her kuyucuğa eklenmiştir. Yalnızca sıçan BDNF, biyotinlenmiş saptama antikoru ve Avidin-HRP konjugatı içeren kuyucuklar mavi renkte görünmüştür. Enzim-substrat reaksiyonu, durdurma solüsyonunun eklenmesiyle sonlandırılmış ve renk sararmıştır. Optik yoğunluk, 450 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçülmüştür. Optik yoğunluk değeri, sıçan BDNF konsantrasyonu ile orantılıdır. Numunelerin optik yoğunluğu standart eğriyle karşılaştırılarak numunelerdeki BDNF konsantrasyonu pg/ml olarak hesaplanmıştır.

5.5.2.8. Tümör Nekroz Faktör Alfa (TNF- α)

Doku örneklerinde TNF- α miktarı ticari ELISA kiti (Elabscience, Katalog no: E-EL-R0019) kullanılarak üreticinin talimatları takip edilerek ölçülmüştür. Bu kitte sağlanan mikro ELISA plakası, sıçan TNF- α 'ya özgü bir antikorla önceden kaplanmıştır. Standartlar veya numuneler, mikro ELISA plaka kuyucuklarına eklenmiş ve spesifik antikor ile birleştirilmiştir. Daha sonra sıçan TNF- α ve Avidin-HRP konjugatına özgü biyotinlenmiş saptama antikoru, her bir mikro plaka kuyusuna art arda eklenmiş ve inkübe edilmiştir. Serbest bileşenler yıkanmıştır. Substrat çözeltisi her kuyucuğa eklenmiştir. Yalnızca sıçan TNF- α , biyotinlenmiş saptama antikoru ve Avidin-HRP konjugatı içeren oyuklar mavi renkte görülmüştür. Enzim-substrat reaksiyonu, durdurma solüsyonunun eklenmesiyle sonlandırılmış ve renk sararmıştır. Optik yoğunluk, 450 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçülmüştür. Optik yoğunluk değeri, sıçan TNF- α derişimi ile orantılıdır. Numunelerin optik yoğunluk değeri standart eğriyle karşılaştırılarak numunelerdeki sıçan TNF- α konsantrasyonu pg/ml olarak hesaplanmıştır.

5.5.9. İnterlökin 1 Beta (IL-1 β)

Doku örneklerinde IL-1 β miktarı ticari ELISA kiti (Elabscience, Katalog no: E-EL-R0012) kullanılarak üreticinin talimatları takip edilerek ölçülmüştür. Bu kitte sağlanan mikro ELISA plakası, sıçan IL-1 β ' ye özgü antikorla önceden kaplanmıştır. Standartlar ve örnekler, mikro ELISA plaka kuyucuklarına eklenmiş ve spesifik antikor ile birleştirilmiştir. Daha sonra sıçan IL-1 β ve Avidin-HRP konjugatına özgü biyotinlenmiş saptama antikoru, her mikro plaka kuyucuğuna art arda eklenmiş ve inkübe edilmiştir. Serbest bileşenler yıkanmıştır. Substrat çözeltisi her kuyuya eklenmiştir. Yalnızca sıçan IL-1 β , biyotinlenmiş saptama antikoru ve Avidin-HRP konjugatı içeren oyuklar mavi renkte görünmüştür. Enzim-substrat reaksiyonu, durdurma solüsyonunun eklenmesiyle sonlandırılmış ve renk sararmıştır. Optik yoğunluk, 450 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçülmüştür. Optik yoğunluk değeri, sıçan IL-1 β derişimi ile orantılıdır. Numunelerin optik yoğunluğu, standart eğriyle karşılaştırılarak numunelerdeki IL-1 β konsantrasyonu pg/ml olarak hesaplanmıştır.

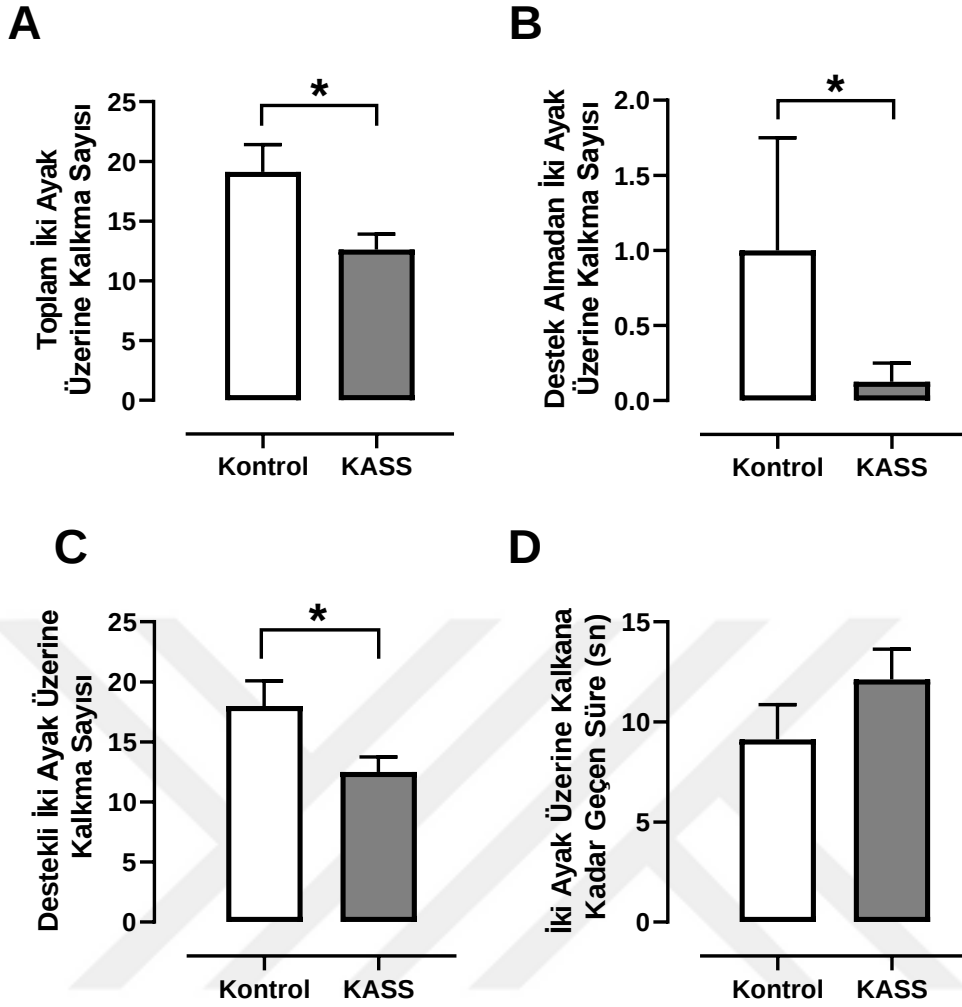
5.6. İstatistiksel Yöntemler

İstatistiksel analizler için GraphPad Prism programı kullanılmıştır. Kontrol grubu ve kronik aralıklı soğuk stres grubu olarak 2 bağımsız grup bulunduğu için, dağılımın parametrik olup olmamasına göre t test veya Mann-Whitney U testinden biri seçilmiştir. Grupların normal dağılıma uyup uymadığı Shapiro-Wilk Testi ile ölçülmüştür. Normal dağılıma uymayan parametreler için farkın istatistiksel anlamlılığını ölçmede parametrik olmayan Mann-Whitney U Testi kullanılmış, sonuçlar median ve interquartile range olarak verilmiştir. Normal dağılım gösteren parametreler için farkın istatistiksel anlamlılığını ölçmede t testi kullanılmıştır. Sonuçlar ortalama $\pm$ SEM (*standard error of mean*) olarak verilmiştir. Moleküler bulgular ve davranış testleri arasında ilişkinin olup olmadığı Pearson korelasyon analizi ile test edilmiştir. İstatistiksel anlamlılık için p değerinin 0,05' ten küçük olması kabul edilmiştir.

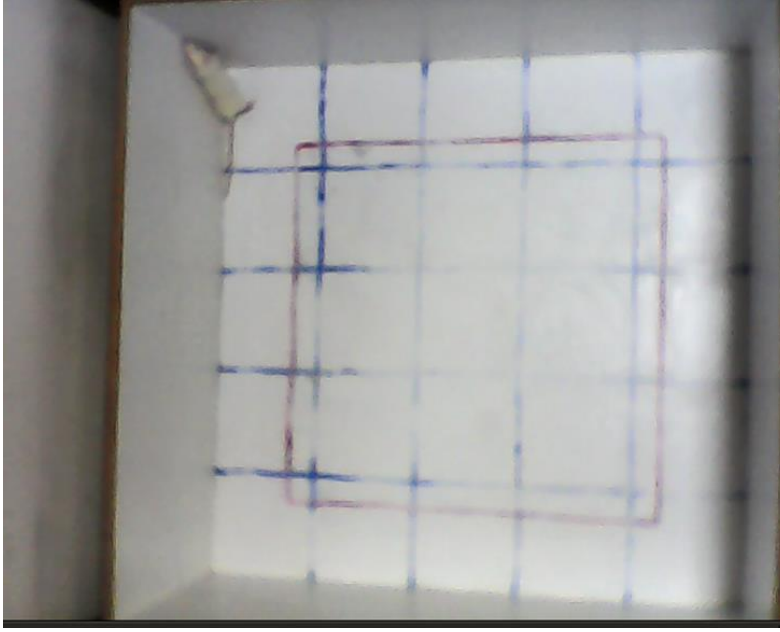
6. BULGULAR

6.1. Açık Alan Testi Bulguları

Açık alan test düzeneğine yerleştirilen hayvanların toplam iki ayak üzerine kalkma davranışı sayıları değerlendirildiğinde kontrol grubunda toplam iki ayak üzerine kalkma sayısı $19,1 \pm 2,2$, soğuk stres grubunda ortalama iki ayak üzerine kalkma sayısı $12,6 \pm 1,2$ olarak bulunmuştur (Şekil 6.1A). Stres grubunda iki ayak üzerine kalkma sayısı kontrol grubuna göre istatistiksel olarak azalmıştır ($p < 0,05$). Destek almadan iki ayak üzerine kalkma davranışı sayıları değerlendirildiğinde kontrol grubunda median değer 1, soğuk stres grubunda median değer 0 bulunmuştur (Şekil 6.1B). Stres grubunda destek almadan iki ayak üzerine kalkma sayısı kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı azalmıştır ($p < 0,05$). Destekli iki ayak üzerine kalkma davranışı sayısı Şekil 6.1C’ de görülmektedir. Kontrol grubunda ortalama destekli olarak iki ayak üzerine kalkma davranışı sayısı $18 \pm 2,0$ soğuk stres grubunda ortalama destekli olarak iki ayak üzerine kalkma davranışı sayısı $12,5 \pm 1,2$ olarak bulunmuştur. Soğuk stres grubunda kontrol grubuna göre destekli olarak iki ayak üzerine kalkma sayısı anlamlı olarak azalmıştır ($p < 0,05$). İki ayak üzerine kalkana kadar geçen süre değerlendirildiğinde kontrol grubunda ortalama süre $9,1 \pm 1,7$ saniye, soğuk stres grubunda ortalama süre $12,1 \pm 1,5$ saniye bulunmuştur (Şekil 6.1D). Soğuk stres grubu ve kontrol grubu arasında iki ayak üzerine kalkana kadar geçen süre açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamaktadır. Açık alan testinde sıçanın destekli olarak iki ayak üzerine kalkma davranışı Şekil 6.2’ de gösterilmiştir.

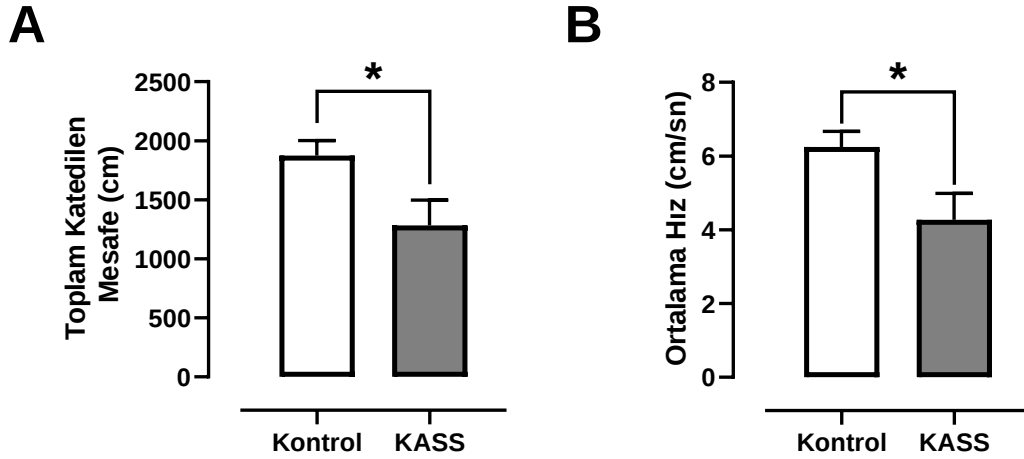


Şekil 6.1. Açık alan testinde kontrol ve kronik aralıklı soğuk stres gruplarında iki ayak üzerine kalkma davranışının incelenmesi, (A) toplam iki ayak üzerine kalkma davranışı sayıları, (B) destek almadan iki ayak üzerine kalkma sayısı, (C) destekli olarak iki ayak üzerine kalkma sayısı, (D) iki ayak üzerine kalkana kadar geçen süre. A, C ve D için grafik değerleri ortalama $\pm$ SEM * $p < 0,05$ şeklinde, B için grafik değerleri median ve interquartile range * $p < 0,05$ şeklinde verilmiştir. KASS: kronik aralıklı soğuk stres grubu.



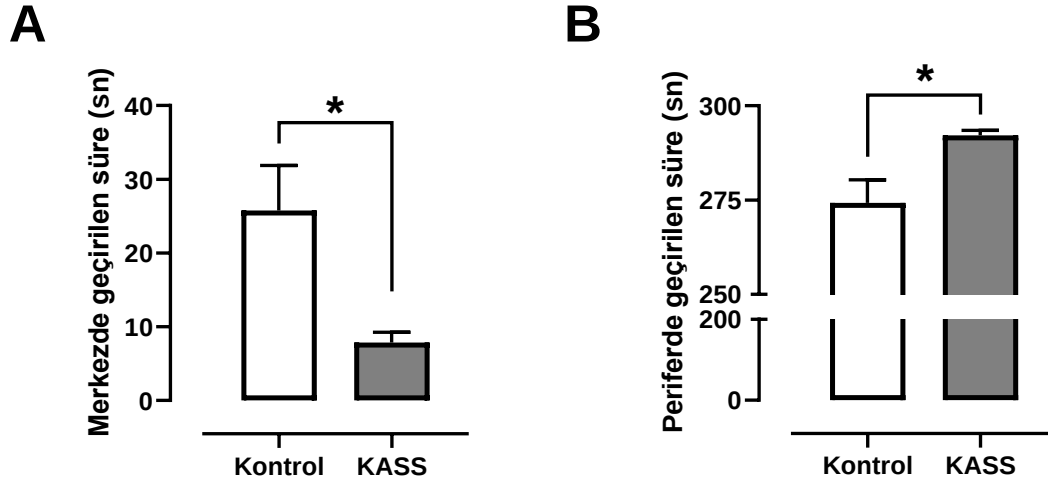
Şekil 6.2. Açık alan testinde sıçanın destekli olarak iki ayak üzerine kalkma davranışı.

Açık alan test düzeneğine yerleştirilen sıçanların toplam kat edilen mesafe parametreleri karşılaştırıldığında kontrol grubunda ortalama toplam katedilen mesafe $1875 \pm 126,7$ santimetre, soğuk stres grubunda ortalama toplam katedilen mesafe $1283 \pm 214,5$ santimetre olarak bulunmuştur (Şekil 6.3A). Soğuk stres grubunda kontrol grubuna göre toplam katedilen mesafe istatistiksel olarak anlamlı azalmıştır ($p < 0,05$). Sıçanların ortalama hız parametreleri karşılaştırıldığında, kontrol grubunda ortalama hız $6,25 \pm 0,42$ cm/sn, soğuk stres grubunda ortalama hız $4,27 \pm 0,71$ cm/sn olarak bulunmuştur (Şekil 6.3B). Soğuk stres grubunda kontrol grubuna göre ortalama hız istatistiksel olarak anlamlı azalmıştır ($p < 0,05$).



Şekil 6.3. Açık alan testinde kontrol ve soğuk stres gruplarında sıçanların (A) toplam katedilen mesafe parametresinin karşılaştırılması, (B) ortalama hız parametresinin karşılaştırılması, grafik değerleri ortalama $\pm$ SEM * $p < 0,05$ şeklinde verilmiştir.

Açık alan test düzeneğine yerleştirilen sıçanların merkezde geçirilen süreleri karşılaştırıldığında kontrol grubunda ortalama merkezde geçirilen süre $25,7 \pm 6,1$ saniye, soğuk stres grubunda ortalama merkezde geçirilen süre $7,8 \pm 1,3$ saniye olarak bulunmuştur (Şekil 6.4A). Soğuk stres grubunda kontrol grubuna göre merkezde geçirilen süre istatistiksel olarak anlamlı azalmıştır ($p < 0,05$). Sıçanların periferde geçirilen süre karşılaştırıldığında kontrol grubunda ortalama periferde geçirilen süre $274,3 \pm 6,1$ saniye, soğuk stres grubunda ortalama periferde geçirilen süre $292,1 \pm 1,3$ saniye olarak bulunmuştur (Şekil 6.4B). Soğuk stres grubunda kontrol grubuna göre periferde geçirilen süre istatistiksel olarak anlamlı uzamıştır ($p < 0,05$). Açık alan testinde sıçanın perifer bölgede hareketsiz kalma davranışı Şekil 6.5’ te gösterilmiştir.

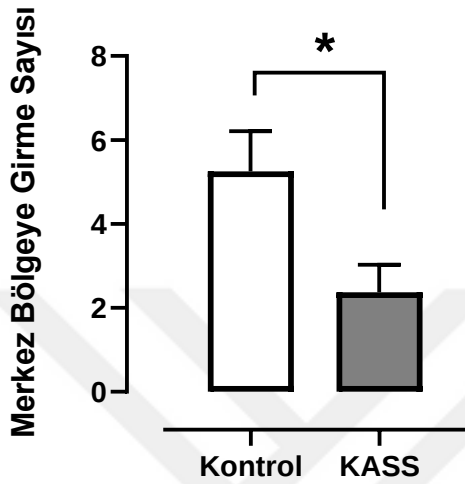


Şekil 6.4. Açık alan testinde kontrol ve soğuk stres gruplarında sıçanların (A) merkezde geçirilen süre, (B) periferde geçirilen sürelerinin karşılaştırılması, grafik değerleri ortalama $\pm$ SEM * $p < 0,05$ şeklinde verilmiştir.



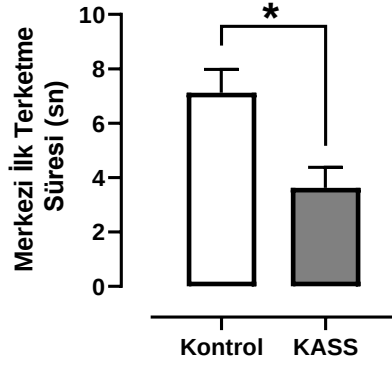
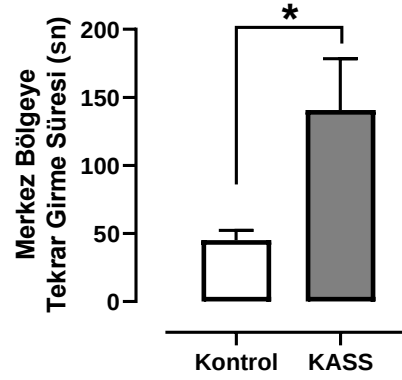
Şekil 6.5. Açık alan testinde sıçanın perifer bölgede hareketsiz kalma davranışı.

Açık alan test düzeneğine yerleştirilen hayvanların merkez bölgeye girme davranışı sayıları karşılaştırması Şekil 6.6’ da görülmektedir. Kontrol grubunda ortalama merkez bölgeye girme davranışı sayısı $5,25 \pm 0,95$, soğuk stres grubunda ortalama merkez bölgeye girme davranışı sayısı $2,37 \pm 0,65$ olarak bulunmuştur. Soğuk stres grubunda kontrol grubuna göre merkez bölgeye girme sayısı istatistiksel olarak anlamlı azalmıştır ($p<0,05$).



Şekil 6.6. Açık alan testinde kontrol ve soğuk stres gruplarında sıçanların merkez bölgeye girme sayılarının karşılaştırılması, grafik değerleri ortalama $\pm$ SEM * $p<0,05$ şeklinde verilmiştir.

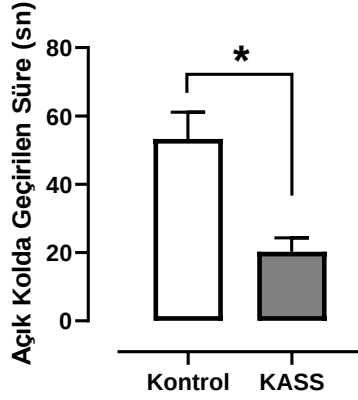
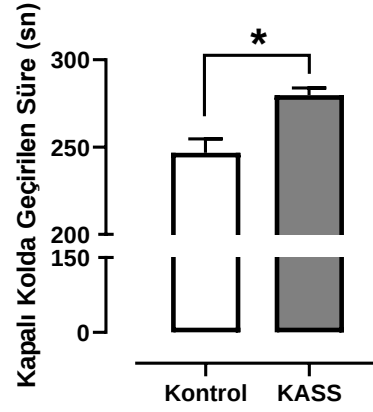
Açık alan test düzeneğine yerleştirilen hayvanların merkez bölgeyi ilk terketme süresi karşılaştırıldığında kontrol grubunda ortalama merkez bölgeyi ilk terketme süresi $7,2 \pm 1,1$ saniye, soğuk stres grubunda ortalama merkez bölgeyi ilk terketme süresi $3,6 \pm 0,7$ saniye olarak bulunmuştur (Şekil 6.7A). Soğuk stres grubunda kontrol grubuna göre merkez bölgeyi ilk terk etme süresi istatistiksel olarak anlamlı uzamıştır ($p<0,05$). Sıçanların merkez bölgeye tekrar girme süresi karşılaştırıldığında kontrol grubunda ortalama merkez bölgeye tekrar girme süresi $45,13 \pm 7,27$ saniye, soğuk stres grubunda ortalama merkez bölgeye tekrar girme süresi $140,8 \pm 37,6$ saniye olarak bulunmuştur (Şekil 6.7B). Soğuk stres grubunda kontrol grubuna göre merkez bölgeye tekrar girme süresi istatistiksel olarak anlamlı uzamıştır ($p<0,05$).

A**B**

Şekil 6.7. Açık alan testinde kontrol ve soğuk stres gruplarında sıçanların (A) merkezi ilk terketme süresi, (B) merkez bölgeye tekrar girme süresi, grafik değerleri ortalama $\pm$ SEM * $p < 0,05$ şeklinde verilmiştir.

6.2. Yükseltilmiş Artı Labirent Test Bulguları

Yükseltilmiş artı labirent test düzeneğine yerleştirilen hayvanların açık kolda geçirilen süreleri karşılaştırıldığında kontrol grubunda ortalama açık kolda geçirilen süre $53,25 \pm 7,89$ saniye, soğuk stres grubunda ortalama açık kolda geçirilen süre $20,25 \pm 4,05$ saniye olarak bulunmuştur (Şekil 6.8A). Soğuk stres grubunda kontrol grubuna göre açık kolda geçirilen süre istatistiksel olarak anlamlı azalmıştır ($p < 0,05$). Hayvanların kapalı kolda geçirilen süreleri karşılaştırıldığında kontrol grubunda ortalama kapalı kolda geçirilen süre $246,8 \pm 7,8$ saniye, soğuk stres grubunda ortalama kapalı kolda geçirilen süre $279,8 \pm 4,0$ saniye olarak bulunmuştur (Şekil 6.8B). Soğuk stres grubunda kontrol grubuna göre kapalı kolda geçirilen süre istatistiksel olarak anlamlı uzamıştır ($p < 0,05$). Yükseltilmiş artı labirent testinde sıçanın açık kolda gözlenmesi Şekil 6.9’ da gösterilmiştir.

A**B**

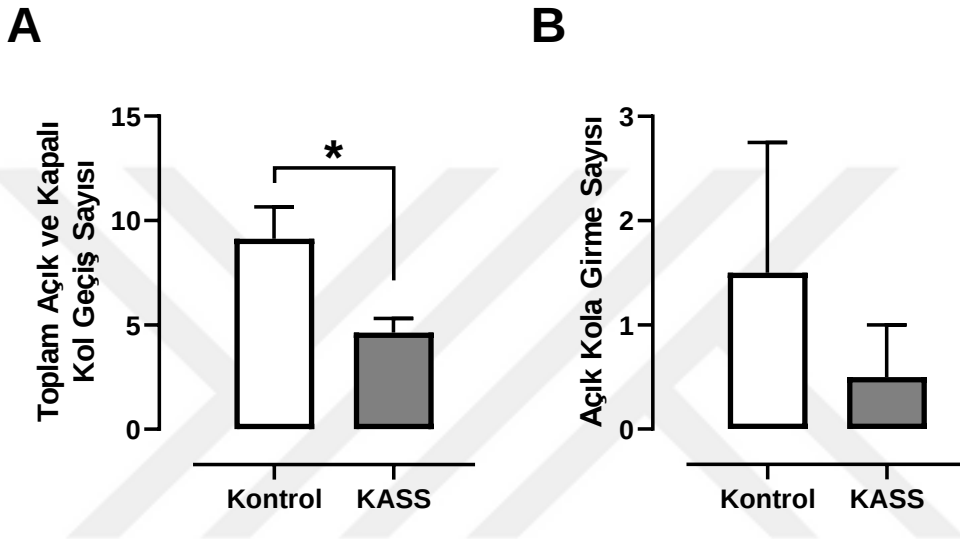
Şekil 6.8. Yükseltilmiş artı labirent testinde kontrol ve soğuk stres gruplarında sıçanların (A) açık kolda geçirilen süre, (B) kapalı kolda geçirilen süre, grafik değerleri ortalama $\pm$ SEM * $p < 0,05$ şeklinde verilmiştir.



Şekil 6.9. Yükseltilmiş artı labirent testinde sıçanın açık kolda gözlenmesi.

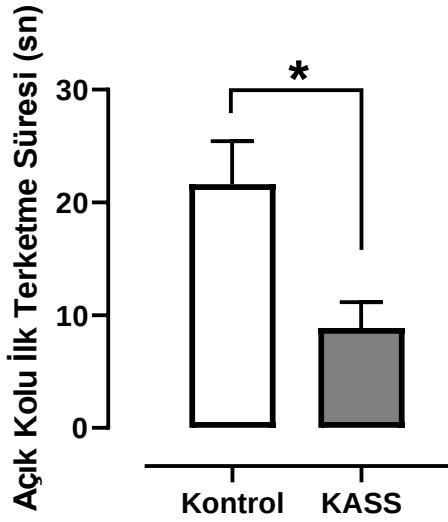
Yükseltilmiş artı labirent test düzeneğine yerleştirilen hayvanların toplam açık ve kapalı kol geçiş sayıları karşılaştırıldığında kontrol grubunda ortalama toplam açık ve kapalı kol

geçiş sayısı $9,12 \pm 1,52$, soğuk stres grubunda ortalama açık ve kapalı kol geçiş sayısı $4,62 \pm 0,67$ olarak bulunmuştur (Şekil 6.10A). Soğuk stres grubunda kontrol grubuna göre toplam açık ve kapalı kol geçiş sayısı istatistiksel olarak anlamlı azalmıştır ($p<0,05$). Hayvanların açık kola girme sayısı karşılaştırıldığında kontrol grubunda açık kola girme sayısı median değeri 1,5, soğuk stres grubunda açık kola girme sayısı median değeri 0,5 olarak bulunmuştur (Şekil 6.10B). Kontrol grubu ve soğuk stres grubu arasında açık kola girme sayısı açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamaktadır.



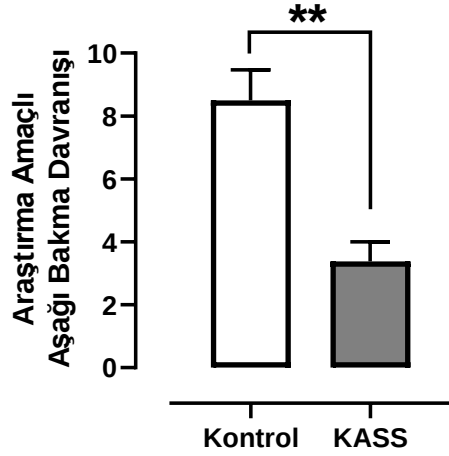
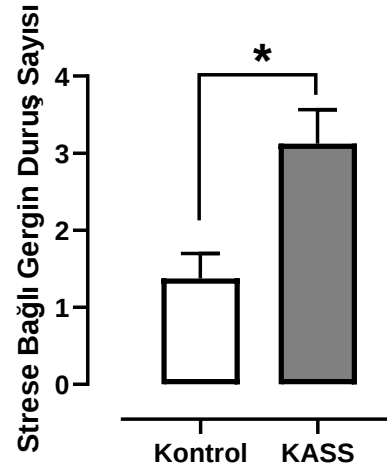
Şekil 6.10. Yükseltilmiş artı labirent testinde kontrol ve soğuk stres gruplarında sıçanların (A) toplam açık ve kapalı kol geçiş sayısı, (B) açık kola girme sayısı, A için grafik değerleri ortalama $\pm$ SEM * $p<0,05$ şeklinde, B için grafik değerleri median ve interquartil range * $p<0,05$ şeklinde verilmiştir.

Yükseltilmiş artı labirent test düzeneğine yerleştirilen hayvanların açık kolu ilk terketme süreleri değerlendirildiğinde kontrol grubunda açık kolu ilk terketme süresi $21,63 \pm 3,81$ saniye, soğuk stres grubunda açık kolu ilk terketme süresi $8,87 \pm 2,27$ olarak bulunmuştur (Şekil 6.11). Soğuk stres grubunda kontrol grubuna göre açık kolu ilk terketme süresi istatistiksel olarak anlamlı azalmıştır ($p<0,05$).



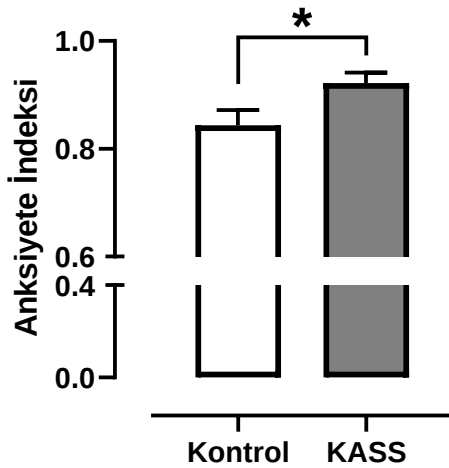
Şekil 6.11. Yükseltilmiş artı labirent testinde kontrol ve soğuk stres gruplarında sıçanların açık kolu ilk terketme süresi, grafik değerleri ortalama $\pm$ SEM * $p < 0,05$ şeklinde verilmiştir.

Yükseltilmiş artı labirent test düzeneğine yerleştirilen hayvanların araştırma amaçlı aşağı bakma davranışı sayıları değerlendirildiğinde kontrol grubunda araştırma amaçlı aşağı bakma davranışı sayısı $8,5 \pm 0,9$, soğuk stres grubunda araştırma amaçlı aşağı bakma davranışı sayısı $3,37 \pm 0,62$ olarak bulunmuştur (Şekil 6.12A). Soğuk stres grubunda kontrol grubuna göre araştırma amaçlı aşağı bakma davranışı sayısı istatistiksel olarak anlamlı azalmıştır ($p < 0,001$). Hayvanların strese bağlı gergin duruş sayıları değerlendirildiğinde kontrol grubunda strese bağlı gergin duruş sayısı $1,37 \pm 0,32$, soğuk stres grubunda strese bağlı gergin duruş sayısı $3,12 \pm 0,44$ olarak bulunmuştur (Şekil 6.12B). Soğuk stres grubunda kontrol grubuna göre strese bağlı gergin duruş sayısı istatistiksel olarak anlamlı azalmıştır ($p < 0,05$).

A**B**

Şekil 6.12. Yükseltilmiş artı labirent testinde kontrol ve soğuk stres gruplarında sıçanların (A) araştırma amaçlı aşağı bakma davranışı, (B) strese bağlı gergin duruş sayısı, grafik değerleri ortalama $\pm$ SEM * $p < 0,05$ ** $p < 0,001$ şeklinde verilmiştir.

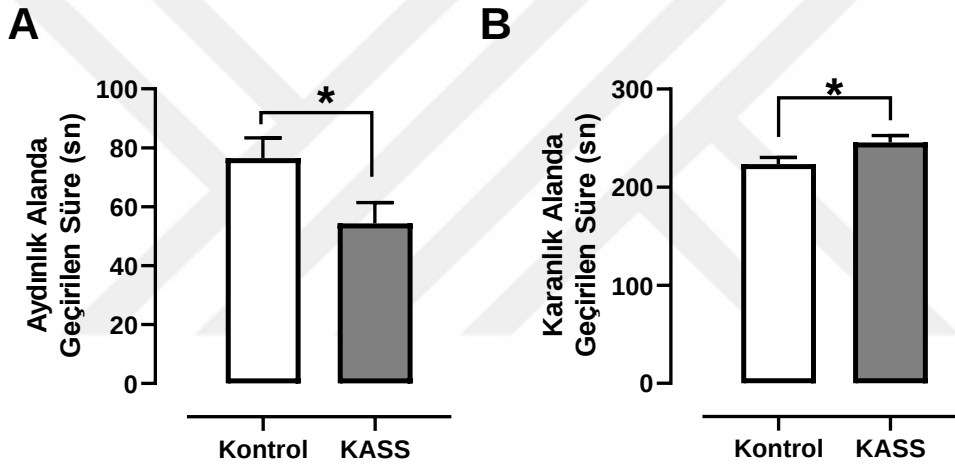
Yükseltilmiş artı labirent test düzeneğine yerleştirilen hayvanların anksiyete indeksi hesaplandığında kontrol grubunda anksiyete indeksi $0,84 \pm 0,02$, soğuk stres grubunda anksiyete indeksi $0,92 \pm 0,01$ olarak bulunmuştur (Şekil 6.13). Soğuk stres grubunda kontrol grubuna göre anksiyete indeksi istatistiksel olarak anlamlı artmıştır ($p < 0,05$).



Şekil 6.13. Yükseltilmiş artı labirent testinde kontrol ve soğuk stres gruplarında sıçanların anksiyete indeksi, grafik değerleri ortalama $\pm$ SEM * $p < 0,05$ şeklinde verilmiştir.

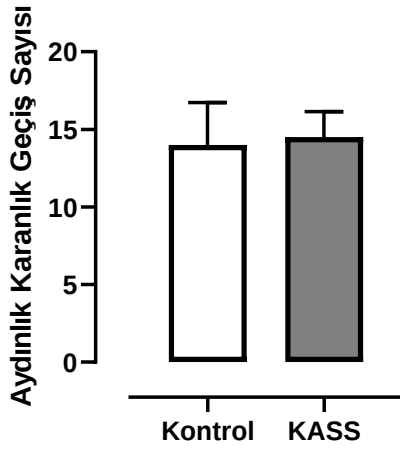
6.3. Aydınlik Karanlık Kutusu Testi

Aydınlık karanlık kutusu test düzeneğine yerleştirilen hayvanların aydınlık alanda geçirilen süresi değerlendirildiğinde kontrol grubunda aydınlık alanda geçirilen süre $76,5 \pm 6,9$ saniye, soğuk stres grubunda aydınlık alanda geçirilen süre $54,38 \pm 6,99$ saniye olarak bulunmuştur (Şekil 6.14A). Soğuk stres grubunda kontrol grubuna göre aydınlık alanda geçirilen süre istatistiksel olarak anlamlı azalmıştır ($p < 0,05$). Hayvanların karanlık alanda geçirilen süresi değerlendirildiğinde kontrol grubunda karanlık alanda geçirilen süre $223,5 \pm 6,9$ saniye, soğuk stres grubunda karanlık alanda geçirilen süre $245,6 \pm 6,9$ saniye olarak bulunmuştur (Şekil 6.14B). Soğuk stres grubunda kontrol grubuna göre karanlık alanda geçirilen süre istatistiksel olarak anlamlı artmıştır ($p < 0,05$).



Şekil 6.14. Aydınlik karanlık kutusu testinde kontrol ve soğuk stres gruplarında sıçanların (A) aydınlık alanda geçirilen süre, (B) karanlık alanda geçirilen süre, grafik değerleri ortalama $\pm$ SEM * $p < 0,05$ şeklinde verilmiştir.

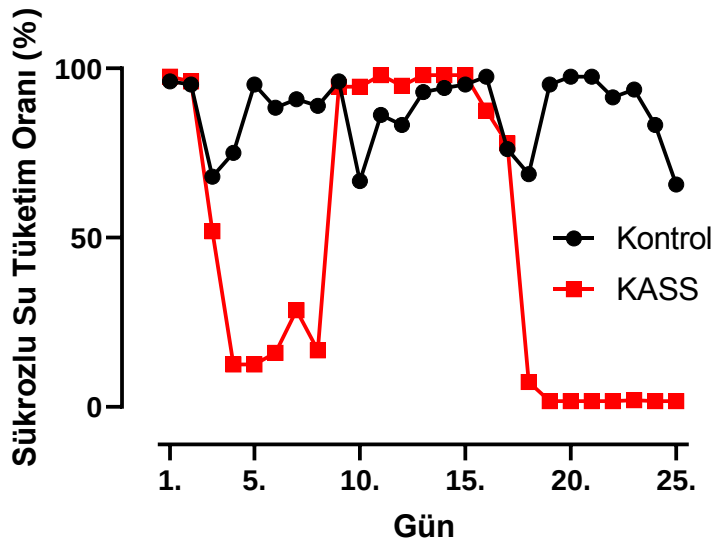
Aydınlık karanlık kutusu test düzeneğine yerleştirilen hayvanların aydınlık karanlık geçiş sayısı değerlendirildiğinde kontrol grubunda aydınlık karanlık geçiş sayısı $14,0 \pm 2,7$, soğuk stres grubunda aydınlık karanlık geçiş sayısı $14,50 \pm 1,63$ olarak bulunmuştur (Şekil 6.15). Soğuk stres ve kontrol grubu arasında aydınlık karanlık geçiş sayısı açısından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır.



Şekil 6.15. Aydınlik karanlık kutusu testinde kontrol ve soğuk stres gruplarında sıçanların aydınlık karanlık geçiş sayısı, grafik değerleri ortalama $\pm$ SEM şeklinde verilmiştir.

6.4. Şeker Seçim Testi

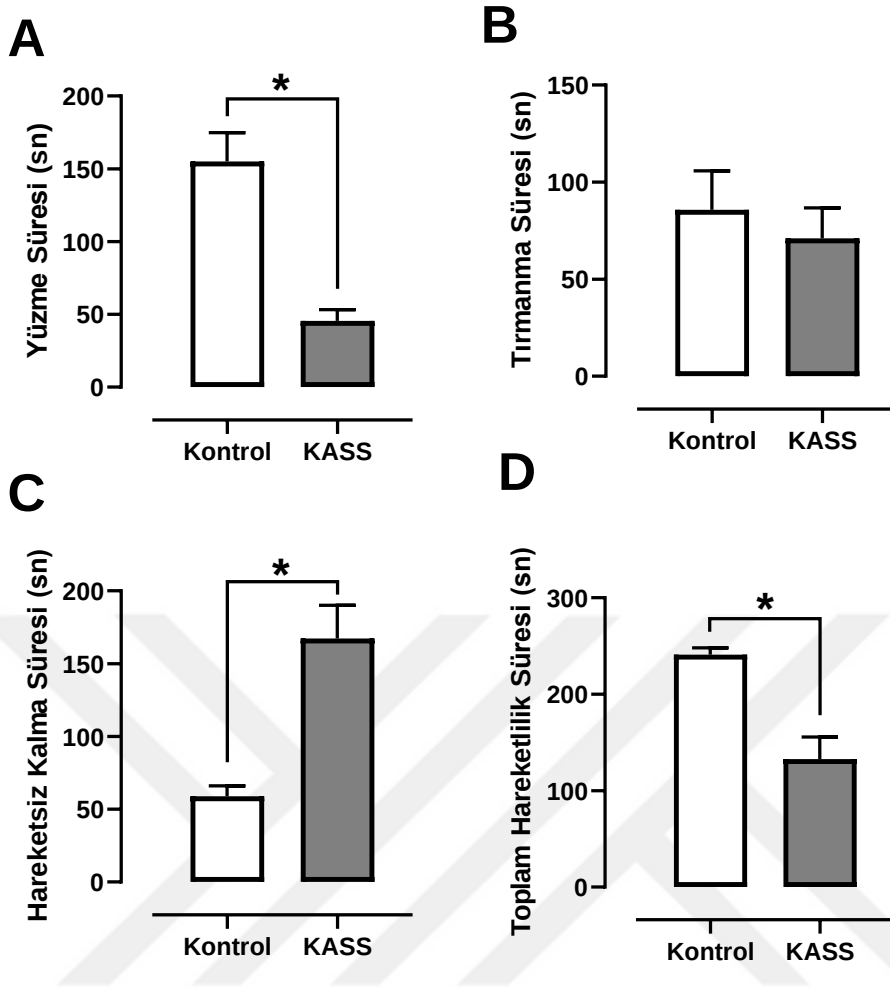
Şeker seçim testi uygulanan hayvanların sükrözlu su tüketim yüzdeleri değerlendirildiğinde kontrol grubunda tüm günlerde sükrözlu su tüketim oranı %65' in üzerinde olduğu görülmektedir. Soğuk stres grubunda sükrözlu su tüketim oranı 3-8. günler arasında ve 18-25. günler arasında %65' in altında bulunmuştur (Şekil 6.16).



Şekil 6.16. Şeker seçim testinde kontrol ve soğuk stres gruplarında sıçanların günlük takipte sükrözlu su tüketim oranı.

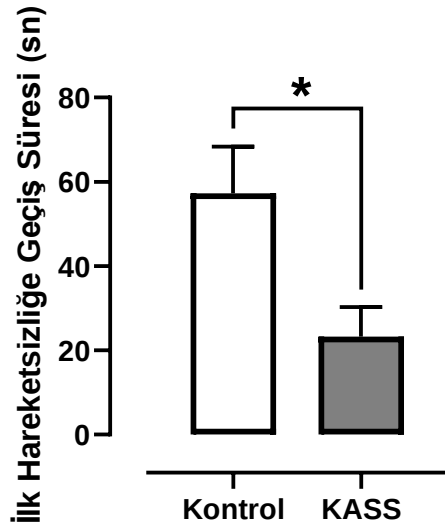
6.5. Zorunlu Yüzme Testi

Zorunlu yüzme testinde hayvanların yüzme süresi değerlendirildiğinde kontrol grubunda yüzme süresi $155,1 \pm 19,69$ saniye, soğuk stres grubunda yüzme süresi $45,5 \pm 7,79$ saniye olarak bulunmuştur (Şekil 6.17A). Soğuk stres grubunda kontrol grubuna göre yüzme süresi istatistiksel olarak anlamlı azalmıştır ($p<0,05$). Hayvanların tırmanma süresi değerlendirildiğinde kontrol grubunda tırmanma süresi $85,75 \pm 20,12$ saniye, soğuk stres grubunda tırmanma süresi $71 \pm 15,75$ saniye olarak bulunmuştur (Şekil 6.17B). Soğuk stres ve kontrol gruplarında tırmanma süresi açısından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır. Hayvanların hareketsiz kalma süresi değerlendirildiğinde kontrol grubunda hareketsiz kalma süresi $59 \pm 7,06$ saniye, soğuk stres grubunda hareketsiz kalma süresi $167,3 \pm 22,83$ saniye olarak bulunmuştur (Şekil 6.17C). Soğuk stres grubunda kontrol grubuna göre hareketsiz kalma süresi istatistiksel olarak anlamlı artmıştır ($p<0,05$). Hayvanların toplam hareketlilik süresi değerlendirildiğinde kontrol grubunda toplam hareketlilik süresi $241 \pm 7,06$ saniye, soğuk stres grubunda toplam hareketlilik süresi $132,8 \pm 22,83$ saniye olarak bulunmuştur (Şekil 6.17D). Soğuk stres grubunda kontrol grubuna göre toplam hareketlilik süresi istatistiksel olarak anlamlı azalmıştır ($p<0,05$).



Şekil 6.17. Zorunlu yüzme testinde kontrol ve soğuk stres gruplarında sıçanların (A) yüzme süresi, (B) tırmanma süresi, (C) hareketsiz kalma süresi, (D) toplam hareketlilik süresi, grafik değerleri ortalama $\pm$ SEM * $p < 0,05$ şeklinde verilmiştir.

Zorunlu yüzme testinde hayvanların ilk hareketsizliğe geçiş süresi değerlendirildiğinde kontrol grubunda ilk hareketsizliğe geçiş süresi $57,25 \pm 11,09$ saniye, soğuk stres grubunda ilk hareketsizliğe geçiş süresi $23,25 \pm 7,04$ saniye olarak bulunmuştur (Şekil 6.18). Soğuk stres grubunda kontrol grubuna göre ilk hareketsizliğe geçiş süresi istatistiksel olarak anlamlı azalmıştır ($p < 0,05$). Zorunlu yüzme testinde sıçanların tırmanma ve suyun üzerinde hareketsiz kalma davranışı bulguları Şekil 6.19’de gösterilmiştir.

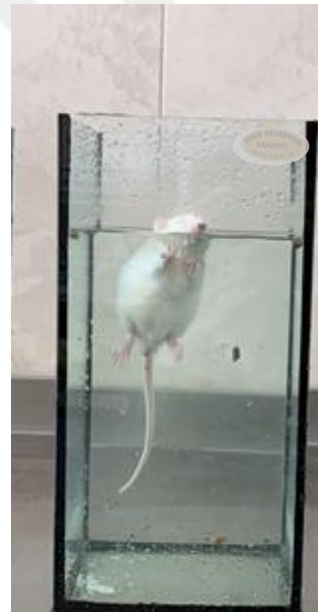


Şekil 6.18. Zorunlu yüzme testinde kontrol ve soğuk stres gruplarında sıçanların ilk hareketsizliğe geçiş süresi, grafik değerleri ortalama $\pm$ SEM * $p < 0,05$ şeklinde verilmiştir.

A



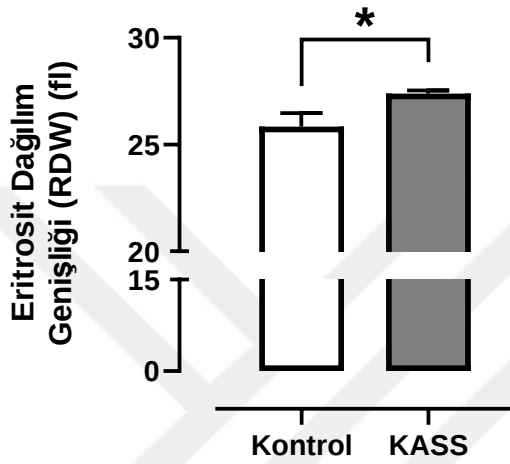
B



Şekil 6.19. Zorunlu yüzme testinde sıçanların (A) tırmanma davranışı, (B) suyun üzerinde hareketsiz kalma davranışı bulguları.

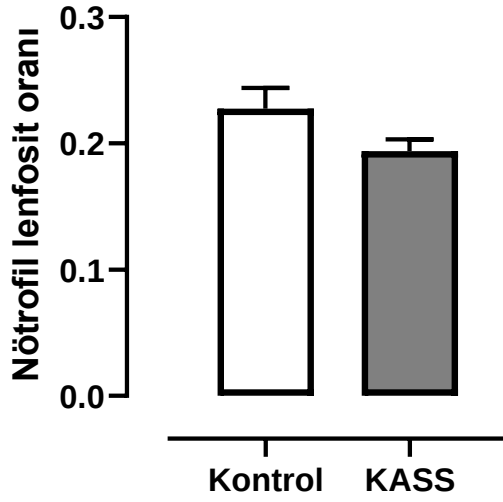
6.6. Hemogram Testi

Kontrol ve soğuk stres grubu sıçanların RDW değerlendirildiğinde kontrol grubu RDW $25,84 \pm 0,63$ fl, soğuk stres grubu RDW $27,39 \pm 0,15$ fl olarak bulunmuştur (Şekil 6.20). Soğuk stres grubunda RDW kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı artmıştır ($p<0,05$).



Şekil 6.20. Kontrol ve soğuk stres gruplarında sıçanların eritrosit dağılım genişliği (RDW), grafik değerleri ortalama $\pm$ SEM * $p<0,05$ şeklinde verilmiştir.

Kontrol ve soğuk stres grubu sıçanların nötrofil lenfosit oranları değerlendirildiğinde kontrol grubu nötrofil lenfosit oranı $0,227 \pm 0,01$, soğuk stres grubu nötrofil lenfosit oranı $0,193 \pm 0,02$ olarak bulunmuştur (Şekil 6.21). Soğuk stres ve kontrol gruplarında nötrofil lenfosit oranı açısından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır.

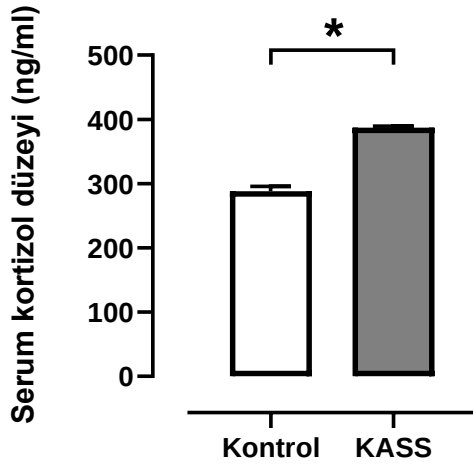


Şekil 6.21. Kontrol ve soğuk stres gruplarında nötrofil lenfosit oranları, grafik değerleri ortalama $\pm$ SEM şeklinde verilmiştir.

6.7. Moleküler Bulgular

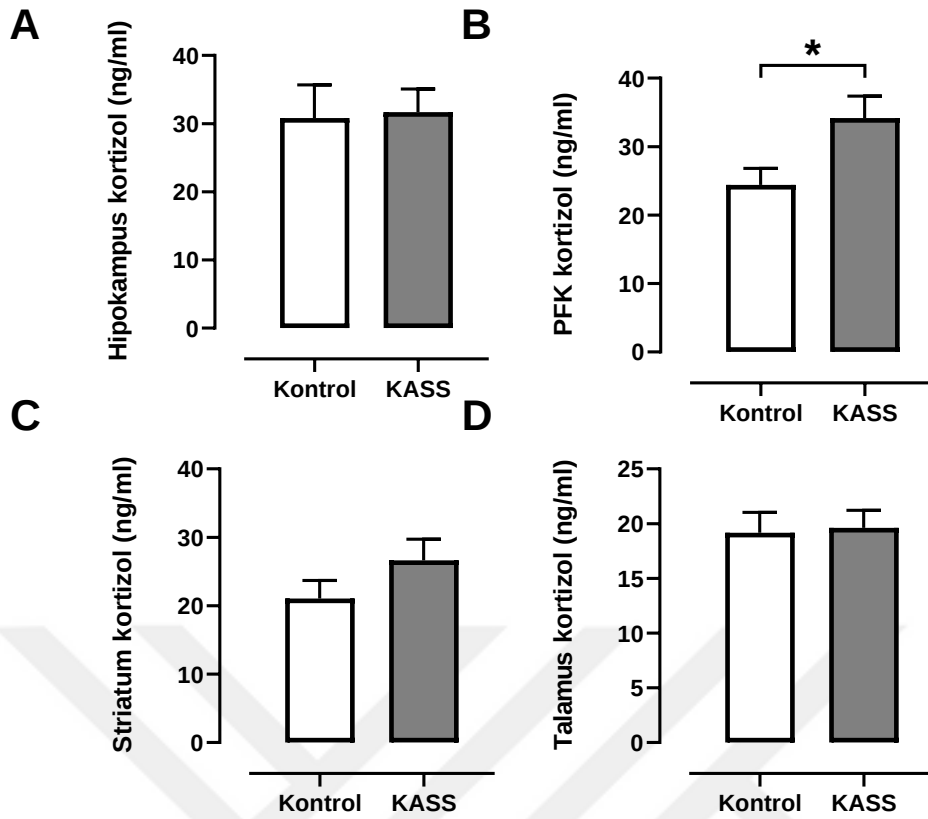
6.7.1. Kortizol Ölçümleri

Kontrol ve soğuk stres grubu sıçanların serum kortizol düzeyleri değerlendirildiğinde kontrol grubu serum kortizol düzeyi $288,2 \pm 7,73$ ng/ml, soğuk stres grubu kortizol düzeyi $387,2 \pm 2,31$ ng/ml olarak bulunmuştur (Şekil 6.22). Soğuk stres grubunda kortizol düzeyi, kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı artmıştır ($p < 0,05$).



Şekil 6.22. Kontrol ve soğuk stres gruplarında sıçanların serum kortizol düzeyi, grafik değerleri ortalama $\pm$ SEM * $p < 0,05$ şeklinde verilmiştir.

Kontrol ve soğuk stres grubu sıçanların hipokampus kortizol düzeyleri değerlendirildiğinde kontrol grubu hipokampus kortizol düzeyi $30,83 \pm 4,84$ ng/ml, soğuk stres grubu hipokampus kortizol düzeyi $31,68 \pm 3,39$ ng/ml olarak bulunmuştur (Şekil 6.23A). Soğuk stres ve kontrol gruplarında hipokampus kortizol düzeyi açısından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır. Kontrol ve soğuk stres grubu sıçanların prefrontal kortekste (PFK) kortizol düzeyleri değerlendirildiğinde kontrol grubu kortizol düzeyi $24,40 \pm 2,43$ ng/ml, soğuk stres grubu kortizol düzeyi $34,18 \pm 3,20$ ng/ml olarak bulunmuştur (Şekil 6.23B). Soğuk stres grubunda prefrontal kortekste kortizol düzeyi, kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı artmıştır ($p < 0,05$). Kontrol ve soğuk stres grubu sıçanların striatumda kortizol düzeyleri değerlendirildiğinde kontrol grubu kortizol düzeyi $21,05 \pm 2,66$ ng/ml, soğuk stres grubu kortizol düzeyi $26,64 \pm 3,10$ ng/ml olarak bulunmuştur (Şekil 6.23C). Soğuk stres ve kontrol gruplarında striatum kortizol düzeyi açısından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır. Kontrol ve soğuk stres grubu sıçanların talamus kortizol düzeyleri değerlendirildiğinde kontrol grubu kortizol düzeyi $19,17 \pm 1,85$ ng/ml, soğuk stres grubu kortizol düzeyi $19,62 \pm 1,59$ ng/ml olarak bulunmuştur (Şekil 6.23D). Soğuk stres ve kontrol gruplarında talamus kortizol düzeyi açısından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır.

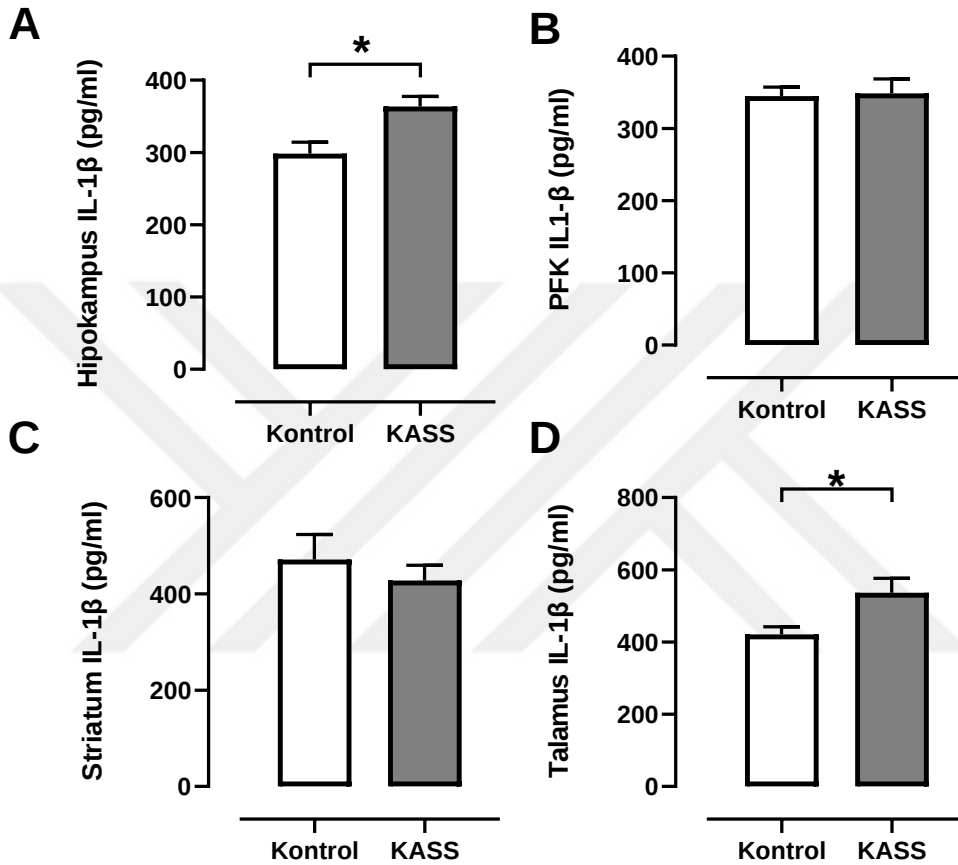


Şekil 6.23. Kontrol ve soğuk stres gruplarında sıçanların (A) hipokampus, (B) prefrontal korteks, (C) striatum, (D) talamus kortizol düzeyleri, grafik değerleri ortalama $\pm$ SEM * $p < 0,05$ şeklinde verilmiştir.

6.7.2. İnflamasyon Moleküler Ölçümleri

Kontrol ve soğuk stres grubu sıçanların hipokampus interlökin-1beta (IL-1 β) düzeyleri değerlendirildiğinde kontrol grubu IL-1 β düzeyi $298,3 \pm 15,93$ pg/ml, soğuk stres grubu IL-1 β düzeyi $363,5 \pm 14,26$ pg/ml olarak bulunmuştur (Şekil 6.24A). Soğuk stres grubunda hipokampus IL-1 β düzeyi, kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı artmıştır ($p < 0,05$). Kontrol ve soğuk stres grubu sıçanların prefrontal kortekste (PFK) IL-1 β düzeyleri değerlendirildiğinde kontrol grubu IL-1 β düzeyi $344,7 \pm 12,65$ pg/ml, soğuk stres grubu IL-1 β düzeyi $348,7 \pm 19,67$ pg/ml olarak bulunmuştur (Şekil 6.24B). Soğuk stres ve kontrol gruplarında prefrontal korteks IL-1 β düzeyi açısından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır. Kontrol ve soğuk stres grubu sıçanların striatumda IL-1 β düzeyleri değerlendirildiğinde kontrol grubu IL-1 β düzeyi $471,2 \pm 52,25$ pg/ml, soğuk stres grubu IL-1 β düzeyi $427,6 \pm 31,62$ pg/ml olarak bulunmuştur (Şekil 6.24C). Soğuk stres ve kontrol

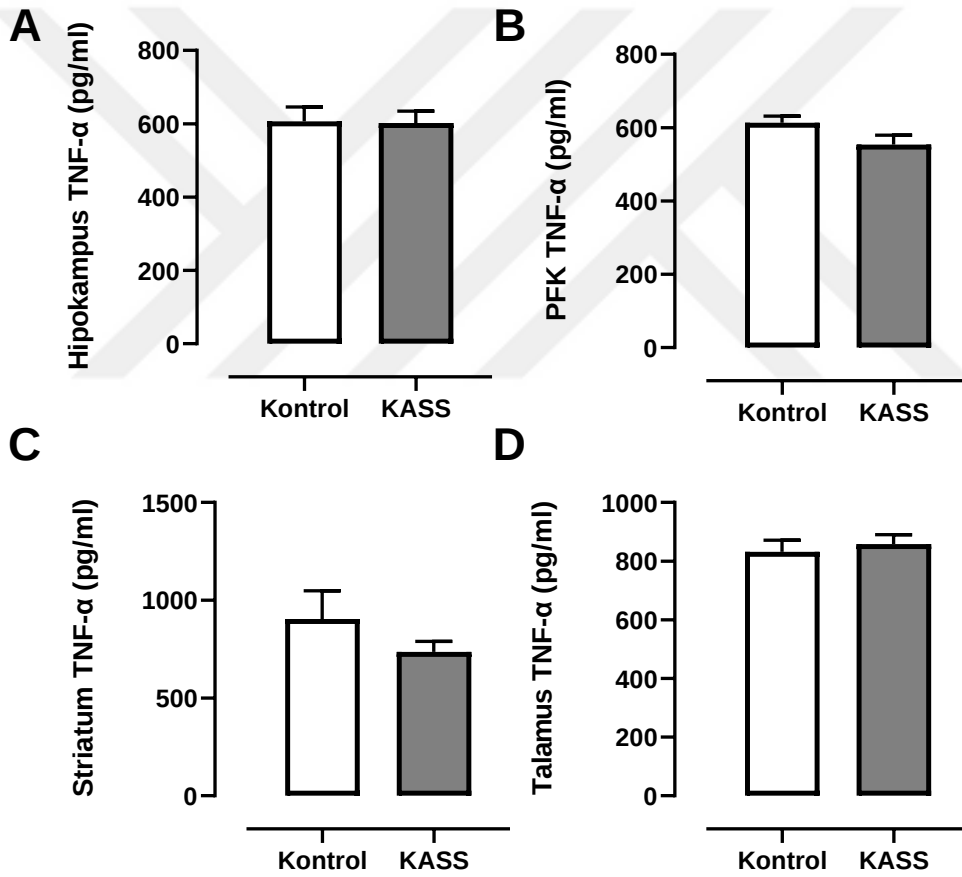
gruplarında striatum IL-1 β düzeyi açısından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır. Kontrol ve soğuk stres grubu sıçanların talamus IL-1 β düzeyleri değerlendirildiğinde kontrol grubu IL-1 β düzeyi $421,3 \pm 20,71$ pg/ml, soğuk stres grubu IL-1 β düzeyi $536,3 \pm 40,25$ pg/ml olarak bulunmuştur (Şekil 6.24D). Soğuk stres grubunda talamus IL-1 β düzeyi, kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı artmıştır ($p<0,05$).



Şekil 6.24. Kontrol ve soğuk stres gruplarında sıçanların (A) hipokampus, (B) prefrontal korteks, (C) striatum, (D) talamus IL-1 β düzeyleri, grafik değerleri ortalama $\pm$ SEM * $p<0,05$ şeklinde verilmiştir.

Kontrol ve soğuk stres grubu sıçanların hipokampus tümör nekroz faktör (TNF- α) düzeyleri değerlendirildiğinde kontrol grubu TNF- α düzeyi $606,5 \pm 39,52$ pg/ml, soğuk stres grubu TNF- α düzeyi $602,1 \pm 32,21$ pg/ml olarak bulunmuştur (Şekil 6.25A). Soğuk stres ve kontrol gruplarında hipokampus TNF- α düzeyi açısından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır. Kontrol ve soğuk stres grubu sıçanların prerontal kortekste (PFK) TNF- α düzeyleri değerlendirildiğinde kontrol grubu TNF- α düzeyi $613,2 \pm 18,27$ pg/ml, soğuk stres

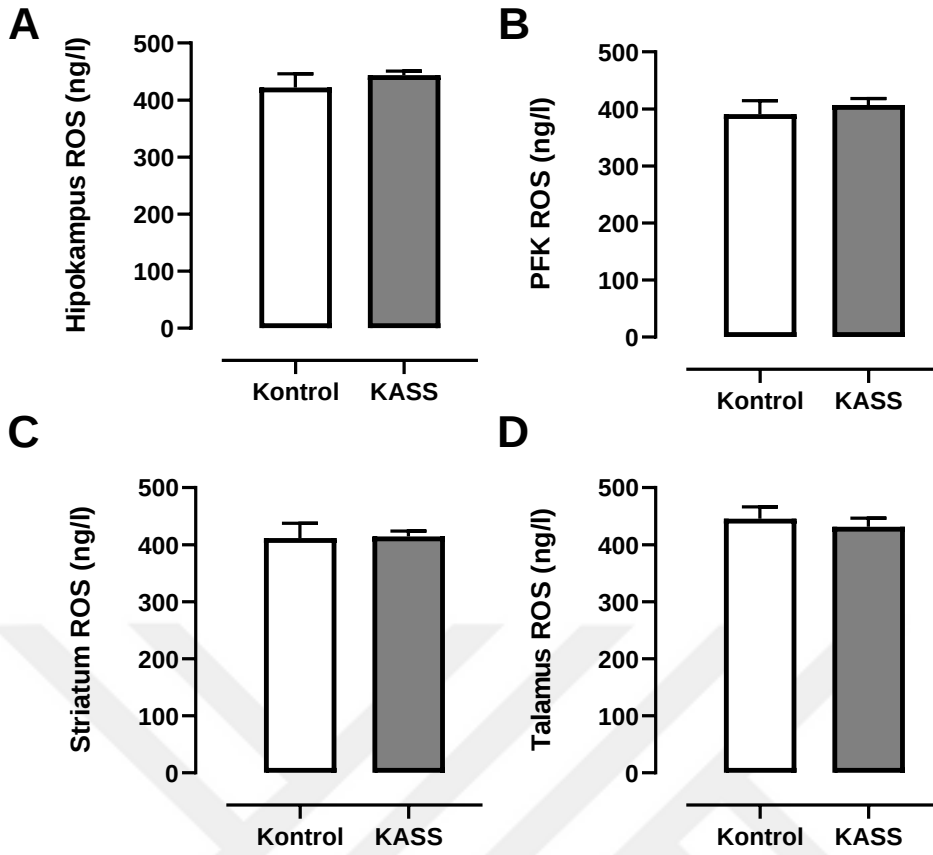
grubu TNF- α düzeyi $553,8 \pm 25,38$ pg/ml olarak bulunmuştur (Şekil 6.25B). Soğuk stres ve kontrol gruplarında prefrontal korteks TNF- α düzeyi açısından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır. Kontrol ve soğuk stres grubu sıçanların striatumda TNF- α düzeyleri değerlendirildiğinde kontrol grubu TNF- α düzeyi $903,5 \pm 145,0$ pg/ml, soğuk stres grubu TNF- α düzeyi $736,4 \pm 53,12$ pg/ml olarak bulunmuştur (Şekil 6.25C). Soğuk stres ve kontrol gruplarında striatumda TNF- α düzeyi açısından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır. Kontrol ve soğuk stres grubu sıçanların talamus TNF- α düzeyleri değerlendirildiğinde kontrol grubu TNF- α düzeyi $831,7 \pm 39,62$ pg/ml, soğuk stres grubu TNF- α düzeyi $857,9 \pm 32,02$ pg/ml olarak bulunmuştur (Şekil 6.25D). Soğuk stres ve kontrol gruplarında talamus TNF- α düzeyi açısından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır.



Şekil 6.25. Kontrol ve soğuk stres gruplarında sıçanların (A) hipokampus, (B) prefrontal korteks, (C) striatum, (D) talamus TNF- α düzeyleri, grafik değerleri ortalama $\pm$ SEM * $p < 0,05$ şeklinde verilmiştir.

6.7.3. Oksidatif Stres Moleküler Ölçümleri

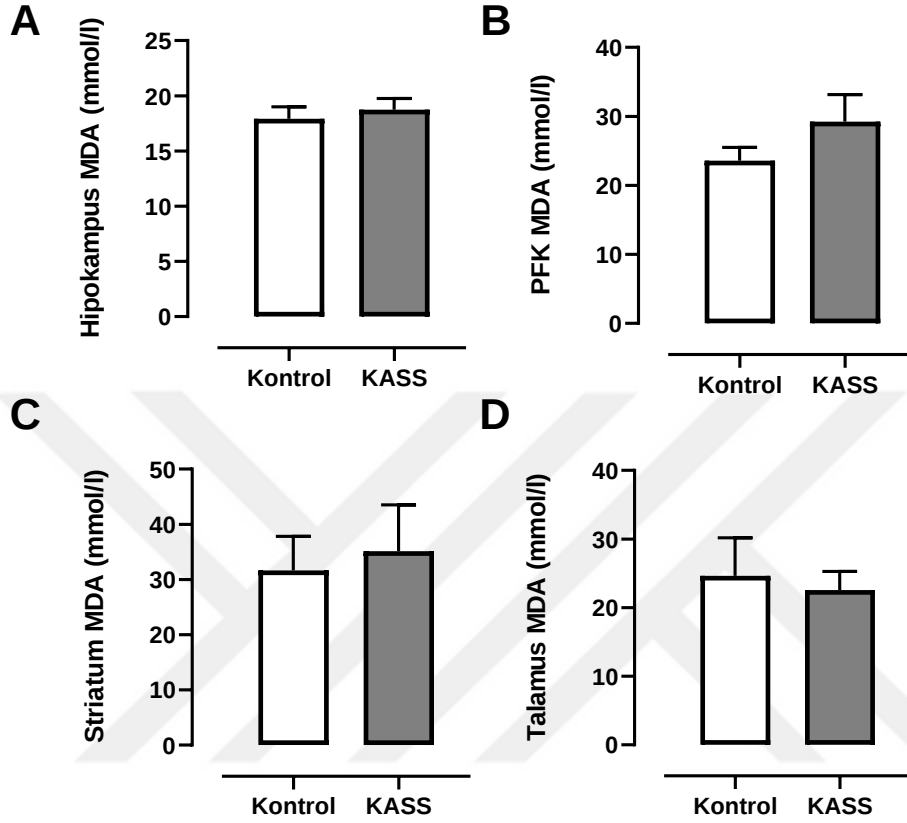
Kontrol ve soğuk stres grubu sıçanların hipokampus reaktif oksijen ürünleri (ROS) düzeyleri değerlendirildiğinde kontrol grubu ROS düzeyi $421,9 \pm 24,15$ ng/l, soğuk stres grubu ROS düzeyi $443,6 \pm 7,219$ ng/l olarak bulunmuştur (Şekil 6.26A). Soğuk stres ve kontrol gruplarında hipokampus ROS düzeyi açısından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır. Kontrol ve soğuk stres grubu sıçanların prefrontal kortekste (PFK) ROS düzeyleri değerlendirildiğinde kontrol grubu ROS düzeyi $390,8 \pm 23,76$ ng/l, soğuk stres grubu ROS düzeyi $407,1 \pm 11,32$ ng/l olarak bulunmuştur (Şekil 6.26B). Soğuk stres ve kontrol gruplarında prefrontal korteks ROS düzeyi açısından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır. Kontrol ve soğuk stres grubu sıçanların striatumda ROS düzeyleri değerlendirildiğinde kontrol grubu ROS düzeyi $411,8 \pm 25,75$ ng/l, soğuk stres grubu ROS düzeyi $414,3 \pm 9,485$ ng/l olarak bulunmuştur (Şekil 6.26C). Soğuk stres ve kontrol gruplarında striatumda ROS düzeyi açısından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır. Kontrol ve soğuk stres grubu sıçanların talamus ROS düzeyleri değerlendirildiğinde kontrol grubu ROS düzeyi $445,7 \pm 20,44$ ng/l, soğuk stres grubu ROS düzeyi $431,6 \pm 14,70$ ng/l olarak bulunmuştur (Şekil 6.26D). Soğuk stres ve kontrol gruplarında talamus ROS düzeyi açısından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır.



Şekil 6.26. Kontrol ve soğuk stres gruplarında sıçanların (A) hipokampus, (B) prefrontal korteks, (C) striatum, (D) talamus ROS düzeyleri, grafik değerleri ortalama $\pm$ SEM * $p < 0,05$ şeklinde verilmiştir.

Kontrol ve soğuk stres grubu sıçanların hipokampus malondialdehit (MDA) düzeyleri değerlendirildiğinde kontrol grubu MDA düzeyi $17,93 \pm 1,06$ mmol/l, soğuk stres grubu MDA düzeyi $18,75 \pm 0,99$ mmol/l olarak bulunmuştur (Şekil 6.27A). Soğuk stres ve kontrol gruplarında hipokampus MDA düzeyi açısından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır. Kontrol ve soğuk stres grubu sıçanların prefrontal kortekste (PFK) MDA düzeyleri değerlendirildiğinde kontrol grubu MDA düzeyi $23,60 \pm 1,91$ mmol/l, soğuk stres grubu MDA düzeyi $29,22 \pm 3,93$ mmol/l olarak bulunmuştur (Şekil 6.27B). Soğuk stres ve kontrol gruplarında prefrontal korteks MDA düzeyi açısından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır. Kontrol ve soğuk stres grubu sıçanların striatumda MDA düzeyleri değerlendirildiğinde kontrol grubu MDA düzeyi $31,64 \pm 6,17$ mmol/l, soğuk stres grubu MDA düzeyi $35,14 \pm 8,37$ mmol/l olarak bulunmuştur (Şekil 6.27C). Soğuk stres ve kontrol gruplarında striatumda MDA düzeyi açısından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır. Kontrol ve soğuk stres grubu sıçanların talamus MDA düzeyleri değerlendirildiğinde kontrol

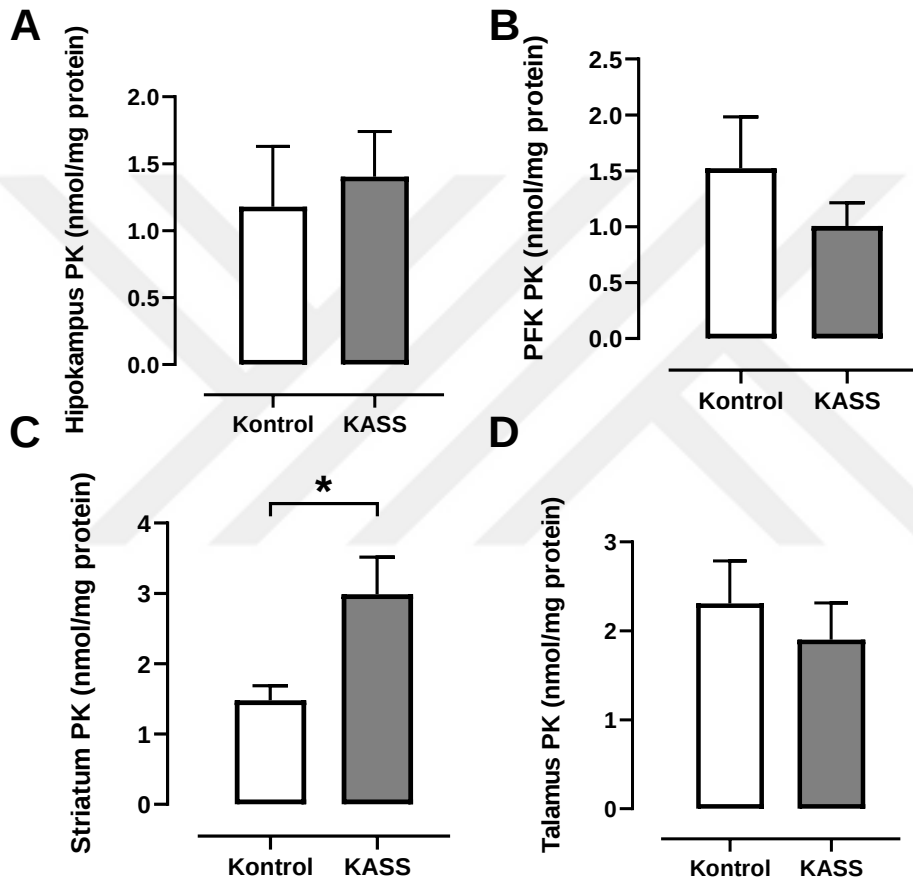
grubu MDA düzeyi $24,64 \pm 5,55$ mmol/l, soğuk stres grubu MDA düzeyi $22,55 \pm 2,71$ mmol/l olarak bulunmuştur (Şekil 6.27D). Soğuk stres ve kontrol gruplarında talamus MDA düzeyi açısından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır.



Şekil 6.27. Kontrol ve soğuk stres gruplarında sıçanların (A) hipokampus, (B) prefrontal korteks, (C) striatum, (D) talamus MDA düzeyleri, grafik değerleri ortalama $\pm$ SEM * $p < 0,05$ şeklinde verilmiştir.

Kontrol ve soğuk stres grubu sıçanların hipokampus protein karbonil (PK) düzeyleri değerlendirildiğinde kontrol grubu PK düzeyi $1,18 \pm 0,44$ nmol/mg protein, soğuk stres grubu PK düzeyi $1,40 \pm 0,33$ nmol/mg protein olarak bulunmuştur (Şekil 6.28A). Soğuk stres ve kontrol gruplarında hipokampus PK düzeyi açısından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır. Kontrol ve soğuk stres grubu sıçanların prefrontal kortekste (PFK) PK düzeyleri değerlendirildiğinde kontrol grubu PK düzeyi $1,52 \pm 0,45$ nmol/mg protein, soğuk stres grubu PK düzeyi $1,00 \pm 0,20$ nmol/mg protein olarak bulunmuştur (Şekil 6.28B). Soğuk stres ve kontrol gruplarında prefrontal korteks PK düzeyi açısından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır. Kontrol ve soğuk stres grubu sıçanların striatumda PK düzeyleri

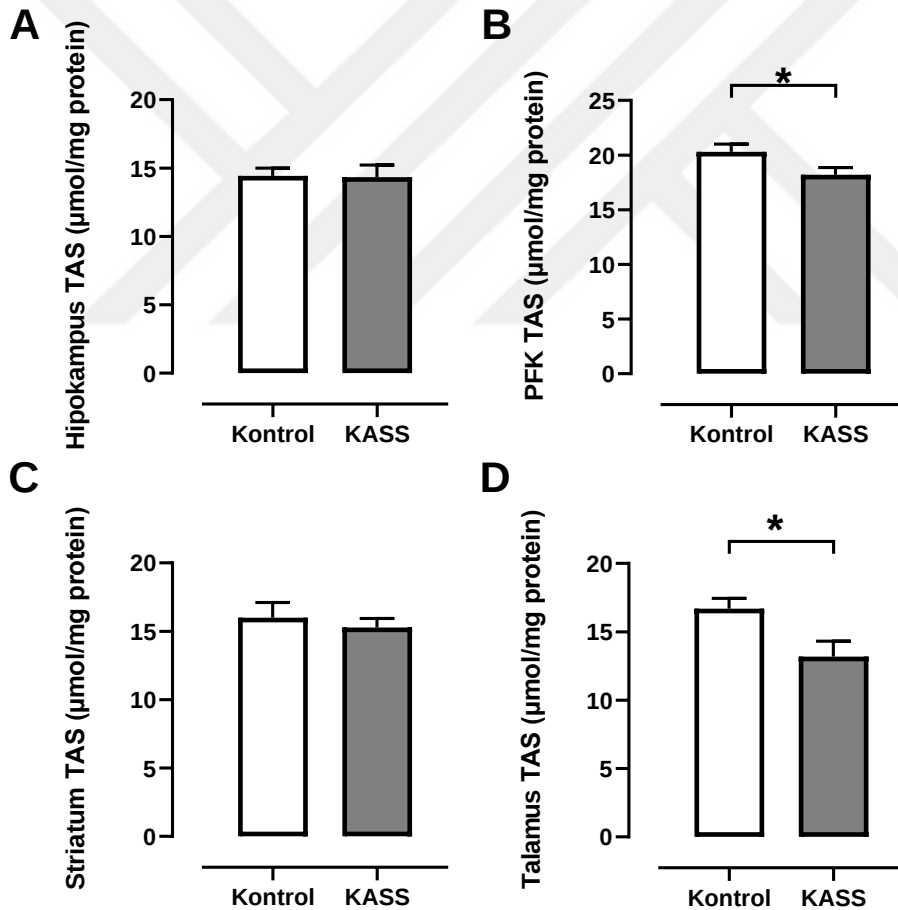
değerlendirildiğinde kontrol grubu PK düzeyi $1,48 \pm 0,20$ nmol/mg protein, soğuk stres grubu PK düzeyi $2,98 \pm 0,52$ nmol/mg protein olarak bulunmuştur (Şekil 6.28C). Soğuk stres grubunda striatum PK düzeyi, kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı artmıştır ($p<0,05$). Kontrol ve soğuk stres grubu sıçanların talamus PK düzeyleri değerlendirildiğinde kontrol grubu PK düzeyi $2,30 \pm 0,47$ nmol/mg protein, soğuk stres grubu PK düzeyi $1,90 \pm 0,41$ nmol/mg protein olarak bulunmuştur (Şekil 6.28D). Soğuk stres ve kontrol gruplarında talamus PK düzeyi açısından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır.



Şekil 6.28. Kontrol ve soğuk stres gruplarında sıçanların (A) hipokampus, (B) prefrontal korteks, (C) striatum, (D) talamus protein karbonil (PK) düzeyleri, grafik değerleri ortalama $\pm$ SEM * $p<0,05$ şeklinde verilmiştir.

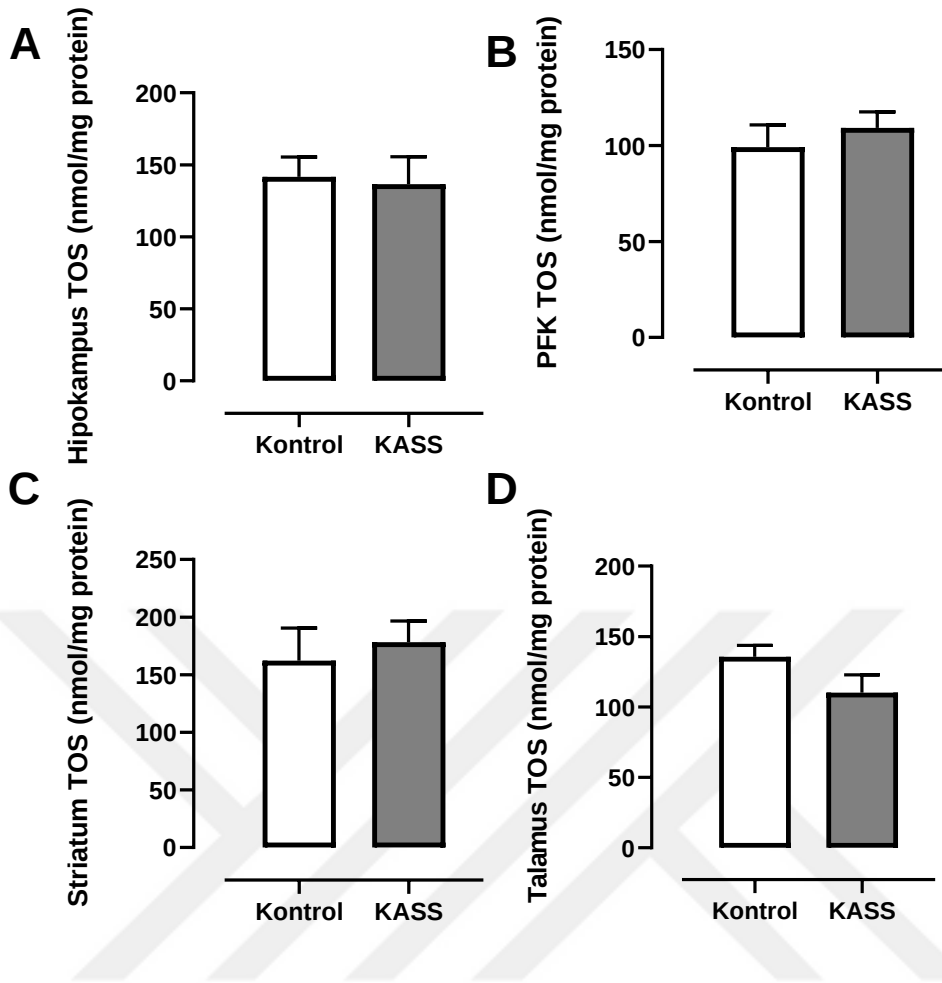
Kontrol ve soğuk stres grubu sıçanların hipokampus total antioksidan seviyeleri (TAS) değerlendirildiğinde kontrol grubu TAS $14,43 \pm 0,57$ μ mol/mg protein, soğuk stres grubu TAS $14,33 \pm 0,89$ μ mol/mg protein olarak bulunmuştur (Şekil 6.29A). Soğuk stres ve kontrol gruplarında hipokampus TAS açısından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır.

Kontrol ve soğuk stres grubu sıçanların prefrontal kortekste (PFK) TAS değerlendirildiğinde kontrol grubunda $20,31 \pm 0,69$ $\mu\text{mol/mg}$ protein, soğuk stres grubunda $18,19 \pm 0,66$ $\mu\text{mol/mg}$ protein olarak bulunmuştur (Şekil 6.29B). Soğuk stres grubunda prefrontal korteks TAS, kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı azalmıştır ($p<0,05$). Kontrol ve soğuk stres grubu sıçanların striatumda TAS değerlendirildiğinde kontrol grubu TAS $16,00 \pm 1,11$ $\mu\text{mol/mg}$ protein, soğuk stres grubu TAS düzeyi $15,29 \pm 0,65$ $\mu\text{mol/mg}$ protein olarak bulunmuştur (Şekil 6.29C). Soğuk stres ve kontrol gruplarında striatum TAS açısından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır. Kontrol ve soğuk stres grubu sıçanların talamus TAS değerlendirildiğinde kontrol grubu TAS $16,70 \pm 0,74$ $\mu\text{mol/mg}$ protein, soğuk stres grubu TAS $13,19 \pm 1,12$ $\mu\text{mol/mg}$ protein olarak bulunmuştur (Şekil 6.29D). Soğuk stres grubunda talamus TAS, kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı azalmıştır ($p<0,05$).



Şekil 6.29. Kontrol ve soğuk stres gruplarında sıçanların (A) hipokampus, (B) prefrontal korteks, (C) striatum, (D) talamus total antioksidan seviyeleri (TAS), grafik değerleri ortalama $\pm$ SEM * $p<0,05$ şeklinde verilmiştir.

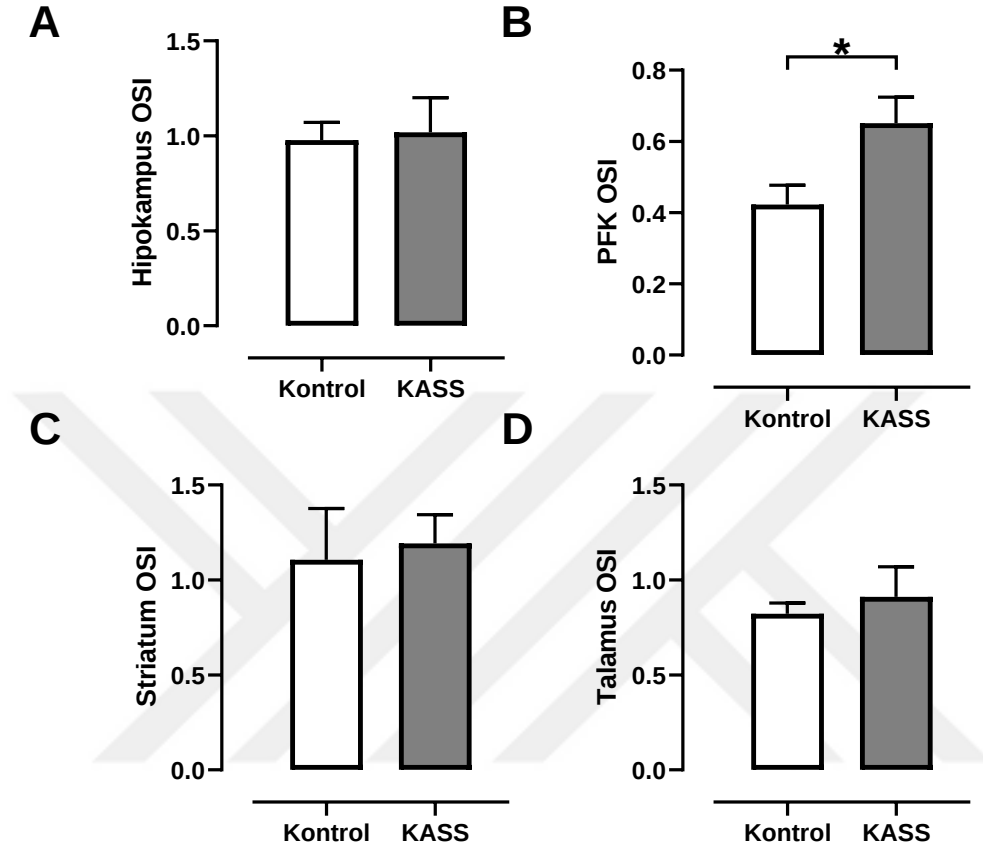
Kontrol ve soğuk stres grubu sıçanların hipokampus total oksidan seviyeleri (TOS) değerlendirildiğinde kontrol grubu TOS $141,6 \pm 13,82$ nmol/mg protein, soğuk stres grubu TOS $136,6 \pm 18,96$ nmol/mg protein olarak bulunmuştur (Şekil 6.30A). Soğuk stres ve kontrol gruplarında hipokampus TOS açısından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır. Kontrol ve soğuk stres grubu sıçanların prefrontal kortekste (PFK) TOS değerlendirildiğinde kontrol grubunda $99,17 \pm 11,63$ nmol/mg protein, soğuk stres grubunda $109,2 \pm 8,31$ nmol/mg protein olarak bulunmuştur (Şekil 6.30B). Soğuk stres ve kontrol gruplarında prefrontal korteks TOS açısından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır. Kontrol ve soğuk stres grubu sıçanların striatumda TOS değerlendirildiğinde kontrol grubu TOS $162,2 \pm 28,34$ nmol/mg protein, soğuk stres grubu TOS düzeyi $178,1 \pm 18,46$ nmol/mg protein olarak bulunmuştur (Şekil 6.30C). Soğuk stres ve kontrol gruplarında striatum TOS açısından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır. Kontrol ve soğuk stres grubu sıçanların talamus TOS değerlendirildiğinde kontrol grubu TOS $135,7 \pm 8,041$ nmol/mg protein, soğuk stres grubu TOS $110,2 \pm 12,49$ nmol/mg protein olarak bulunmuştur (Şekil 6.30D). Soğuk stres ve kontrol gruplarında talamus TOS açısından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır.



Şekil 6.30. Kontrol ve soğuk stres gruplarında sıçanların (A) hipokampus, (B) prefrontal korteks, (C) striatum, (D) talamus total oksidan seviyeleri (TOS), grafik değerleri ortalama $\pm$ SEM * $p < 0,05$ şeklinde verilmiştir.

Kontrol ve soğuk stres grubu sıçanların hipokampus oksidatif stres indeksi (OSI) değerlendirildiğinde kontrol grubu OSI değeri $0,97 \pm 0,09$, soğuk stres grubu OSI değeri $1,01 \pm 0,18$ olarak bulunmuştur (Şekil 6.31A). Soğuk stres ve kontrol gruplarında hipokampus OSI değeri açısından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır. Kontrol ve soğuk stres grubu sıçanların prefrontal kortekste (PFK) OSI değeri değerlendirildiğinde kontrol grubunda $0,42 \pm 0,05$, soğuk stres grubunda $0,65 \pm 0,07$ olarak bulunmuştur (Şekil 6.31B). Soğuk stres grubunda prefrontal kortekste OSI, kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı artmıştır ($p < 0,05$). Kontrol ve soğuk stres grubu sıçanların striatuma OSI değeri değerlendirildiğinde kontrol grubu OSI değeri $1,10 \pm 0,27$, soğuk stres grubu OSI değeri düzeyi $1,19 \pm 0,15$ olarak bulunmuştur (Şekil 6.31C). Soğuk stres ve kontrol gruplarında striatum OSI değeri açısından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır. Kontrol ve soğuk stres grubu sıçanların

talamus OSI değeri değerlendirildiğinde kontrol grubu OSI değeri $0,82 \pm 0,05$, soğuk stres grubu OSI değeri $0,91 \pm 0,15$ olarak bulunmuştur (Şekil 6.31D). Soğuk stres ve kontrol gruplarında talamus OSI değeri açısından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır.

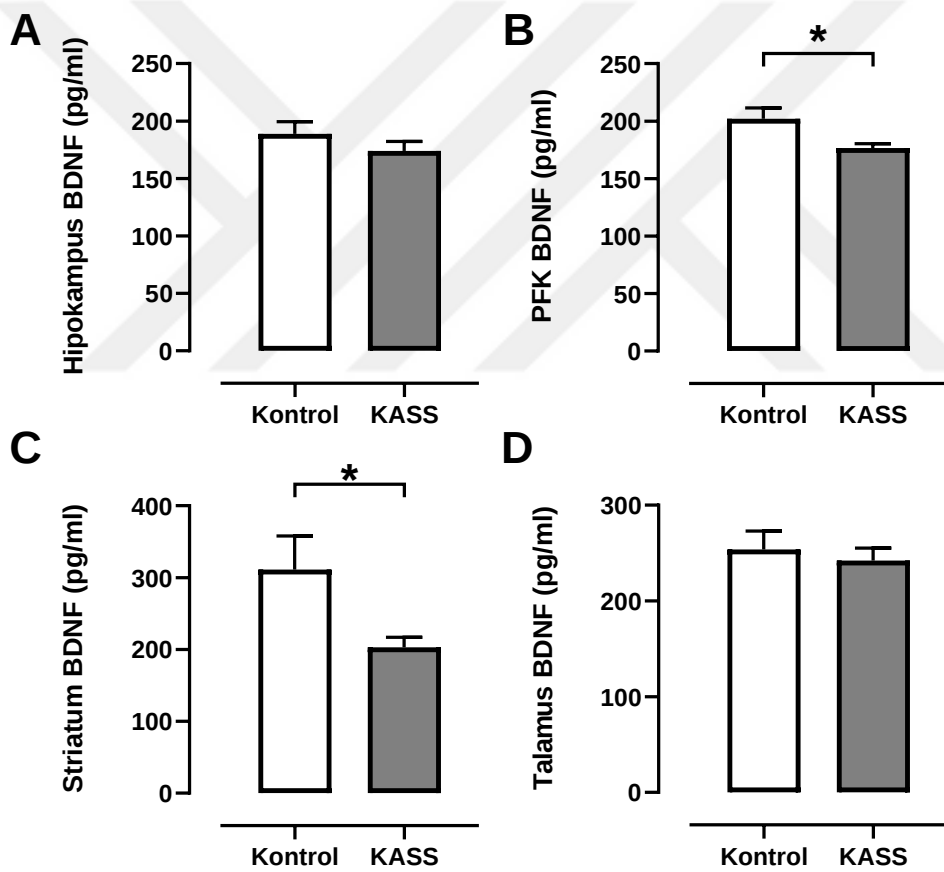


Şekil 6.31. Kontrol ve soğuk stres gruplarında sıçanların (A) hipokampus, (B) prefrontal korteks, (C) striatum, (D) talamus oksidatif stres indeksi (OSI), grafik değerleri ortalama $\pm$ SEM * $p < 0,05$ şeklinde verilmiştir.

6.7.4. BDNF Ölçümü

Kontrol ve soğuk stres grubu sıçanların hipokampus beyin kaynaklı natriüretik faktör (BDNF) düzeyleri değerlendirildiğinde kontrol grubu BDNF düzeyi $188,9 \pm 10,58$ pg/ml, soğuk stres grubu BDNF düzeyi $173,9 \pm 8,21$ pg/ml olarak bulunmuştur (Şekil 6.32A). Soğuk stres ve kontrol gruplarında hipokampus BDNF düzeyi açısından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır. Kontrol ve soğuk stres grubu sıçanların prerontal kortekste (PFK) BDNF düzeyleri değerlendirildiğinde kontrol grubu BDNF düzeyi $202,2 \pm 9,21$ pg/ml, soğuk stres

grubu BDNF düzeyi $176,7 \pm 3,59$ pg/ml olarak bulunmuştur (Şekil 6.32B). Soğuk stres grubunda prefrontal korteks BDNF, kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı azalmıştır ($p<0,05$). Kontrol ve soğuk stres grubu sıçanların striatumda BDNF düzeyleri değerlendirildiğinde kontrol grubu BDNF düzeyi $311,4 \pm 46,77$ pg/ml, soğuk stres grubu BDNF düzeyi $202,9 \pm 13,97$ pg/ml olarak bulunmuştur (Şekil 6.32C). Soğuk stres grubunda striatum BDNF, kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı azalmıştır ($p<0,05$). Kontrol ve soğuk stres grubu sıçanların talamus BDNF düzeyleri değerlendirildiğinde kontrol grubu BDNF düzeyi $253,7 \pm 19,26$ pg/ml, soğuk stres grubu BDNF düzeyi $242,2 \pm 13,13$ pg/ml olarak bulunmuştur (Şekil 6.32D). Soğuk stres ve kontrol gruplarında talamus BDNF düzeyi açısından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır.



Şekil 6.32. Kontrol ve soğuk stres gruplarında sıçanların (A) hipokampus, (B) prefrontal korteks, (C) striatum, (D) talamus beyin kaynaklı natriüretik faktör (BDNF), grafik değerleri ortalama $\pm$ SEM * $p<0,05$ şeklinde verilmiştir.

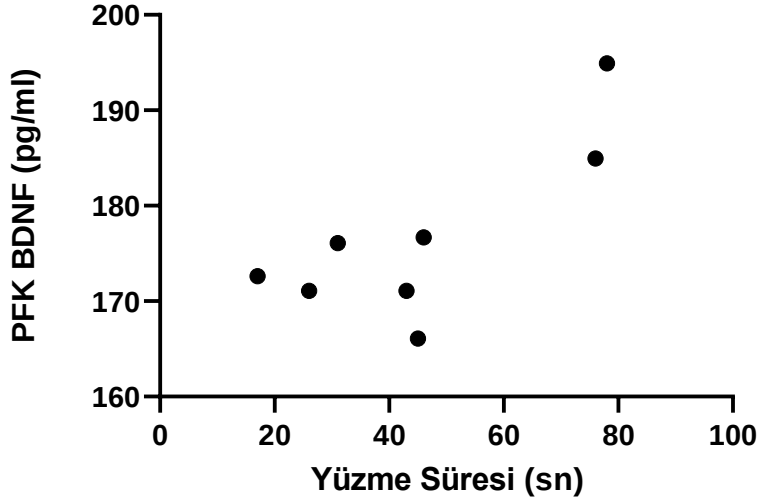
Farklı beyin bölgelerinde değerlendirilen kortizol, oksidatif stres, inflamasyon, BDNF bulgularının özeti Tablo 6.1’ de verilmiştir.

Tablo 6.1. Moleküler testlerin beynin farklı bölgelerinde, kronik aralıklı soğuk stres grubu sıçanlarda kontrol grubuna göre kıyaslandığında bulunan sonuçların özeti.

	Hipokampus	Prefrontal korteks	Striatum	Talamus
BDNF	-	↓	↓	-
Kortizol	-	↑	-	-
IL-1	↑	-	-	↑
TNF	-	-	-	-
ROS	-	-	-	-
MDA	-	-	-	-
Protein karbonil	-	-	↑	-
TAS	-	↓	-	↓
TOS	-	-	-	-
OSI	-	↑	-	-

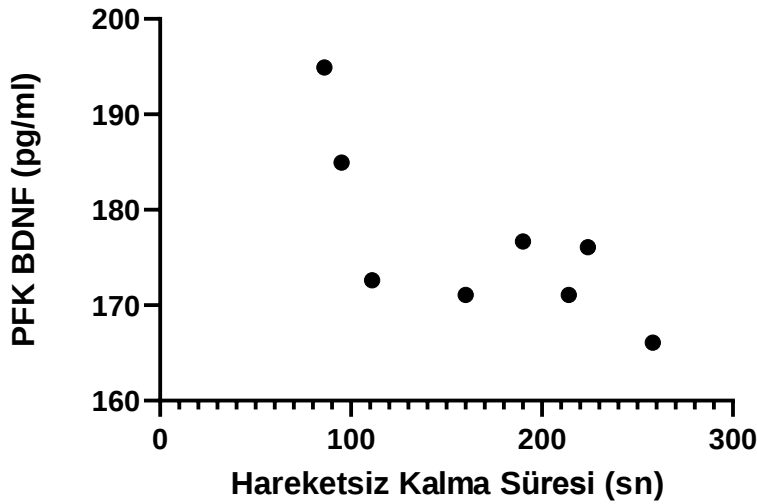
6.8. Moleküler Ölçümler ve Davranış Testleri Arasında Korelasyon

Stres grubu sıçanlarda depresyon testi olan zorunlu yüzme testinde bakılan parametrelerden yüzme süresi ve prefrontal kortekste BDNF düzeyi arasındaki korelasyon pozitif yönde ($r= 0,77$) ve istatistiksel olarak anlamlı ($p<0,05$) bulunmuştur (Şekil 6.33).



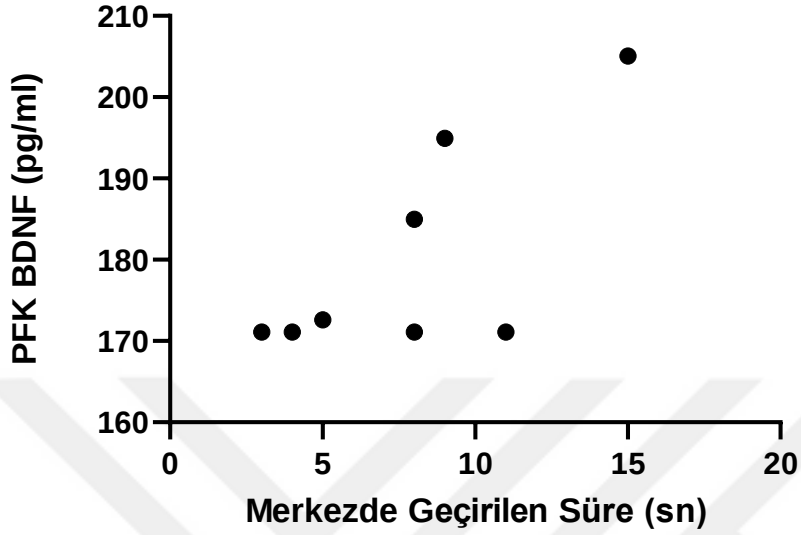
Şekil 6.33. Kronik aralıklı soğuk stres uygulanan sıçanlarda yüzme süresi ve prefrontal kortekste ölçülen BDNF düzeyleri arasında korelasyon, Pearson katsayısı= 0,77 ve $p<0,05$.

Stres grubu sıçanlarda depresyon testi olan zorunlu yüzme testinde bakılan parametrelerden hareketsiz kalma süresi ve prefrontal kortekste BDNF düzeyi arasındaki korelasyon negatif yönde ($r= -0,73$) ve istatistiksel olarak anlamlı ($p<0,05$) bulunmuştur (Şekil 6.34).



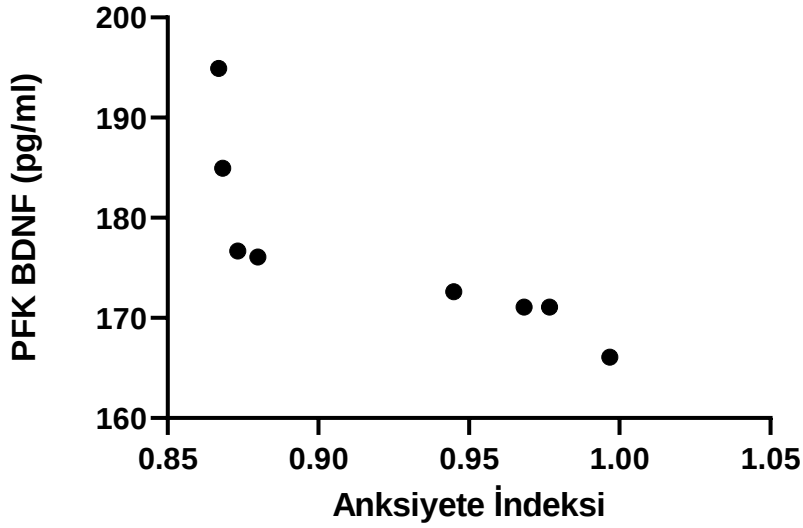
Şekil 6.34. Kronik aralıklı soğuk stres uygulanan sıçanlarda hareketsiz kalma süresi ve prefrontal kortekste ölçülen BDNF düzeyleri arasında korelasyon, Pearson katsayısı= -0,73 ve $p<0,05$.

Stres grubu sıçanlarda anksiyete testi olan açık alan testinde bakılan parametrelerden merkezde geçirilen süre ve prefrontal kortekste BDNF düzeyi arasındaki korelasyon pozitif yönde ($r= 0,72$) ve istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (Şekil 6.35).



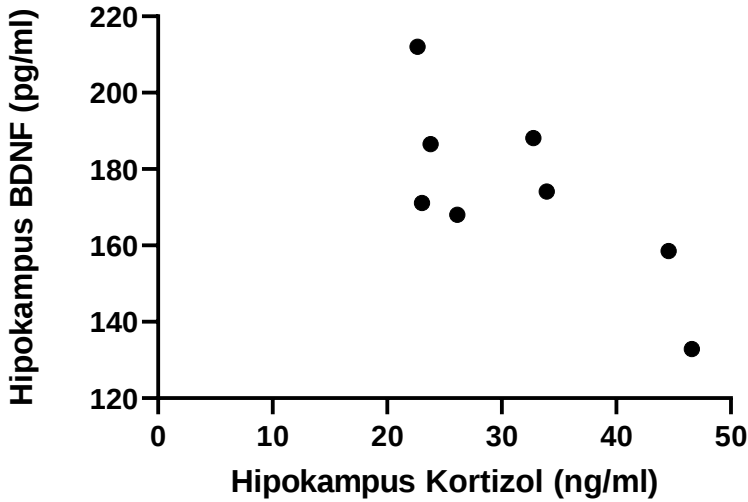
Şekil 6.35. Kronik aralıklı soğuk stres uygulanan sıçanlarda merkezde geçirilen süre ve prefrontal kortekste ölçülen BDNF düzeyleri arasında korelasyon, Pearson katsayısı= 0,72 ve $p<0,05$.

Stres grubu sıçanlarda prefrontal kortekste ölçülen BDNF ve anksiyete indeksi arasındaki korelasyon negatif yönde ($r= -0,8$) ve istatistiksel olarak anlamlı ($p<0,05$) bulunmuştur (Şekil 6.36).



Şekil 6.36. Kronik aralıklı soğuk stres uygulanan sıçanlarda anksiyete indeksi ve prefrontal kortekste ölçülen BDNF düzeyleri arasında korelasyon, Pearson katsayısı= -0,8 ve $p<0,05$.

Stres grubu sıçanlarda hipokampusta ölçülen kortizol ve hipokampusta ölçülen BDNF düzeyleri arasındaki korelasyon negatif yönde ($r = -0,75$) ve istatistiksel olarak anlamlı ($p<0,05$) bulunmuştur (Şekil 6.37).



Şekil 6.37. Kronik aralıklı soğuk stres uygulanan sıçanlarda hipokampusta ölçülen kortizol ve BDNF düzeyleri arasında korelasyon, Pearson katsayısı= -0,75 ve $p<0,05$.

7. TARTIŞMA

Stres, içsel veya dışsal stresörler tarafından tetiklenen, tehdit altında homeostaz durumudur ve optimal vücut dengesini sürdürmeyi amaçlayan karmaşık fizyolojik ve davranışsal tepkilere neden olur. Stres tepkisi, birbirine bağlı nöroendokrin, hücrel ve moleküler altyapıya, yani stres sistemine bağlıdır. Stres sisteminin anahtar bileşenleri arasında hipotalamik hipofiz-adrenal (HPA) aksı bulunmaktadır. Kronik stres ile bağlantılı olarak stres sisteminin düzensizliği, vücut homeostazını önemli ölçüde bozarak, birçok klinik bulguya yol açabilir. HPA aksının düzenlenmesindeki bozuklukların, anksiyete ve depresyon patofizyolojisinde ortak olabileceği ortaya konulmuştur (109). Bu çalışma, kronik stresin depresyon benzeri ve anksiyete benzeri davranışları tetiklediği hipotezini doğrulamıştır.

Deneyel olarak stresin etkilerini çalışmak için pek çok farklı stres modelleri kullanılmıştır. Stresin etkileri; stres çeşidi, dozu, maruziyet süresine bağlı olarak değişebilir. Düşük çevresel sıcaklığın, hem hayvanlarda hem insanlarda günlük hayatta karşılaşılabilecek ortak bir stres faktörü olması ve hipotermi ile seyreden hastalıkların ve hipotermi etkilerinin klinik önemli bir durum olması nedeniyle, bu çalışmada soğuk stres deney modelinin oluşturulması tercih edilmiştir. Strese maruz bırakılan hayvanların davranışı, kritik olarak stres etkeni türüne bağlı olmasına rağmen stres etkeni olarak soğuk, çalışmalarda nispeten daha az kullanılmıştır (30). Çalışmamızda kronik aralıklı soğuk stres modelinin sıçanlarda anksiyete ve depresyon benzeri davranışlara yol açtığı gösterilmiştir.

Dikkat çekici bir şekilde; doğum öncesi yaşam, bebeklik, çocukluk ve ergenlik, stres sisteminin oldukça esnek olması ve stres faktörlerine karşı artan savunmasızlık ile karakterize edilen kritik dönemlerdir (110). Stresin beyin ve davranışlar üzerindeki etkisinin açıklanabilmesi için Shonkoff tarafından önerilen hassas dönem hipotezine göre strese, beyin gelişiminin devam ettiği bir dönemde maruz bırakıldığında, fizyolojik ayar noktalarını değiştirir (110). Genel varsayım, strese maruziyet erken dönemde olursa, beyin gelişiminin devam etmesi ve çevresel etkilere duyarlılığı nedeniyle bu değişikliklerin daha büyük ve dirençli hale geldiği şeklindedir (111). Stres, ne zaman maruz kalındığına bağlı olarak organizmayı farklı şekillerde etkileyecektir (112). Adolesan dönemde, amigdala genç

yetişkinliğe kadar gelişmeye devam eder ve bu dönemin sonunda frontal lob gelişimi tamamlanır (16). Bu nedenle çalışmamızda, adolesan dönemde stres maruziyetinin etkilerini çalışmak tercih edilmiştir. Hassas dönem hipotezi ile uyumlu olarak adolesan sıçanlarda kronik stresin davranışlar üzerine olumsuz etkileri gösterilmiştir.

Hayvanlarda stres değerlendirmesi; davranışsal düzeyde yapılabilmektedir (3). Çalışmamızda davranış testlerinden anksiyete davranışını değerlendiren açık alan testi, yükseltilmiş artı labirent, aydınlık karanlık kutusu; depresyon benzeri davranışları değerlendiren şeker seçim testi, zorunlu yüzme testi; obsesif kompulsif davranışları değerlendiren misket gömme testi uygulanmıştır. Deney protokolü sonunda kronik strese maruz bırakılan hayvanlarda depresyon ve anksiyete benzeri davranışların gözlemlendiği açık bir şekilde gösterilmiştir.

7.1. Açık Alan Testi Bulgularının Değerlendirilmesi

Kemirgenlerin keşfetmek için arka ayakları üzerinde durdukları iki ayak üzerine kalkma davranışı, hayvanın anksiyete durumu hakkında değerli bilgiler vermektedir. İki ayak üzerine kalkmanın iki türü tanımlanmıştır, destekli (hayvanın test düzeneğinin duvarlarına doğru yükseldiği) ve destek almadan (hayvanın duvarlara temas etmeden kalktığı). Destek almadan iki ayak üzerine kalkma, anksiyete durumunun hassas bir göstergesidir (113). Önceki çalışmalar hipokampus ile iki ayak üzerine kalkma davranışı arasında güçlü bir ilişki olduğunu göstermiştir (114). Hipokampal morfoloji ve iki ayak üzerine kalkma davranışı ile ilgili daha spesifik çalışmalarda, hipokampal yosunsu liflerin doğrudan iki ayak üzerine kalkma davranışıyla bağlantılı olduğunu ve yüksek frekanslı iki ayak üzerine kalkma davranışı yapan farelerin hipokampal yosunsu lif terminal alan boyutunda artış olduğunu göstermiştir (115). Hipokampus, stres tepkisinin temel hedefidir ve hipokampusa bağlı davranışlar stresten güçlü bir şekilde etkilenmektedir. Çalışmamızda açık alan testi sonuçlarına göre stres grubundaki adolesan sıçanlarda destekli, destek almadan ve toplam iki ayak üzerine kalkma sayısı azalmıştır. Literatürde, soğuk suda yüzdürme stresi uygulanan erişkin sıçanlarda stres grubunda açık alan testinde iki ayak üzerine kalkma davranışı sayısında azalma gösterilmiştir (116). Kronik öngörülemez stres modeli uygulanan erişkin SD sıçanlarda açık alan testinde iki ayak üzerine kalkma davranışı sayısının azaldığı gösterilmiştir (85). Daha önce, destekli ve destek almadan iki ayak üzerine kalkma davranışlarının farklı bileşenleri olabileceği, farklı deney koşulları altında değişkenlik

gösterebileceği ve AAT kullanarak yapılacak çalışmalarda bu iki davranış arasındaki ayrımın sistematik olarak kaydedilmesi önerilmiştir (113). Bu davranışların ayrı ayrı kaydedilmiş olması açısından literatüre önemli bir katkı sağlayacaktır.

Sıçanlar, genellikle küçük alanlarda yaşayan, sosyal hayvanlar olduğundan, sosyal grubundan ayrılması ve geniş bir alana yerleştirilmesi anksiyete davranışını tetikler. Bu durumlarda, doğal olarak duvarlara yakın durma ve açık alanlardan kaçınma eğilimi gösterir, bu da tigmotaksi adı verilen bir davranıştır (117). Buna dayanarak, AAT'nin merkez bölgesinde harcanan sürenin artmasının anksiyetenin azlığı ile ilişkili olduğu düşünülmektedir (117). Kronik aralıklı soğuk stres grubundaki sıçanlar AAT merkez bölgesinde daha az ve perifer bölgesinde daha fazla zaman harcamıştır. AAT verileri kronik stres maruziyetinin merkezde daha az vakit geçirilmesine yol açtığını bildiren önceki çalışmalarla uyumludur. Erişkin sıçanlarda kronik immobilizasyon stresine maruz bırakıldığında açık alan testinde, stres grupları için merkezi alanda geçirilen zaman yüzdesi kontrol grubuna göre daha düşük bulunmuştur (118). Genel olarak, açık alan testinde merkezi alanda geçirilen sürenin azalması, yüksek anksiyetenin göstergesi olarak kabul edilmektedir.

Lokomotor aktivite azalması depresyonda sıklıkla görülmektedir. Çalışmamızda kronik aralıklı soğuk stres modeli uygulanan adolesan sıçanların açık alan testinde toplam katedilen mesafesi daha az bulunmuştur. Bu bulgu, uygulanan stres modelinin, depresyonun kliniğiyle ilişkilendirilmesi açısından önemlidir. Daha önce yapılan stres modeli çalışmalarında stres maruziyeti ile toplam katedilen mesafenin azaldığı gösterildiğinden sonuçlar literatürle uyumludur. Immobilizasyon ve soğuk stresin beraber uygulandığı bir çalışmada tek bir stres uygulaması erişkin sıçanların açık alan testinde hareketliliğini azaltmıştır (119). Soğuk suda yüzdürme stresi uygulanan erişkin sıçanlarda stres grubunda açık alan testinde toplam katedilen mesafe azalmıştır, ayrıca, daha düşük sıcaklıkta kronik zorunlu yüzmenin, depresyonun şiddetini artırabileceği gösterilmiştir (116). Çalışmamızda adolesan dönemdeki sıçanlarda kronik aralıklı soğuk stres maruziyeti ile adolesan sıçanlarda lokomotor aktivitedeki azalma ilk kez raporlanmıştır.

7.2. Yükseltilmiş Artı Labirent Bulgularının Değerlendirilmesi

Çalışmamızda değerlendiren yükseltilmiş artı labirent testinin verilerine göre kronik aralıklı soğuk stres grubundaki adolesan sıçanlarda açık kolda geçirilen süre azalmış, kapalı

kolda geçirilen süre artmıştır. Açık kol ve kapalı kollarda geçirilen süre anksiyete ölçüsü olarak kabul edilmektedir. Periadolesan dönemde sporadik stres erişkin sıçanlarda YAL testinde anksiyete ilişkili davranışlara yol açmıştır (54). Kronik sosyal stres uygulanan adolesan farelerle yapılan bir çalışmada stres grubundaki adolesan fareler, yükseltilmiş artı labirentte yüksek düzeyde anksiyete göstermiştir, dentat girus subgranular bölgesinde bölünen hücre sayısında azalmaya yol açmıştır. Açık kolda geçirilen süre ve araştırma amaçlı aşağı bakma davranışı azalma gösterilmiştir (55). Bu çalışmalarda soğuk stres modeli kullanılmamıştır.

Soğuk stres modelinde yapılmış çalışmalara bakıldığında farelerde soğuk stresin YAL testinde anksiyete ilişkili davranışlara yol açtığı, diazepam ve alprazolam ile bu cevabın inhibe edildiği gözlenmiştir (52). Soğuk stres farelerde anksiyete benzeri davranışlara yol açmış ve CRH enjeksiyonu anksiyojenik etki göstermiştir (53).

Açık kollarda geçirilen zaman ve açık kola girişlerinin yüzdesinden hesaplanan aksiyete indeksi, YAL davranışsal ölçümlerini bütünleştirmektedir. İndeksteki artış anksiyete benzeri davranışın arttığını ifade etmektedir. Anksiyete indeksi, YAL' deki keşif davranışının her bir parametresi için verileri ve bugüne kadar kullanılan kabul edilen oranları birleşik bir parametre halinde bir araya getirmektedir, böylece yalnızca mutlak ölçümleri değil, aynı zamanda genel eğilimi göstermektedir (120). Çalışmamızda kronik aralıklı soğuk strese maruz bırakılan adolesan sıçanlarda anksiyete indeksi, kontrol grubuna göre anlamlı olarak artmıştır. Saldırgan hayvan kokusu stresine maruz bırakılan erişkin erkek farelerde anksiyete indeksinde artış gösterilmiştir (120).

Stres maruziyetinin süresi önemlidir. Çalışmamızda kronik stresin etkileri değerlendirilmiştir. Akut stres, depresif dönemleri tetikleyebilse de, depresif bozukluk semptomlarının ortaya çıkmasının genellikle kronik stresli yaşam olaylarıyla ilişkili olduğuna dair çok sayıda klinik gözlem vardır (81). Erişkin erkek farelerin saldırgan hayvan stresine maruz bırakıldığı çalışmada bir seferlik akut saldırgan hayvana maruziyet, kontrol grubuna kıyasla anksiyete düzeyini etkilememiş; kronik saldırgan hayvan stresine maruz kaldıktan sonra stres grubu, kontrole göre daha yüksek düzeyde anksiyete göstermiştir, açık kollarda daha az zaman harcamış ve araştırma amaçlı aşağı bakma davranışı sıklığı azalmıştır (121). Çalışmamızda bu bulgularla uyumlu olarak kronik aralıklı soğuk stres maruziyeti ile araştırma amaçlı aşağı bakma davranışı sayısı azalmış ve strese bağlı gergin duruş sayısı artmıştır.

7.3. Aydınlik Karanlık Kutusu Bulgularının Değerlendirilmesi

Aydınlık karanlık kutusu, yeni ortamların keşfi ile aydınlatılmış, açık alanlardan kaçınma arasındaki çatışmaya dayanır. Erişkin ve adolesan sıçanlarda anksiyete benzeri davranışı değerlendirmek için yaygın olarak kullanılmaktadır (122). Yüksek anksiyete düzeyine sahip hayvanlar, aydınlatılmış bölmeden kaçınma ve kutunun karanlık bölümünde daha fazla zaman geçirme eğilimindedir. Çalışmamızda kronik aralıklı soğuk strese maruz bırakılan adolesan sıçanlar, kontrol grubuna göre aydınlık alanda daha az vakit geçirmiştir. Literatürdeki bulgularla uyumludur; soğuk ve kısıtlama stresi uygulanan erişkin SD sıçanlarda aydınlık alanda geçirilen süre azalmıştır (123). Akut kısıtlama stresi farelerde aydınlık alanda geçirilen sürenin azalmasına neden olmuştur (124). Bu çalışma adolesan dönem sıçanlarda kronik soğuk stres maruziyetinin aydınlık karanlık kutusu testinde davranışları etkilediğini gösteren ilk çalışmadır.

7.4. Şeker Seçim Testi Bulgularının Değerlendirilmesi

İnsanlarda depresyonun başlıca belirtilerinden biri, günlük aktivitelere olan ilgide veya zevkte azalma anlamına gelen anhedonidir. Kronik stres; cinsel, saldırgan ve araştırmacı davranışlarda azalma ve lokomotor aktivitede azalma gibi diğer birçok depresyon semptomuna neden olur. Birçok araştırmacı, depresyonun nörobiyolojisini incelemek için kronik stres hayvan modeli kullanmaktadır (125). Anhedoni, iki şişeli bir seçim paradigmasına dayanan şeker seçim testi (ŞST) ile ölçülür. Deneysel olarak kontrol grubuna göre sükröz tercih oranındaki azalma, anhedoninin göstergesidir. Çalışmamızda kronik aralıklı soğuk stres uygulanan adolesan sıçanlarda 3-8. günlerde ve 18-25. günlerde şeker seçimi %65' in altında bulunmuştur. 18-25. günlerde şeker seçim yüzdesi %10' un altındadır ve daha ağır bir depresyon benzeri davranış gözlenmiştir. Kontrol grubunda ise deney süresince %65' in altında bulunmamıştır. Daha önce yapılan çalışmalarda; kronik öngörülemez stres modeli uygulanan erişkin SD sıçanlarda sükröz tüketimi azalmış, anhedoni gösterilmiştir. Depresyon benzeri davranışlar 4. haftadan sonra oluşmuş, sonrasında depresyon stabilleşmiş ve şiddeti artmıştır (100). Literatürde, depresyon benzeri davranışların stres modeli uygulandıktan sonra 3-4. haftadan itibaren olduğu gösterilen çalışmalar mevcuttur (126, 127). Erişkin Sprague Dawley (SD) sıçanlar kronik öngörülemez hafif strese maruz bırakıldığında, sirkadyen ritimde bozulma ve şeker seçim testinde sükröz tüketiminde azalma gözlenmiştir (85). Çalışmamızda günlük hesaplanan şeker tüketiminin

deneyin ilk günlerinde azalmış, sonrasında artıp yeniden daha dramatik bir şekilde azalmış olması; başlangıçta gelişen anksiyete, sonrasında stres maruziyetine adaptasyon ve sonunda depresyonun gelişmesi ve kalıcılığıyla açıklanabilir. Bu durum civcivlerde uygulanan anksiyete-depresyon modeline benzetilebilir. Sosyal izolasyona maruz bırakılan civcivler tepki olarak önce vokalizasyon artışı, ardından sessiz dönem ve sonrasında yeniden vokalizasyon artışı göstermektedir. Anksiyolitik ilaçlar ilk vokalizasyon süresini azaltır, ikinci vokalizasyon dönemi depresyonun gelişmesiyle açıklanmaktadır. Farklı koşulların civciv anksiyete-depresyon modelindeki etkileri, kemirgen modellerinde ve insan klinik deneylerine uyarlanabilmektedir (128). Çalışmamızda günlük hesaplanan şeker tüketiminin deneyin ilk günlerinde azalmış, sonrasında artıp yeniden daha dramatik bir şekilde azalmış olması; aynı zamanda kronik stres maruziyetinde ölçülen kortizol düzeylerinin günlük seyri ile benzerlik göstermektedir. Yapılan bir çalışmada kortizol konsantrasyonlarının, kronik kısıtlama stresinin ilk günlerinde en yüksek seviyeye çıktığı, 8. günde kortizol derişimlerinin azaldığı ve 23. günde yeniden arttığı bildirilmiştir (129) Kronik stres maruziyetinde kortizol düzeylerinde daha önce bildirilmiş bu dalgalanma, çalışmamızdaki şeker seçim testi sonuçlarını da etkilemiş olabilir.

7.5. Zorunlu Yüzme Testi Bulgularının Değerlendirilmesi

Adolesan dönemde HPA aksının ve diğer beyin bölgelerinin hızlı gelişiminin, bu hassas gelişim dönemiyle ilişkili davranış değişikliklerinde nörobiyolojik bir rol oynadığı bildirilmiştir. Kronik adolesan stresinin anksiyete benzeri davranış ve bilişsel davranışlar üzerindeki etkileri daha önce bildirildiği gibi, yaptığımız çalışma sıçanlarda kronik adolesan stresini takiben depresyon benzeri davranışlarda artış olduğunu göstermektedir (130). Kronik aralıklı soğuk strese maruz bırakılan adolesan erkek sıçanlarda zorunlu yüzme testinde hareketsizlik süresi uzamıştır.

Farklı stres modellerine maruz bırakılan sıçanların zorunlu yüzme testinde davranışları incelendiğinde; sosyal stres maruziyeti erişkin sıçanlarda hareketsizlik süresini artırmıştır (131, 132), başka bir çalışmada hareketsizlik süresinin etkilememiştir (133), aynı zamanda farelerde yapılan bir çalışmada ZYT davranışını etkilememiştir (134). Bu bulgulardaki farklılıklar, bu tür stres faktörüne verilen cevabın bireyler arası farklılık göstermesi ile açıklanabilir. Kronik hafif stresin etkisi yaşa bağlıdır; adolesan dönemde kronik karma modalite stresörlere maruz kalma, dişi Wistar sıçanlarında ilk hareketsizliğe geçiş süresi ve

toplam hareketlilik süresini azaltmıştır (135); erişkin sıçanlarda ise kronik hafif stres maruziyeti, hareketsizlik süresini azaltmıştır (136). Kronik kısıtlama stresi, ZYT' de depresyon benzeri davranışlar oluşturmuştur (137, 138) veya hareketsizlik süresi üzerine etkisi olmamıştır (139). Akut kısıtlama stresi süttten kesilen sıçanlarda hareketsizlik süresinin uzamasına neden olmuştur (140) erişkin sıçanlarda da aynı sonuç gözlenmiştir (139). Depresyonun öğrenilmiş çaresizlik modelinde kullanılan, kronik ayak tabanından elektrik şoku stresi maruziyeti, farelerde ZYT' de hareketsizlik süresini anlamlı şekilde artırmıştır (141).

Daha önce erişkin SD sıçanlarda soğuk stresin, zorunlu yüzme testinde depresyon benzeri davranışlara yol açtığı gösterilmiştir (69). Erişkin erkek fareler soğuk strese maruz bırakıldığında zorunlu yüzme testinde depresyon benzeri davranışları artmıştır (92). Peripubertal dönem sıçanlarda soğuk stres maruziyeti ve depresyon benzeri davranışlara etkisini inceleyen çalışma bulunmamakta, bizim çalışmamızda peripubertal dönemde soğuk stres maruziyetinin depresyon benzeri davranışlara yol açtığı gösterilmiştir.

Zorunlu yüzme testinde sıçanların hareketsiz kalma süreleri çalışmalarda değişkenlik göstermektedir. Daha önce yapılan çalışmalarda kontrol grubunda hareketsiz kalma süresini 0-100 saniye aralığında bulan çalışmalar mevcuttur (138, 142, 143). Çalışmamızda kontrol grubu adolesan erkek sıçanlarda toplam hareketsiz kalma süresi ortalama 59 saniye olarak bulunmuştur.

Zorunlu yüzme testinde antidepresan ilaçların serotonerjik ve noradrenerjik sınıfları arasındaki ayrımı kolaylaştırmak için aktif davranışlar, yüzme ve tırmanma olarak sınıflandırılmıştır. Norepinefrin hedefleyen antidepresanlarla tedavi seçici olarak ZYT' de tırmanma davranışını artırırken, serotonin nörotransmisyonunu etkileyen ilaçlar yüzme davranışını artırmaktadır (144). İlk hareketsizliğe geçiş süresinin hesaplanması, hem farelerde hem de sıçanlarda ZYT' nin duyarlılığını artırmaktadır (145). Çalışmamızda kronik aralıklı soğuk stres prosedürü uygulanan sıçanlarda kontrol grubuna kıyasla yüzme davranışı süresi azalmış, tırmanma davranışı süresinde gruplar arasında anlamlı fark bulunamamıştır. İlk hareketsizliğe geçiş süresi stres grubunda anlamlı olarak azalmıştır. Erişkin erkek Wistar sıçanlarda yapılan bir çalışmada bulgularımızla uyumlu olarak ZYT' den önceki gün akut kısıtlama stresinin uygulanması, hareketsizlik süresini artırarak ve yüzme davranışını azaltarak davranışsal performansı değiştirmiş, stres prosedürü tırmanma davranışını

etkilememiştir (146). Stres grubunda yüzme davranışı süresinin anlamlı olarak azalmış olması, yüzme davranışının beyinde ilişkili olduğu serotonin sisteminin etkilenmiş olmasıyla ilişkilendirilebilir.

Çalışmamızda kronik aralıklı soğuk stres maruziyetinin hem anksiyete hem depresyon benzeri davranışlara yol açtığı gösterilmiştir. Bununla uyumlu olarak, son yıllarda yayınlanan çalışmalar anksiyodepresif komorbidite üzerinde durmaktadır. Depresyon ve anksiyete gibi duygudurum bozuklukları sıklıkla birlikte görülmektedir. Komorbidite durumu, hastalık şiddetinde artış, kroniklik ve günlük yaşamdaki bozukluklarla ilişkilidir (78).

Çalışmamızda kronik aralıklı soğuk stres maruziyeti ile adolesan erkek sıçanlarda, depresyon ve anksiyete benzeri davranışların arttığı gösterilmiştir. Benzer şekilde adolesanların, strese karşı daha fazla anksiyojenik tepkiler sergilediklerini bildiren çalışmalarla sonuçlarımız uyumludur (122). İlginç bir şekilde, McCormick ve arkadaşları, adolesan döneminin ortalarında dişi sıçanlarda sosyal izolasyon stresinin, yükseltilmiş artı labirent testinde anksiyete ilişkili davranışta azalma ile sonuçlandığını göstermiştir (147). Farklı stres modalitelerinin anksiyete ilişkili davranış üzerindeki etkileri oldukça karmaşık görünmektedir ve diğer parametrelerin yanı sıra cinsiyet, tür ve kullanılan testlere bağlıdır. Ek olarak, stres prosedürünün süresi ve uygulandığı zaman, gözlemlenen etkiler için büyük önem taşımaktadır. Mevcut modelde, stres prosedürü yirmi beş gün gibi nispeten uzun bir süre sürmekte ve peripubertal dönemi kapsamaktadır.

Daha önce yapılan bir çalışmanın sonuçları, pubertal dönemde hafif stresörlere maruz kalmanın, geç ergenlik döneminde geniş bir davranış değişikliği yelpazesine yol açtığını ve bu geçiş döneminde doğal olarak meydana gelen bağımsızlık oluşturma davranışlarını şiddetlendirebileceğini göstermiştir (merakta artış, duyu arama ve risk alma davranışları) (148). Adolesan stresinin davranış üzerindeki etkilerindeki bu ayrışmanın değişkenlerini izole etmek için ek çalışmalar gereklidir (135), ancak mevcut verilerimiz, kronik adolesan stresin erkek sıçanlarda depresyon ve anksiyete benzeri davranışı artırdığını göstermektedir.

7.6. Hemogram Testi Bulgularının Değerlendirilmesi

Eritrosit dağılım genişliği (RDW), eritrosit hacminin heterojenlik derecesini (anizositoz) yansıtan bir parametredir ve geleneksel olarak anemilerin ayırıcı tanısında kullanılır. Bununla

birlikte, son kanıtlar anizositozun kardiyovasküler hastalık, venöz tromboembolizm, kanser, diyabet, toplum kökenli pnömoni, kronik obstrüktif akciğer hastalığı, karaciğer ve böbrek yetmezliği gibi hastalıklarda ve diğer akut veya kronik durumlarda görülebildiğini doğrulamaktadır. Artan RDW, telomer uzunluğunun kısalması, oksidatif stres, inflamasyon, zayıf beslenme durumu, dislipidemi gibi altta yatan çeşitli metabolik anormalliklere atfedilebilecek, hem eritropoez bozukluğunu hem de anormal eritrosit sağkalımını içeren eritrosit homeostazisinde bozuklukları yansıtmaktadır (149). Son zamanlarda bilimsel kanıtlar pek çok farklı durumun eritrosit hacminde artmış heterojenite ile ilişkili olduğunu göstermektedir (örneğin, yaşlanma, inflamasyon, oksidatif stres, beslenme yetersizliği) (150). Depresyonun, pro-inflamatuar sitokin seviyelerinde artış ve C-reaktif protein (CRP) ve interlökin-6 gibi akut faz proteinleri ile ilişkili olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur (151, 152). Bazı araştırmacılara göre depresyon inflamatuvar bir hastalıktır (153). Anksiyete ve inflamasyon arasında pozitif bir ilişki olduğuna dair bazı çalışmalar vardır (154, 155). RDW ile inflamatuvar belirteçler, CRP ve eritrosit sedimentasyon hızı arasındaki güçlü korelasyon, önceki çalışmalarda gözlemlenmiştir (156). RDW artışının, olumsuz sonuçlarla ilişkili altta yatan bir inflamatuvar durumdan kaynaklanabileceği öne sürülmüştür (157). Araştırmacılar, RDW ve nötrofil / lenfosit oranı seviyeleri gibi bazı hematolojik inflamatuvar belirteçlerin, majör depresif bozukluğu (MDB) olan hastalarda kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek olduğunu bulmuşlardır (158). Çalışmamızda kronik strese maruz kalan sıçanların RDW sonuçları, kontrol grubuna göre daha yüksek bulunmuştur. Depresyon ve anksiyete benzeri davranışlar ile RDW arasındaki pozitif ilişkiye ilişkin sonuçlarımızla uyumlu olarak, klinik çalışmalarda da MDB olan hastalarda kontrol grubuna göre anlamlı derecede daha yüksek RDW seviyeleri bildirilmiştir. Bununla birlikte, MDB hastaları ve kontrol grubu RDW seviyeleri arasındaki bu fark, seçici serotonin geri alım inhibitörü tedavisinden sonra düzelmiştir (158). Benzer şekilde Peng ve ark., 167 MDB hastası ve 180 sağlıklı kontrol üzerinde bir çalışma yapmış ve RDW 'nin hemoglobinden bağımsız olarak MDB ile ilişkili olduğunu gözlemlemiştir (159).

Nötrofil lenfosit oranı; nötrofil sayısının, lenfosit sayısına bölünmesiyle tanımlanmaktadır ve sistemik inflamasyonun bir göstergesi olarak kullanılabilen inflamatuvar bir biyobelirteç olabileceği ortaya atılmıştır (160). Kronik strese maruz bırakılan deney hayvanlarında nötrofil lenfosit oranının arttığı bulgusuna dayanarak, bu değerlendirmenin davranışsal ve fizyolojik değerlendirmelere ek olarak, stres ölçümü için güvenilir bir araç olabileceği düşünülmektedir (161). Yapılan bir çalışmada kısıtlama stresine maruz bırakılan erişkin sıçanlarda serum glukokortikoid derişimleri artmış olmasına rağmen nötrofil-lenfosit

oranları, kontrol grubu sıçanlardan farklı çıkmamıştır. Kronik öngörülemeyen strese maruz kalan sıçanlarda ise nötrofil-lenfosit oranı, kontrol grubundaki sıçanlara kıyasla önemli ölçüde artmıştır (162). Maruz bırakılan stres türüne bağlı olarak, kronik öngörülemeyen stres maruziyetinde bu oranın arttığı bildirilmiş olmasına rağmen kronik aralıklı soğuk streste fark çıkmamış olabilir.

Çalışmamızda adolesan sıçanlarda ölçülen hematolojik parametrelerin sonuçları, erişkin sıçanlardaki normal değerlere göre daha düşüktür. Sıçanlarda yaşamın ilk ayında hemoglobinde artış olmakta, ardından 2 aylıktan itibaren stabilizasyon gözlenmektedir. Lökosit sayısı 1 aylık yaşamda en düşük değerlere sahiptir ve 2 ile 24 ay arasında ortalama olarak çok az dalgalanmaktadır. Hematokrit değerleri, 12 aya kadar kademeli artışlar göstermekte, ardından nispeten stabil değerlere gelmektedir (163). Çalışmamızda sıçanlardan kan örnekleri kalpten alınmıştır. Mevcut sonuçlar, kuyruktan alınan kan örneklerinde, inferior vena kavadan alınan örneklerle karşılaştırıldığında lökosit sayısının daha yüksek olduğunu göstermiştir (164). Gözlemlenen farklılıkların, kan örneklerinin toplandığı çeşitli yerlerde (kuyruk, göz ve kalp) konakçı bağışıklık cevabına atfedilebileceğini ortaya koymaktadır (165).

7.7. BDNF Bulgularının Değerlendirilmesi

Nörotrofin ailesinin bir üyesi olan beyin kaynaklı nörotrofik faktör (BDNF), nöronal popülasyonun hayatta kalmasını ve düzgün çalışmasını sağlayan faktörler arasındadır (166). Stres maruziyeti ile beyinde BDNF ifadesinin azaldığı ve buna bağlı olarak nörotrofik destek eksikliğinin depresyona neden olduğu ortaya atılmıştır (167).

Çalışmamızda kronik aralıklı soğuk strese maruz bırakılan adolesan sıçanlarda prefrontal korteks ve striatum beyin bölgelerinde BDNF düzeyi anlamlı olarak azalmış bulunmuştur.

Stres maruziyeti ve BDNF düzeyleri ile ilgili literatürde çelişkili sonuçlar bulunmaktadır. Adolesan SD sıçanlara 7 gün sosyal stres maruziyeti sonrası hipokampus BDNF düzeyleri, erişkin dönemde ölçüldüğünde stres grubunda daha fazla bulunmuştur (168).

Erken gelişimsel dönemde anneden ayrılma stresine kronik olarak, postnatal 1-21 gün boyunca günde 3 saat maruz bırakılan ratlarda prefrontal kortekste BDNF azalmış bulunmuştur (169). Bu çalışmada BDNF düzeyleri, açık alan testinde açık alanın merkezinde harcanan zamanla pozitif olarak ilişkili bulunmuş ve araştırmacılar, PFK' deki BDNF seviyelerinin genç erkek sıçanlarda anksiyete benzeri davranışların programlanmasında rol oynayabileceği olasılığını ortaya atmışlardır. Anksiyete ve PFK BDNF düzeylerinde benzer değişikliklerin olup olmadığını netleştirmek için ek çalışmalara ihtiyaç olduğunu önermişlerdir (169). Çalışmamızda PFK BDNF ve merkezde geçirilen süre bulguları pozitif korelasyon göstermiş ve literatürdeki bulguları destekler niteliktedir.

Sosyal strese maruz bırakılan sıçan çalışmalarının değerlendirildiği bir sistematik derlemede tüm yaş gruplarında (sütten kesme sonrası, adolesan, yetişkin dönemler) tanımlanan çalışmaların çoğu, hipokampusta BDNF ifadesinin azaldığını bildirmiştir (170). Diğer beyin bölgelerinde BDNF ifadesi hakkında çok daha az yayınlanmış veri vardır. BDNF ifadesinin işlevi olarak davranış değişikliklerini değerlendiren veriler de azdır, ancak BDNF'nin aşağı düzenlemesi, artan anksiyete benzeri semptomlarla ilişkili görülmektedir (170).

Adolesan sıçanlara 6 hafta sosyal stres uygulandığında hipokampusta BDNF değişiklik göstermemiş olmasına rağmen 10 haftalık sosyal izolasyon hipokampusta BDNF düzeylerini azaltmıştır (171). Çalışmamızda 25 gün uygulanan stres modelinde hipokampusta anlamlı BDNF azalmasını gözlemleyememiş olmamızın sebebi strese maruziyetin süresiyle ilgili olabilir. Araştırmacılar, bu çalışmada BDNF düzeyinde gözlemlenen azalmanın zaman sürecini, BDNF'nin stresle düzenlenen diğer faktörlerdeki ilk değişiklikleri izleyen ikincil bir mekanizma olduğu şeklinde yorumlamıştır. Özellikle BDNF' de gözlenen azalmanın ve hipokampal nörogenezdeki bozulmanın başlangıçta glukokortikoid seviyelerindeki artış nedeniyle olduğunu önermiştir. Yüksek konsantrasyonda kortizolun hipokampusta BDNF salgılanmasını engellediği önceki çalışmada gösterilmiştir (172). BDNF azalmasına stres kaynaklı GK artışının aracılık ediyor olabileceği ortaya atılmıştır (71). Yaptığımız korelasyon analizinde bu bulguyu destekleyen, stres gruplarında hipokampusta kortizol düzeyi ile BDNF düzeyi arasında negatif korelasyon bulunmuştur.

Adolesan Wistar sıçanlarla yapılan bir çalışmada 9 haftalık sosyal izolasyon stresi, hipokampusta BDNF azalmasına yol açmıştır (173).

Literatürde adolesan dönemde soğuk stres maruziyeti ve BDNF üzerine etkilerini değerlendiren çalışma bulunmamaktadır. Erişkin dönemde soğuk stresin BDNF üzerine etkileri ile ilgili yapılmış çalışmalara baktığımızda erişkin SD sıçanlar, 5 gün boyunca tekrarlayan soğuk strese maruz bırakılmış, prefrontal korteks, amigdala, hipokampus ve striatum BDNF düzeyleri gruplar arasında anlamlı fark bulunamamıştır. Araştırmacılar bunu uyguladıkları stres modeli tarafından indüklenen BDNF' deki değişikliğin küçük olması nedeniyle tespit edememiş olabilecekleri şeklinde yorumlamıştır (69). Bu çalışmada erişkin sıçanlar kullanılmış olup adolesan sıçanlar stresin etkilerine BDNF yanıtı açısından daha duyarlı olabilir.

BDNF düzeylerinde azalmanın depresyon için önemli bir mekanizma olduğu ileri sürülmektedir (70). Çalışmamızda prefrontal korteks BDNF düzeyi ve depresyon testinde değerlendirdiğimiz yüzmeye süresi arasında pozitif korelasyon bulmamız bu bulguyu desteklemektedir.

Bazal gangliyonların önemli bir bileşeni olan striatum; hareket kontrolü, ödül ve bağımlılık gibi birçok işlevden sorumludur (166). Depresyonun önemli bir bulgusu olan anhedoninin, mezolimbik striatum sistemine bağlı ödül devresindeki bozukluklardan kaynaklandığını gösteren çalışmalar mevcuttur (174). Adolesanlarla yapılan bir klinik çalışmada, fonksiyonel görüntüleme bulgularında majör depresif bozukluğu bulunan ergenlerde, anhedoni semptom şiddeti striatal ağlar ile korelasyon göstermiştir (175). Çalışmamızda strese maruz bırakılan adolesan sıçanların özellikle striatum ve prefrontal korteks bölgelerinde BDNF düzeyinin anlamlı azaldığının gösterilmiş olması depresyonun temel bulgularından anhedoni ve ödülle ilgili devrelerde bozukluklar olması ile ilişkilendirilebilir. Davranış testlerinde stres grubu sıçanlarda gözlediğimiz anhedoni bulgusu ile bu sonuçlar uyumludur.

Çalışmamızda striatumda BDNF azalması gözlemlenmiştir. Farklı stres modellerinde striatumda BDNF değerlendiren çok az çalışma vardır. Bir çalışmada süten kesilme sonrası 8 hafta sosyal izolasyona maruz bırakılan SD sıçanlarda striatumda BDNF düzeyi azalmıştır (176). Erişkin sıçanlarda ise 8 hafta sosyal izolasyon stresine maruz bırakıldığında striatumda BDNF düzeylerinde anlamlı fark bulunamamıştır (177).

BDNF mRNA' sının, striatumda çok düşük seviyelerde ifade edildiği ve nörotrofinin özellikle prefrontal korteksten anterograd aksonal taşınım yoluyla taşındığı bilinmektedir (178). Bu nedenle prefrontal kortekste BDNF gen ifadesinin değiştirilmesinin, striatum gibi diğer beyin bölgelerinde de sonuçları olabilmektedir (179). Dolayısıyla, dopaminerjik hücreleri ve striatal nöronları destekleyen nörotrofinin varlığı, prefrontal korteksteki üretimine bağlı olabilir (180). Çalışmamızda striatumdaki BDNF proteini seviyelerinde azalma ile birlikte, prefrontal kortekste de azaldığını bulduk. Bu gözlemin önemli sonucu, yaşamın erken dönemlerindeki olumsuz olayların striatal BDNF düzeylerini düşürmesi ve hayatta kalmanın bu nörotrofine bağlı olduğu nöronları tehlikeye atabilmesidir.

Yaptığımız analizlerde BDNF ve depresyon bulguları arasında korelasyon bulunmuştur. Verilerimiz, BDNF düzeyindeki azalmaların, gelişimsel dönemler sırasında strese maruz kalmayı takiben beyin davranış fonksiyonundaki bozulmaya katkıda bulunabileceği fikrine daha fazla destek sağlamaktadır. Striatumda BDNF azalması, striatum fonksiyonunu etkileyebilir, klinikte depresif hastalarda gözlemlenen anormal kas gerimine yol açabilir.

7.8. Kortizol Bulgularının Değerlendirilmesi

Başlıca stres hormonu olan kortizol, strese nörohumoral yanıt oluşturarak davranışsal adaptasyonları kontrol etmektedir. Stres, kortizol seviyesini arttırmaktadır (181). Yüksek GK seviyelerine maruz kalma, süresine bağlı olarak beyinde etkiler oluşturmaktadır (182).

Prefrontal korteks (PFK), yürütücü işlevlerden sorumlu beyin bölgesidir. Bununla birlikte, strese maruz kalmanın zararlı etkilerine en duyarlı olan beyin bölgesi olduğu söylenmektedir (183). Hafif akut stres bile prefrontal bilişsel yeteneklerin hızlı ve dramatik kaybına neden olabilir ve daha uzun süreli strese maruz kalma prefrontal dendritlerde yapısal değişikliklere neden olmaktadır (183).

Çalışmamızda adolesan sıçanlarda stres grubunda, serum ve prefrontal kortekste kortizol düzeyleri artmış bulunmuştur.

Soğuk stres, adolesan dönemde maruziyet ve beyinde kortizol düzeylerini birlikte değerlendiren çalışma daha önce yapılmamıştır.

Kortizol düzeylerine serumda bakılan çok sayıda çalışma olmasına rağmen, farklı beyin bölgelerinde kortizol düzeyleri karşılaştırılan çalışmalar kısıtlı sayıda bulunmaktadır. 6 hafta kronik öngörülemeyen stres uygulanan erişkin farelerde, GK düzeyleri ve GK cevabının göstergesi olan bazal fosforile edilmiş/aktive edilmiş ürünler, HPA aksı GK geri bildirimi için kilit bölgeler olan prefrontal korteks ve dorsal hipokampus CA1 alanında bakılmış ve belirgin şekilde artmıştır (184).

Prefrontal kortekste ölçtüğümüz kortizol artışının kaynağı, adrenal bezlerden salgılanan kortizol olabilir. Kortizol, periferde üretilip taşıyıcı protein olan P glikoprotein pompa ile kan beyin bariyerinden geçmektedir. Kortizolun adrenal dışı üretimi olabileceği de tartışılmaktadır, ancak bu konuda kesinleşmiş bilgi bulunmamaktadır (185).

Kronik aralıklı soğuk stresin serum kortizol seviyelerini arttırdığı önceki çalışmalarda gösterilmiştir (87). Adolesan dönemdeki sıçanlarda, farklı kronik stres modelinde strese yanıt olarak serum glukokortikoid artışı gösterilmiştir (186)

Önceki çalışmalarda, bu çalışmada elde edilen sonuçlara benzer şekilde farklı stresli koşullar altında kemirgenlerde kortizol yükselmeleri gösterilmiştir. Plazma kortizol seviyeleri, 14 gün boyunca kronik tekrarlayan kısıtlama stresine (187) veya 21 gün boyunca öngörülemeyen strese maruz kalan sıçanlarda önemli ölçüde artmıştır (188). Serumda kortizol düzeyleri artışı hayvanların strese maruz kaldığının göstergesidir.

Kortikosteroid geribildirimının CRH mRNA düzeylerini düşürmesi doza bağımlı bir şekilde gerçekleştiği, hem fiziksel hem de psikolojik stresörlerin CRH mRNA' da güçlü ve kolayca tekrarlanabilir bir artışa yol açacağı ve bu yanıtların dolaşımdaki GK değişikliklerle önlenemeyeceği ifade edilmiştir (189). Bu çalışmada kronik soğuk stres maruziyetinin plazma kortizolünün artmasına neden olduğu ve muhtemelen yukarıdaki araştırmacılar tarafından belirtilen mekanizmalarla plazma kortizolünün 25. günde bile yüksek kaldığı iddia edilebilir. Kronik streste kortizol düzeylerinin seyrine baktığımızda yapılan bir araştırmada kortizol konsantrasyonları, kronik kısıtlama stresinin ilk günlerinde en yüksek seviyeye çıkmış, 8. günde kortizol derişimleri azalmış, 23. günde yeniden arttığı bildirilmiştir (129). Aynı araştırmada sonuçlar, kortizol ve kortikosteron yanıtının stres faktörlerine göre farklılık gösterdiğini ve kortizol cevabının kortikosterondan daha hızlı olduğunu göstermiştir (129). Adolesan sıçanlarda kortizol yanıtına baktığımızda, HPA aksının gelişiminin tamamlanmamış

olması nedeniyle strese yanıtta kortizol düzeylerinin daha uzun süre yüksek kaldığı bilinmektedir (190). Yetişkin hayvanlara kıyasla prepubertal dönemde farklı stres tepkilerinin fizyolojik ve davranışsal etkileri net olarak bilinmemektedir. Bununla birlikte, iki faktörün prepubertal beyni strese karşı özellikle savunmasız hale getirebileceği söylenmektedir. Birincisi, aynı dozda GK artışı hipokampal glutamat reseptör alt birimi ekspresyonunu prepubertalde yetişkin erkeklere göre daha fazla artırdığından, prepubertal beyin kortikosterona daha duyarlı olabilir. İkincisi, hipokampus, PFK ve amigdala gibi adolesan dönemde olgunlaşmaya devam eden beyin bölgeleri de GK en duyarlı bölgelerdir. Bu nedenle, benzer bir stres etkeni ile karşılaşıldığında, tam olarak olgunlaşmamış ve muhtemelen daha hassas peripubertal beyin, gelişmiş yetişkin beynine kıyasla kortikosterona farklı maruziyet etkileri göstermektedir (190).

Hipokampus ve PFK, depresyonda nöropatolojinin temel bölgeleri olarak görülmektedir. Çalışmamızda stres maruziyeti ile prefrontal kortizol düzeylerinde anlamlı artış saptanmış olup adolesan dönemde bu beyin bölgesinin stresin etkilerine daha duyarlı olduğu söylenebilir.

7.9. İnflamasyon Bulgularının Değerlendirilmesi

Genel olarak inflamatuvar süreçler ve özellikle proinflamatuvar sitokin interleukin-1 betanın (IL-1 β) depresyonun etiyolojisi ve patofizyolojisinde önemli bir rol oynadığı pek çok çalışmada üzerinde durulmuştur (191, 192). Stres modelinden bağımsız olarak, strese maruz kalma sırasında IL-1 β sinyalini bloke etmek, anhedoni ve anksiyete davranışlarının başlamasını önlemektedir (193). IL-1 β geni, psikiyatrik hastalıklarda araştırılması için aday bir gen olarak kabul edilmiştir (194). IL-1 β tek nükleotid polimorfizmlerinin depresif ve anksiyete belirtileri üzerindeki etkileri, stresin şiddeti ve türüne göre belirlendiği ortaya atılmıştır (195). İnflamasyonun önemli bir aracısı olan yüksek düzeyde IL-1 β , beyinde, özellikle de bellek ve ruh hali düzenlemesinde önemli bir rol oynayan hipokampusta ifade edilir (196).

Katekolaminler ve glukokortikoidler, strese maruz kaldıktan sonra beyinde sitokin üretiminin düzenlenmesinde kritik rol oynar. Strese maruz kaldıktan sonra, IL-1 β öncelikle mikroglia tarafından üretildiği düşünülmektedir (196). Bu sonuçlar, stres maruziyetini takiben

hipokampal IL-1 β protein seviyelerinde artış gösteren kemirgenlerde yapılan çalışmalarla tutarlıdır.

Çalışmamızda beyin bölgelerinde inflamasyon belirteçlerinden IL-1 β ve TNF- α düzeyleri karşılaştırılmış, hipokampus ve talamusta anlamlı IL-1 β artışı bulunmuştur.

Soğuk stres modelinde ve adolesan dönemde stresin beyinde inflamasyon etkisine bakan çalışma bulunmamakta, farklı stres modelleri ve beyinde inflamasyon çalışmaları mevcuttur. Erişkin fare kronik öngörülemez hafif stres modelinde beyinde inflamasyon bulguları, TNF- α , IL-1 β ve IL-6 protein ifadesi, öngörülemez kronik hafif strese maruz bırakılan farelerde prefrontal korteks ve hipokampus beyin bölgelerinde kontrolden önemli ölçüde daha yüksek seviyelerde bulunmuştur. Araştırmacılar hipokampusun, depresyonda akut inflamasyona daha duyarlı olduğu yorumunu yapmıştır (197).

Erişkin farelere 5 haftalık kronik hafif stres uygulaması ile hipokampal IL-1 β protein artışı gösterilmiştir (198). Stres modellerinin şiddet karşılaştırması süre karşılaştırmasına göre daha zordur. Çünkü karşılaştırmalı fizyolojik verilerin yokluğunda farklı stres prosedürlerinin göreceli şiddeti belirsizdir (199).

Stres maruziyeti sonrası sitokinlerin değerlendirildiği bir derlemede araştırmacılar, kronik stresten sonra yüksek beyin sitokin düzeylerini bildiren çalışmaların yüzdesi açısından en sık araştırılan alanların hipokampus ve prefrontal korteks olduğunu bulmuştur. Bu alanlarda, beyin inflamatuvar sitokin seviyelerinde artış bildiren çalışmaların yüzdesi %56,8 (prefrontal kortekste IL-1 β) ile %75,6 (hipokampusta IL-1 β) arasında değişmektedir. Hipotalamusta artan inflamatuvar sitokin seviyelerini bildiren çalışmaların yüzdesi önemli ölçüde daha düşüktür (196).

Hipokampal nörojenez, depresyonla ilişkilendirilmiş ve beyin IL-1 β düzeyinden etkilenebilecek bir süreç olduğu ortaya konmuştur. Mikroglial IL-1 β üretiminin anksiyete patofizyolojisinde de önemli olduğu ortaya atılmıştır (200).

Çalışmamızda talamusta inflamasyon artışı gösterilmiştir. Yapılan bir çalışmada soğuk stresten etkilenen beyin bölgeleri arasında talamusun olduğu da gösterilmiştir (201). Talamik çekirdekler, soğuk stres kaynaklı zararlı uyarıların hedefi olarak bulunmuştur. Hipotalamo-

hipofiz-adrenal aksa ek olarak, soğuk stres sırasında homeostazın korunmasında önemli bir rol oynayabileceği ortaya atılmıştır (201). Çalışmamızda diğer stres türlerinden farklı şekilde stres tipine bağlı olarak soğuk strese, talamusta inflamasyon artışı görülmüş olabilir.

7.10. Oksidatif Stres Bulgularının Değerlendirilmesi

Fizyolojik koşullar altında organizmada oksidatif ve antioksidatif sistemler arasında bir denge vardır. Beyin, nispeten yüksek peroksidize edilebilir yağ asitleri içeriği ve sınırlı antioksidan kapasitesi nedeniyle oksidatif hasara özellikle eğilimlidir (202). Oksidatif stres, makromoleküler oksidatif hasara neden olur, doku protein denatürasyonunu, DNA hasarını ve lipid peroksidasyonunu indükler. Oksidatif olarak hasar görmüş proteinlerin, beyin protein hasarı ve işlev bozukluğunun en önemli nedenlerinden biri olduğu bilinmektedir (203). Protein karbonil oluşumu, oksidatif stresten kaynaklanan en çok çalışılan belirteçlerden biridir ve kolayca saptanabilir ve nicelleştirilebilir (204).

Bazı oksidatif stres parametereleri çalışmamızda soğuk stres grubunda artmış bulunmuştur. Protein karbonil stres grubunda striatuma artmış olup kontrol ve stres gruplarında beyin bölgelerinde ROS ve MDA düzeyleri açısından fark bulunamamıştır. TAS, stres grubunda prefrontal korteks ve talamusta azalmış, OSI stres grubu sıçanlarda prefrontal kortekste artmıştır.

Soğuk stres ve adolesan ve beyinde oksidatif stres durumunun birlikte değerlendirildiği çalışma bulunmamaktadır. Erişkin sıçanlarda soğuk stres ve beyinde oksidatif stres duyarlılıkları karşılaştırıldığı çalışmalara bakıldığında, yapılan bir çalışmada akut immobilizasyon, akut soğuk, kronik sosyal izolasyon stres modelleri maruziyeti ile beyinde MDA ve protein karbonil düzeyleri, kortizol düzeyleri değerlendirilmiş prefrontal korteks ve hipokampus strese duyarlılık açısından karşılaştırılmıştır. MDA artışı akut immobilizasyon stresinde gözlenmezken, akut soğuk stres uygulanmasında gözlenmiştir. Hipokampusun oksidatif strese daha az duyarlı olduğu sonucuna ulaşılmıştır (205). Bizim çalışmamızda da hipokampus oksidatif strese daha az duyarlı bulunmuştur.

Farklı stres modelleri ve beyinde oksidatif stres bulgularını değerlendiren çalışmalardan birinde kronik hafif strese maruz bırakılan erişkin sıçanlarda kontrol grubuna kıyasla

hipokampus ve prefrontal korteks MDA düzeyleri açısından anlamlı fark bulunmamıştır. Kronik hafif strese maruz bırakılan erişkin sıçanlarda antioksidan aktivite azalmıştır (206).

Erişkin sıçanlarda immobilizasyon stresi maruziyeti ile kortekste MDA düzeyleri 7, 14 ve 21. günlerde bakıldığında 14 ve 21. günlerde artmış bulunmuştur (207).

Toplam oksidan seviyeleri (TOS) genellikle vücudun genel oksidasyon durumunu tahmin etmek için kullanılmaktadır. Benzer şekilde, toplam antioksidan seviyeleri (TAS), vücudun genel antioksidan durumunu ölçmek için kullanılmaktadır. TOS' un TAS' a oranı olan oksidatif stres indeksi (OSI), TAS ve TOS' un kapsamlı bir ölçümü olduğu için vücuttaki oksidatif stresin daha kesin bir indeksi olabilir. TOS, TAS ve OSI vücuttaki genel oksidatif stres durumunu değerlendirmek için kullanılan oksidatif stres parametreleridir (208). Prenatal stres uygulanan sıçanların, adolesan dönemde total antioksidan kapasitesi ölçülen bir çalışmada TAS ve SOD anlamlı olarak azalmış, MDA düzeyi artmıştır (209). Klinik bir çalışmada major depresif bozukluk hastalarında kontrol grubuna göre TOS ve OSI daha yüksek ve TAS daha düşük bulunmuştur (210). Daha önceki bir çalışmada TAS veya TOS' un bağımsız ölçülmesinin bir deneğin oksidatif stres durumunu doğru bir şekilde yansıtmayabileceği ortaya atılmıştır (208). Bunun nedeni, dokunun veya hücrenin oksidan-antioksidan sisteminin, TAS ve TOS aynı anda arttığında veya azaldığında dinamik bir dengede kalabilmesidir, dolayısıyla bu değerler tek başına oksidatif stres durumunu yansıtmayacaktır. Bu nedenle TAS ve TOS değerlerinin aynı anda belirlenmesi ve OSI değerinin hesaplanması, deneğin oksidatif stres durumunun değerlendirilmesinde daha faydalıdır. Bizim çalışmamızda stres maruziyeti ile peripubertal sıçanlarda prefrontal korteks beyin bölgesinde OSI artışı gözlenmiştir.

Striatumda protein karbonil artışı ve prefrontal kortekste oksidatif stres indeksi artışı anksiyete ve depresyon patofizyolojisinde bu beyin bölgelerinin rolünü düşündürmektedir.

Çalışmamızda hipokampus inflamasyona, prefrontal korteks oksidatif strese daha duyarlı bulunmuştur.

Bu çalışmanın amacı, adolesan dönemde kronik aralıklı soğuk stres maruziyetinin beyinde depresyon ve anksiyete benzeri davranışlara olan etkisini; sistemik inflamasyon ve kan parametrelerine olan etkisini ve beyinde inflamasyon, oksidatif stres, BDNF düzeylerine

olan etkisini incelemektir. Kronik stres, depresyon ve anksiyetenin patogeneğinde önemli rol oynamaktadır. Bu çalışmada, kronik aralıklı soğuk strese maruz kalan sıçanların anhedoni, depresyon ve anksiyete benzeri davranışları ölçen testlerde davranışsal farklılıklar sergilediklerini ortaya çıkardık. Stres maruziyeti ile farklı beyin bölgelerinde oksidatif stres artışı, BDNF düzeylerinin azalmış bulunması, hipokampusta inflamasyon artışı gibi moleküler bulgular davranışsal sonuçları destekler niteliktedir.

Çocukluk ve ergenlik döneminde, bilişsel alanları şekillendiren beyin bölgeleri sürekli olarak gelişmektedir. Bu dönemlerde, stres ve inflamasyon gibi ekzojen ve endojen faktörlerden etkilenen beynin yapısal ve işlevsel organizasyonunu değerlendirmek, gelişimsel bir pencere sağlaması açısından önem taşımaktadır.



8. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamızda kronik strese maruz bırakılan hayvanlarda depresyon ve anksiyete benzeri davranışlar geliştiği gözlenmiştir. Kronik stresin psikiyatrik hastalıkların gelişimiyle ilişkili olabileceği hakkında görüş sunmaktadır. Kronik stres paradigmaları, kemirgenlerin günlük insan yaşamının stresli olaylarını taklit eden doğal stresörlere maruz kalmalarını ifade etmektedir

Çalışmamızda kronik aralıklı soğuk stres modeli, peripubertal dönem sıçanlar için uyarlanmıştır. Deney hayvanlarında uygulanan farklı stres modelleri içinde kronik aralıklı soğuk stres modeli test edilmiştir ve bu deney modeli davranış parametreleri ölçülerek etkileri doğrulanmıştır. Soğuk stresin davranışlar üzerindeki etkileri günlük yaşamımıza ve hipotermi ile seyreden klinik durumlara da uyarlanabilmektedir. Literatür incelendiğinde soğuk stres ile ilgili çalışmalar yetersizdir.

Periadolesan dönem sıçanlarda stres davranışlar üzerinde anlamlı fark oluşturmuş ve pek çok davranış testi ile bu etki gösterilmiştir. Adolesan dönemin stresin davranış üzerine etkileri açısından hassas bir dönem olduğu gösterilmiştir. Literatür incelendiğinde kronik stresin adolesan dönemde etkisi tam olarak belirlenememiştir.

Davranışsal düzeyde stres değerlendirildiğinde anksiyete benzeri davranışlar açık alan testi, yükseltilmiş artı labirent, aydınlık karanlık kutusu testlerinde; depresyon benzeri davranışlar şeker seçim testi, zorunlu yüzme testlerinde doğrulanmıştır.

Açık alan testinde iki ayak üzerine kalkma davranışı hem destekli hem destek almadan ayrı ayrı değerlendirilmiş ve stresle bu davranışın azaldığı gösterilmiştir. Açık alandan kaçınma davranışının stresle arttığı gösterilmiştir.

Depresyonun temel klinik semptomlarından depresif ruh hali ve anhedoniye benzeyen depresyon benzeri semptomlar, sıçan modelinde zorunlu yüzme testi ve şeker seçim testi ile

değerlendirilmiştir. Zorunlu yüzme testinde stres grubundaki sıçanlarda toplam hareketsizlik süresi uzamıştır. Şeker seçim testinde kronik aralıklı soğuk strese maruz bırakılan adolesan sıçanlarda sükrözlü su tüketimi %65' in altına düşmüştür. Depresyonun kliniğiyle ilişkili lokomotor aktivitede azalma, açık alan testinde değerlendirilmiş, toplam kat edilen mesafede azalma gösterilmiştir.

Yükseltilmiş artı labirent testinde açık kolda geçirilen süre, açık ve kapalı kol geçiş sayısı ve açık kolu ilk terketme süresi kronik aralıklı soğuğa maruz bırakılan sıçanlarda azalmıştır. Kronik strese maruz bırakılan peripubertal sıçanlarda araştırma amaçlı aşağı bakma davranışı sayısı azalırken strese bağlı gergin duruş sayısı artmıştır. Davranışsal ölçümleri bütünleştiren anksiyete indeksi değeri, stres grubu sıçanlarda daha yüksek çıkmıştır.

Aydınlık karanlık kutusunda aydınlık alanda geçirilen süre, strese maruz bırakılan sıçanlarda daha az bulunmuştur.

Kronik aralıklı soğuk strese maruz bırakılan adolesan sıçanlarda kontrol grubuna kıyasla, prefrontal korteks ve striatumda BDNF düzeyi azalmış, prefrontal kortekste kortizol düzeyi artmış, hipokampus ve talamusta IL-1 β düzeyi artmış, striatumda protein karbonil düzeyi artmış, prefrontal korteks ve talamusta TAS azalmıştır. Hipokampus inflamasyona, prefrontal korteks oksidatif strese daha duyarlı bulunmuştur.

Beyinde moleküler bulgular ile davranış testleri arasında korelasyon bulunmuştur. Prefrontal korteks BDNF düzeyleri; yüzme süresi ile pozitif, hareketsiz kalma süresi ile negatif ilişkili, anksiyete indeksi ile negatif ilişkili bulunmuştur.

Stresin neden olduğu psikiyatrik hastalık modelleri, stres etkeni özelliklerine (örneğin; fiziksel veya sosyal), süresine (akut veya kronik) ve maruz kalma zamanına (erken yaşam veya yetişkin dönem) göre sınıflandırılabilir. Bu çalışmada erken yaşam, kronik stres maruziyetinin etkileri araştırılmıştır.

Stresin davranışlar üzerinde etkisini belirleyen pek çok farklı parametre bulunmaktadır. Yapılan literatür taramalarında stres modellerinde stresöre bağlı özellikler; stresin türü (soğuk stres, sosyal stres, kısıtlama stresi), stresin süresi (akut veya kronik), stresörün şiddeti (soğukun derecesi, elektrik şokunun voltajı), ve deneğin özelliklerinin; deneğin yaşı (adolesan

dönem, erişkin dönem), deneğin cinsiyeti (erkek veya dişi), deneğin türü (Wistar sıçan, SD sıçan, fare) davranış sonuçlarını önemli ölçüde etkilediği saptanmıştır. Bu değişkenlerin etkilerinin değerlendirilmesi stresin nörobiyolojisini anlamakta önemlidir.

Çalışmamızda aynı stres paradigması, insanlarda yüksek komorbiditeye sahip olan hem anksiyeteyi hem de depresyonu modellemiştir.

Sonuçlar değişkenler değiştirilerek test edilebilir, karşılaştırma yapılabilir. Stresin beyinde oluşturduğu yıkıcı etkiler ve davranışlar üzerine olumlu etkisi olabilecek ilaçlar, egzersiz, çevresel zenginleştirme gibi uygulamaların test edilmesi bu çalışmanın önerileri arasındadır.

Pek çok kronik hastalık ve inflamatuvar durumda eritrosit hacminde artmış heterojenite olduğu gösterilmiştir. Kronik strese maruz bırakılan depresyon ve anksiyete benzeri davranışlar gösteren sıçanlarda da RDW artışı gözlemledik. Sonuç olarak bu çalışma, depresyon / anksiyete benzeri davranışlar ile RDW gibi hematolojik inflamatuvar belirteç seviyeleri arasında pozitif bir ilişki olduğunu göstermiştir.

Bulgularımız, adolesan dönemin hassas bir gelişim dönemi olduğu ve bu dönemdeki stresin akut, dramatik etkileri olabileceği önermesini desteklemektedir. Çalışmamız, erken dönem kronik stres maruziyetinin önemli ölçüde daha yüksek majör depresyon geliştirme riskine sahip olduğunu gösteren insan çalışmaları ile uyumludur. Kronik adolesan stresinin etkilerini araştıran çalışmalar, insanlarda depresif ve anksiyete bozukluklarının mekanizmalarının daha iyi anlaşılmasına ve sonuçta önleme ve tedavi stratejilerinin iyileştirilmesine yol açabilir.

Çalışmamızın amacı, soğuk stresin anksiyete ve depresyon davranışı üzerindeki etkisini araştırmaktır. Elde edilen sonuçlar, adolesan dönemde kronik strese maruz kalan kişilerde meydana gelebilecek davranışsal ve bilişsel değişiklikleri açıklayabilir.

9. KAYNAKLAR

1. Selye H. A syndrome produced by diverse nocuous agents. 1936. The Journal of neuropsychiatry and clinical neurosciences. 1998;10(2):230-1.
2. Mason JW. Strategy in psychosomatic research. Psychosomatic medicine. 1970;32(4):427-39.
3. Bali A, Jaggi AS. Preclinical experimental stress studies: protocols, assessment and comparison. European journal of pharmacology. 2015;746:282-92.
4. Lazarus RS. Some principles of psychological stress and their relation to dentistry. Journal of dental research. 1966;45(6):1620-6.
5. Liston C, Cichon JM, Jeanneteau F, Jia Z, Chao MV, Gan WB. Circadian glucocorticoid oscillations promote learning-dependent synapse formation and maintenance. Nature neuroscience. 2013;16(6):698-705.
6. Uemura K, Iguchi A, Yatomi A, Miura H, Honmura A, Yanase M, et al. Involvement of the hippocampus in central nervous system-mediated glucoregulation in rats. Endocrinology. 1989;124(5):2449-55.
7. Antoun M, Edwards KM, Sweeting J, Ding D. The acute physiological stress response to driving: A systematic review. PloS one. 2017;12(10):e0185517.
8. McEwen BS, Stellar E. Stress and the individual. Mechanisms leading to disease. Archives of internal medicine. 1993;153(18):2093-101.
9. Fedoce ADG, Ferreira F, Bota RG, Bonet-Costa V, Sun PY, Davies KJA. The role of oxidative stress in anxiety disorder: cause or consequence? Free radical research. 2018;52(7):737-50.
10. Hauger RL, Risbrough V, Oakley RH, Olivares-Reyes JA, Dautzenberg FM. Role of CRF receptor signaling in stress vulnerability, anxiety, and depression. Annals of the New York Academy of Sciences. 2009;1179:120-43.
11. Garabedian MJ, Harris CA, Jeanneteau F. Glucocorticoid receptor action in metabolic and neuronal function. F1000Research. 2017;6:1208.

12. Ulrich-Lai YM, Herman JP. Neural regulation of endocrine and autonomic stress responses. *Nature reviews Neuroscience*. 2009;10(6):397-409.
13. McEwen BS, Bowles NP, Gray JD, Hill MN, Hunter RG, Karatsoreos IN, et al. Mechanisms of stress in the brain. *Nature neuroscience*. 2015;18(10):1353-63.
14. Gray JD, Kogan JF, Marrocco J, McEwen BS. Genomic and epigenomic mechanisms of glucocorticoids in the brain. *Nature reviews Endocrinology*. 2017;13(11):661-73.
15. Xu B, Lian S, Guo JR, Wang JF, Zhang LP, Li SZ, et al. Activation of the MAPK signaling pathway induces upregulation of pro-apoptotic proteins in the hippocampi of cold stressed adolescent mice. *Neuroscience letters*. 2019;699:97-102.
16. Lupien SJ, Juster RP, Raymond C, Marin MF. The effects of chronic stress on the human brain: From neurotoxicity, to vulnerability, to opportunity. *Frontiers in neuroendocrinology*. 2018;49:91-105.
17. Jaggi AS, Bhatia N, Kumar N, Singh N, Anand P, Dhawan R. A review on animal models for screening potential anti-stress agents. *Neurological sciences : official journal of the Italian Neurological Society and of the Italian Society of Clinical Neurophysiology*. 2011;32(6):993-1005.
18. Kvetnansky R, Mikulaj L. Adrenal and urinary catecholamines in rats during adaptation to repeated immobilization stress. *Endocrinology*. 1970;87(4):738-43.
19. Southwick SM, Bremner D, Krystal JH, Charney DS. Psychobiologic research in post-traumatic stress disorder. *The Psychiatric clinics of North America*. 1994;17(2):251-64.
20. Manchanda RK, Jaggi AS, Singh N. Ameliorative potential of sodium cromoglycate and diethyldithiocarbamic acid in restraint stress-induced behavioral alterations in rats. *Pharmacological reports : PR*. 2011;63(1):54-63.
21. Sulzman FM. Life sciences space missions. Overview. *Journal of applied physiology*. 1996;81(1):3-6.
22. Ladd CO, Thiruvikraman KV, Huot RL, Plotsky PM. Differential neuroendocrine responses to chronic variable stress in adult Long Evans rats exposed to handling-maternal separation as neonates. *Psychoneuroendocrinology*. 2005;30(6):520-33.
23. Kuhn CM, Pauk J, Schanberg SM. Endocrine responses to mother-infant separation in developing rats. *Developmental psychobiology*. 1990;23(5):395-410.

24. Varty GB, Paulus MP, Braff DL, Geyer MA. Environmental enrichment and isolation rearing in the rat: effects on locomotor behavior and startle response plasticity. *Biological psychiatry*. 2000;47(10):864-73.
25. Kosten TA, Kehoe P. Neonatal isolation is a relevant model for studying the contributions of early life stress to vulnerability to drug abuse: response to Marmendal et al. (2004). *Developmental psychobiology*. 2005;47(2):108-10.
26. Kosten TA, Zhang XY, Kehoe P. Chronic neonatal isolation stress enhances cocaine-induced increases in ventral striatal dopamine levels in rat pups. *Brain research Developmental brain research*. 2003;141(1-2):109-16.
27. Guo W, Lian S, Zhen L, Zang S, Chen Y, Lang L, et al. The Favored Mechanism for Coping with Acute Cold Stress: Upregulation of miR-210 in Rats. *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology*. 2018;46(5):2090-102.
28. Wang X, Che H, Zhang W, Wang J, Ke T, Cao R, et al. Effects of Mild Chronic Intermittent Cold Exposure on Rat Organs. *International journal of biological sciences*. 2015;11(10):1171-80.
29. Hata T, Nishimura Y, Kita T, Itoh E, Kawabata A. The abnormal open-field behavior of SART-stressed rats and effects of some drugs on it. *Japanese journal of pharmacology*. 1988;48(4):479-90.
30. Elmarzouki H, Aboussaleh Y, Bitiktas S, Suer C, Artis AS, Dolu N, et al. Effects of cold exposure on behavioral and electrophysiological parameters related with hippocampal function in rats. *Frontiers in cellular neuroscience*. 2014;8:253.
31. MacDougall MJ, Howland JG. Acute stress, but not corticosterone, disrupts short- and long-term synaptic plasticity in rat dorsal subiculum via glucocorticoid receptor activation. *Cerebral cortex*. 2013;23(11):2611-9.
32. Schoner J, Heinz A, Endres M, Gertz K, Kronenberg G. Post-traumatic stress disorder and beyond: an overview of rodent stress models. *Journal of cellular and molecular medicine*. 2017;21(10):2248-56.
33. Beesdo K, Knappe S, Pine DS. Anxiety and anxiety disorders in children and adolescents: developmental issues and implications for DSM-V. *The Psychiatric clinics of North America*. 2009;32(3):483-524.
34. Association AP. *Diagnostic and statistical manual of mental disorders (DSM-5®)*: American Psychiatric Pub; 2013.

35. Kilic C. Editorial. Turk psikiyatri dergisi = Turkish journal of psychiatry. 2020;31(2):A2.
36. Martin EI, Ressler KJ, Binder E, Nemeroff CB. The neurobiology of anxiety disorders: brain imaging, genetics, and psychoneuroendocrinology. *The Psychiatric clinics of North America*. 2009;32(3):549-75.
37. Drevets WC. Neuroimaging and neuropathological studies of depression: implications for the cognitive-emotional features of mood disorders. *Current opinion in neurobiology*. 2001;11(2):240-9.
38. Treede RD, Kenshalo DR, Gracely RH, Jones AK. The cortical representation of pain. *Pain*. 1999;79(2-3):105-11.
39. Vogt BA, Finch DM, Olson CR. Functional heterogeneity in cingulate cortex: the anterior executive and posterior evaluative regions. *Cerebral cortex*. 1992;2(6):435-43.
40. Nasir M, Trujillo D, Levine J, Dwyer JB, Rupp ZW, Bloch MH. Glutamate Systems in DSM-5 Anxiety Disorders: Their Role and a Review of Glutamate and GABA Psychopharmacology. *Frontiers in psychiatry*. 2020;11:548505.
41. Peters EJ, Slager SL, McGrath PJ, Knowles JA, Hamilton SP. Investigation of serotonin-related genes in antidepressant response. *Molecular psychiatry*. 2004;9(9):879-89.
42. Lichtenberg D, Pinchuk I. Oxidative stress, the term and the concept. *Biochemical and biophysical research communications*. 2015;461(3):441-4.
43. Tabak O, Gelisgen R, Erman H, Erdenen F, Muderrisoglu C, Aral H, et al. Oxidative lipid, protein, and DNA damage as oxidative stress markers in vascular complications of diabetes mellitus. *Clinical and investigative medicine Medecine clinique et experimentale*. 2011;34(3):E163-71.
44. Spiers JG, Chen HJ, Sernia C, Lavidis NA. Activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal stress axis induces cellular oxidative stress. *Frontiers in neuroscience*. 2014;8:456.
45. Du J, Wang Y, Hunter R, Wei Y, Blumenthal R, Falke C, et al. Dynamic regulation of mitochondrial function by glucocorticoids. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2009;106(9):3543-8.
46. Berry A, Greco A, Giorgio M, Pelicci PG, de Kloet R, Alleva E, et al. Deletion of the lifespan determinant p66(Shc) improves performance in a spatial memory task, decreases levels of oxidative stress markers in the hippocampus and increases levels of the neurotrophin BDNF in adult mice. *Experimental gerontology*. 2008;43(3):200-8.

47. Souza CG, Moreira JD, Siqueira IR, Pereira AG, Rieger DK, Souza DO, et al. Highly palatable diet consumption increases protein oxidation in rat frontal cortex and anxiety-like behavior. *Life sciences*. 2007;81(3):198-203.
48. Hata T, Itoh E, Nishikawa H. [Stress-induced anxiety and endogenous anxiogenic substances]. *Nihon yakurigaku zasshi Folia pharmacologica Japonica*. 2000;115(1):13-20.
49. ÇALIŞKAN H, AKAT F, ZALOĞLU N. Şartsız Hayvan Anksiyete Testleri. 2017.
50. Chen J, Wang ZZ, Zhang S, Chu SF, Mou Z, Chen NH. The effects of glucocorticoids on depressive and anxiety-like behaviors, mineralocorticoid receptor-dependent cell proliferation regulates anxiety-like behaviors. *Behavioural brain research*. 2019;362:288-98.
51. Azevedo H, Ferreira M, Mascarello A, Osten P, Werneck Guimaraes CR. The serotonergic and alpha-1 adrenergic receptor modulator ACH-000029 ameliorates anxiety-like behavior in a post-traumatic stress disorder model. *Neuropharmacology*. 2020;164:107912.
52. Hata T, Nishikawa H, Itoh E, Funakami Y. Anxiety-like behavior in elevated plus-maze tests in repeatedly cold-stressed mice. *Japanese journal of pharmacology*. 2001;85(2):189-96.
53. Nishikawa H, Hata T, Itoh E, Funakami Y. A role for corticotropin-releasing factor in repeated cold stress-induced anxiety-like behavior during forced swimming and elevated plus-maze tests in mice. *Biological & pharmaceutical bulletin*. 2004;27(3):352-6.
54. Pohl J, Olmstead MC, Wynne-Edwards KE, Harkness K, Menard JL. Repeated exposure to stress across the childhood-adolescent period alters rats' anxiety- and depression-like behaviors in adulthood: The importance of stressor type and gender. *Behavioral neuroscience*. 2007;121(3):462-74.
55. Kovalenko IL, Galyamina AG, Smagin DA, Michurina TV, Kudryavtseva NN, Enikolopov G. Extended effect of chronic social defeat stress in childhood on behaviors in adulthood. *PloS one*. 2014;9(3):e91762.
56. Kaufmann FN, Costa AP, Ghisleni G, Diaz AP, Rodrigues ALS, Peluffo H, et al. NLRP3 inflammasome-driven pathways in depression: Clinical and preclinical findings. *Brain, behavior, and immunity*. 2017;64:367-83.
57. Insel T, Cuthbert B, Garvey M, Heinssen R, Pine DS, Quinn K, et al. Research domain criteria (RDoC): toward a new classification framework for research on mental disorders. *The American journal of psychiatry*. 2010;167(7):748-51.
58. Krishnan V, Nestler EJ. The molecular neurobiology of depression. *Nature*. 2008;455(7215):894-902.

59. Kurumu TSBHS. Türkiye Kronik Hastalıklar Ve Risk Faktörleri Sıklığı Çalışması. Ünal B, Ergör G Anıl Matbaa Ltd Şti Ankara. 2013.
60. Egede LE, Bishu KG, Walker RJ, Dismuke CE. Impact of diagnosed depression on healthcare costs in adults with and without diabetes: United States, 2004-2011. *Journal of affective disorders*. 2016;195:119-26.
61. Cui R, Fiske A. Relation Between Depression Symptoms and Suicide Risk in Adults and Older Adults: A Brief Report. *Journal of applied gerontology : the official journal of the Southern Gerontological Society*. 2020;733464820970849.
62. van Praag HM. Can stress cause depression? *The world journal of biological psychiatry : the official journal of the World Federation of Societies of Biological Psychiatry*. 2005;6 Suppl 2:5-22.
63. Bremner JD, Narayan M, Anderson ER, Staib LH, Miller HL, Charney DS. Hippocampal volume reduction in major depression. *The American journal of psychiatry*. 2000;157(1):115-8.
64. Roddy DW, Farrell C, Doolin K, Roman E, Tozzi L, Frodl T, et al. The Hippocampus in Depression: More Than the Sum of Its Parts? Advanced Hippocampal Substructure Segmentation in Depression. *Biological psychiatry*. 2019;85(6):487-97.
65. Baune BT, Renger L. Pharmacological and non-pharmacological interventions to improve cognitive dysfunction and functional ability in clinical depression--a systematic review. *Psychiatry research*. 2014;219(1):25-50.
66. Nestler EJ, Barrot M, DiLeone RJ, Eisch AJ, Gold SJ, Monteggia LM. Neurobiology of depression. *Neuron*. 2002;34(1):13-25.
67. Canet G, Chevallier N, Zussy C, Desrumaux C, Givalois L. Central Role of Glucocorticoid Receptors in Alzheimer's Disease and Depression. *Frontiers in neuroscience*. 2018;12:739.
68. Farrell C, O'Keane V. Epigenetics and the glucocorticoid receptor: A review of the implications in depression. *Psychiatry research*. 2016;242:349-56.
69. Nasu T, Kubo A, Queme LF, Mizumura K. A single administration of Neurotrophin reduced the elongated immobility time in the forced swimming test of rats exposed to repeated cold stress. *Behavioural pharmacology*. 2019;30(7):547-54.
70. Thakker-Varia S, Alder J. Neuropeptides in depression: role of VGF. *Behavioural brain research*. 2009;197(2):262-78.

71. Smith MA, Makino S, Kvetnansky R, Post RM. Stress and glucocorticoids affect the expression of brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 mRNAs in the hippocampus. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 1995;15(3 Pt 1):1768-77.
72. Zorner B, Wolfer DP, Brandis D, Kretz O, Zacher C, Madani R, et al. Forebrain-specific trkB-receptor knockout mice: behaviorally more hyperactive than "depressive". *Biological psychiatry*. 2003;54(10):972-82.
73. First M, Gil-Ad I, Taler M, Tarasenko I, Novak N, Weizman A. The effects of fluoxetine treatment in a chronic mild stress rat model on depression-related behavior, brain neurotrophins and ERK expression. *Journal of molecular neuroscience : MN*. 2011;45(2):246-55.
74. Streit WJ. Microglial activation and neuroinflammation in Alzheimer's disease: a critical examination of recent history. *Frontiers in aging neuroscience*. 2010;2:22.
75. Svenungsson E, Andersson M, Brundin L, van Vollenhoven R, Khademi M, Tarkowski A, et al. Increased levels of proinflammatory cytokines and nitric oxide metabolites in neuropsychiatric lupus erythematosus. *Annals of the rheumatic diseases*. 2001;60(4):372-9.
76. Wang WY, Tan MS, Yu JT, Tan L. Role of pro-inflammatory cytokines released from microglia in Alzheimer's disease. *Annals of translational medicine*. 2015;3(10):136.
77. Brites D, Fernandes A. Neuroinflammation and Depression: Microglia Activation, Extracellular Microvesicles and microRNA Dysregulation. *Frontiers in cellular neuroscience*. 2015;9:476.
78. Groen RN, Ryan O, Wigman JTW, Riese H, Penninx B, Giltay EJ, et al. Comorbidity between depression and anxiety: assessing the role of bridge mental states in dynamic psychological networks. *BMC medicine*. 2020;18(1):308.
79. Kendler KS, Karkowski LM, Prescott CA. Causal relationship between stressful life events and the onset of major depression. *The American journal of psychiatry*. 1999;156(6):837-41.
80. Castagne V, Moser P, Porsolt RD. Behavioral Assessment of Antidepressant Activity in Rodents. In: nd, Buccafusco JJ, editors. *Methods of Behavior Analysis in Neuroscience*. Frontiers in Neuroscience. Boca Raton (FL)2009.
81. Krishnan V, Nestler EJ. Animal models of depression: molecular perspectives. *Current topics in behavioral neurosciences*. 2011;7:121-47.

82. Wiborg O. Chronic mild stress for modeling anhedonia. *Cell and tissue research*. 2013;354(1):155-69.
83. Stepanichev M, Dygalo NN, Grigoryan G, Shishkina GT, Gulyaeva N. Rodent models of depression: neurotrophic and neuroinflammatory biomarkers. *BioMed research international*. 2014;2014:932757.
84. Patel D, Kas MJ, Chattarji S, Buwalda B. Rodent models of social stress and neuronal plasticity: Relevance to depressive-like disorders. *Behavioural brain research*. 2019;369:111900.
85. Zhao Y, Fu Y. [Effects of chronic stress depression on the circadian rhythm of peripheral neuroendocrine hormone of rats]. *Zhongguo ying yong sheng li xue za zhi = Zhongguo yingyong shenglixue zazhi = Chinese journal of applied physiology*. 2017;33(5):398-402.
86. Girotti M, Donegan JJ, Morilak DA. Chronic intermittent cold stress sensitizes neuro-immune reactivity in the rat brain. *Psychoneuroendocrinology*. 2011;36(8):1164-74.
87. Kim W, Lee W, Choi JG, Ju IG, Kim YK, Lee TH, et al. Inhibitory effects of Aconiti Lateralis Radix Preparata on chronic intermittent cold-induced inflammation in the mouse hypothalamus. *Journal of ethnopharmacology*. 2018;215:27-33.
88. Girotti M, Donegan JJ, Morilak DA. Influence of hypothalamic IL-6/gp130 receptor signaling on the HPA axis response to chronic stress. *Psychoneuroendocrinology*. 2013;38(7):1158-69.
89. Asha Devi S, Manjula KR, Subramanyam MV. Protective role of vitamins E and C against oxidative stress caused by intermittent cold exposure in aging rat's frontoparietal cortex. *Neuroscience letters*. 2012;529(2):155-60.
90. Qu TT, Deng JX, Li RL, Cui ZJ, Wang XQ, Wang L, et al. Stress injuries and autophagy in mouse hippocampus after chronic cold exposure. *Neural regeneration research*. 2017;12(3):440-6.
91. Xu B, Lang LM, Li SZ, Guo JR, Wang JF, Wang D, et al. Cortisol Excess-Mediated Mitochondrial Damage Induced Hippocampal Neuronal Apoptosis in Mice Following Cold Exposure. *Cells*. 2019;8(6).
92. Hata T, Nishikawa H, Itoh E, Watanabe A. Depressive state with anxiety in repeated cold-stressed mice in forced swimming tests. *Japanese journal of pharmacology*. 1999;79(2):243-9.

93. Isgor C, Kabbaj M, Akil H, Watson SJ. Delayed effects of chronic variable stress during peripubertal-juvenile period on hippocampal morphology and on cognitive and stress axis functions in rats. *Hippocampus*. 2004;14(5):636-48.
94. Ige AO, Iwaloye OI, Adewoye EO. Metformin Effects are Augmented by Chronic Intermittent Cold Stress in High Fat Diet Fed Male Wistar Rats. *Nigerian journal of physiological sciences : official publication of the Physiological Society of Nigeria*. 2017;32(1):47-54.
95. Tzanoulinou S, Riccio O, de Boer MW, Sandi C. Peripubertal stress-induced behavioral changes are associated with altered expression of genes involved in excitation and inhibition in the amygdala. *Translational psychiatry*. 2014;4:e410.
96. Edwards E, King JA, Fray JC. Increased basal activity of the HPA axis and renin-angiotensin system in congenital learned helpless rats exposed to stress early in development. *International journal of developmental neuroscience : the official journal of the International Society for Developmental Neuroscience*. 1999;17(8):805-12.
97. Pellow S, Chopin P, File SE, Briley M. Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *Journal of neuroscience methods*. 1985;14(3):149-67.
98. Zohar J, Matar MA, Ifergane G, Kaplan Z, Cohen H. Brief post-stressor treatment with pregabalin in an animal model for PTSD: short-term anxiolytic effects without long-term anxiogenic effect. *European neuropsychopharmacology : the journal of the European College of Neuropsychopharmacology*. 2008;18(9):653-66.
99. Liu MY, Yin CY, Zhu LJ, Zhu XH, Xu C, Luo CX, et al. Sucrose preference test for measurement of stress-induced anhedonia in mice. *Nature protocols*. 2018;13(7):1686-98.
100. Huang YL, Zeng NX, Chen J, Niu J, Luo WL, Liu P, et al. Dynamic changes of behaviors, dentate gyrus neurogenesis and hippocampal miR-124 expression in rats with depression induced by chronic unpredictable mild stress. *Neural regeneration research*. 2020;15(6):1150-9.
101. Lam VYY, Raineke C, Takeuchi LE, Ellis L, Woodward TS, Weinberg J. Chronic Stress Alters Behavior in the Forced Swim Test and Underlying Neural Activity in Animals Exposed to Alcohol Prenatally: Sex- and Time-Dependent Effects. *Frontiers in behavioral neuroscience*. 2018;12:42.
102. Detke MJ, Rickels M, Lucki I. Active behaviors in the rat forced swimming test differentially produced by serotonergic and noradrenergic antidepressants. *Psychopharmacology*. 1995;121(1):66-72.

103. Detke MJ, Lucki I. Detection of serotonergic and noradrenergic antidepressants in the rat forced swimming test: the effects of water depth. *Behavioural brain research*. 1996;73(1-2):43-6.
104. Erel O. A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. *Clinical biochemistry*. 2004;37(4):277-85.
105. Erel O. A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. *Clinical biochemistry*. 2005;38(12):1103-11.
106. Yumru M, Savas HA, Kalenderoglu A, Bulut M, Celik H, Erel O. Oxidative imbalance in bipolar disorder subtypes: a comparative study. *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry*. 2009;33(6):1070-4.
107. Bunker VW. Free radicals, antioxidants and ageing. *Medical laboratory sciences*. 1992;49(4):299-312.
108. Tukozkan N, Erdamar H, Seven I. Measurement of total malondialdehyde in plasma and tissues by high-performance liquid chromatography and thiobarbituric acid assay. *Firat Tip Dergisi*. 2006;11(2):88-92.
109. Boyer P. Do anxiety and depression have a common pathophysiological mechanism? *Acta psychiatrica Scandinavica Supplementum*. 2000(406):24-9.
110. Shonkoff JP, Boyce WT, McEwen BS. Neuroscience, molecular biology, and the childhood roots of health disparities: building a new framework for health promotion and disease prevention. *Jama*. 2009;301(21):2252-9.
111. Fries E, Hesse J, Hellhammer J, Hellhammer DH. A new view on hypocortisolism. *Psychoneuroendocrinology*. 2005;30(10):1010-6.
112. Weber K, Rockstroh B, Borgelt J, Awiszus B, Popov T, Hoffmann K, et al. Stress load during childhood affects psychopathology in psychiatric patients. *BMC psychiatry*. 2008;8:63.
113. Sturman O, Germain PL, Bohacek J. Exploratory rearing: a context- and stress-sensitive behavior recorded in the open-field test. *Stress*. 2018;21(5):443-52.
114. Lever C, Burton S, O'Keefe J. Rearing on hind legs, environmental novelty, and the hippocampal formation. *Reviews in the neurosciences*. 2006;17(1-2):111-33.

115. Crusio WE, Schwegler H, van Abeelen JH. Behavioral responses to novelty and structural variation of the hippocampus in mice. II. Multivariate genetic analysis. *Behavioural brain research*. 1989;32(1):81-8.
116. Han MF, Gao D, Sun XL. [A comparative study on behaviors of two depression models in rats induced by chronic forced swimming stress]. *Sichuan da xue xue bao Yi xue ban* = *Journal of Sichuan University Medical science edition*. 2010;41(1):137-9, 52.
117. Coelho JE, Alves P, Canas PM, Valadas JS, Shmidt T, Batalha VL, et al. Overexpression of Adenosine A2A Receptors in Rats: Effects on Depression, Locomotion, and Anxiety. *Frontiers in psychiatry*. 2014;5:67.
118. Şahin Z, Özkürkçüler A, Koç A, Solak H, Koca RÖ, Çakan P, et al. An evaluation of the effects of two chronic immobilization stress protocols on depression/anxiety-related behavior in male rats. *Acıbadem Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*. 2019;10(3).
119. Pare WP, Blair GR, Kluczynski J, Tejani-Butt S. Gender differences in acute and chronic stress in Wistar Kyoto (WKY) rats. *Integrative physiological and behavioral science : the official journal of the Pavlovian Society*. 1999;34(4):227-41.
120. Cohen H, Geva AB, Matar MA, Zohar J, Kaplan Z. Post-traumatic stress behavioural responses in inbred mouse strains: can genetic predisposition explain phenotypic vulnerability? *The international journal of neuropsychopharmacology*. 2008;11(3):331-49.
121. Calvo-Torrent A, Brain PF, Martinez M. Effect of predatory stress on sucrose intake and behavior on the plus-maze in male mice. *Physiology & behavior*. 1999;67(2):189-96.
122. Arrant AE, Schramm-Sapyta NL, Kuhn CM. Use of the light/dark test for anxiety in adult and adolescent male rats. *Behavioural brain research*. 2013;256:119-27.
123. Yu C, Mei XT, Zheng YP, Xu DH. Taurine zinc solid dispersions protect against cold-restraint stress-induced gastric ulceration by upregulating HSP70 and exerting an anxiolytic effect. *European journal of pharmacology*. 2015;762:63-71.
124. Solomonow J. Anxiety behavior induced in mice by acute stress. *Tulane Undergraduate Research Journal*. 2015;2.
125. Abelaira HM, Réus GZ, Quevedo J. Animal models as tools to study the pathophysiology of depression. *Brazilian Journal of Psychiatry*. 2013;35:S112-S20.
126. Gao L, Huang P, Dong Z, Gao T, Huang S, Zhou C, et al. Modified Xiaoyaosan (MXYS) Exerts Anti-depressive Effects by Rectifying the Brain Blood Oxygen Level-Dependent fMRI Signals and Improving Hippocampal Neurogenesis in Mice. *Frontiers in pharmacology*. 2018;9:1098.

127. Li HY, Zhao YH, Zeng MJ, Fang F, Li M, Qin TT, et al. Saikosaponin D relieves unpredictable chronic mild stress induced depressive-like behavior in rats: involvement of HPA axis and hippocampal neurogenesis. *Psychopharmacology*. 2017;234(22):3385-94.
128. Sufka KJ, Warnick JE, Pulaski CN, Slauson SR, Kim YB, Rimoldi JM. Antidepressant efficacy screening of novel targets in the chick anxiety-depression model. *Behavioural pharmacology*. 2009;20(2):146-54.
129. Gong S, Miao YL, Jiao GZ, Sun MJ, Li H, Lin J, et al. Dynamics and correlation of serum cortisol and corticosterone under different physiological or stressful conditions in mice. *PloS one*. 2015;10(2):e0117503.
130. Bogdanova OV, Kanekar S, D'Anci KE, Renshaw PF. Factors influencing behavior in the forced swim test. *Physiology & behavior*. 2013;118:227-39.
131. Becker C, Zeau B, Rivat C, Blugeot A, Hamon M, Benoliel JJ. Repeated social defeat-induced depression-like behavioral and biological alterations in rats: involvement of cholecystokinin. *Molecular psychiatry*. 2008;13(12):1079-92.
132. Iio W, Matsukawa N, Tsukahara T, Kohari D, Toyoda A. Effects of chronic social defeat stress on MAP kinase cascade. *Neuroscience letters*. 2011;504(3):281-4.
133. Calvo N, Cecchi M, Kabbaj M, Watson SJ, Akil H. Differential effects of social defeat in rats with high and low locomotor response to novelty. *Neuroscience*. 2011;183:81-9.
134. Slattery DA, Uschold N, Magoni M, Bar J, Popoli M, Neumann ID, et al. Behavioural consequences of two chronic psychosocial stress paradigms: anxiety without depression. *Psychoneuroendocrinology*. 2012;37(5):702-14.
135. Bourke CH, Neigh GN. Behavioral effects of chronic adolescent stress are sustained and sexually dimorphic. *Hormones and behavior*. 2011;60(1):112-20.
136. Haidkind R, Eller M, Harro M, Kask A, Rinken A, Oreland L, et al. Effects of partial locus coeruleus denervation and chronic mild stress on behaviour and monoamine neurochemistry in the rat. *European neuropsychopharmacology : the journal of the European College of Neuropsychopharmacology*. 2003;13(1):19-28.
137. Lee B, Yun HY, Shim I, Lee H, Hahm DH. Bupleurum falcatum prevents depression and anxiety-like behaviors in rats exposed to repeated restraint stress. *Journal of microbiology and biotechnology*. 2012;22(3):422-30.
138. Veena J, Srikumar BN, Raju TR, Shankaranarayana Rao BS. Exposure to enriched environment restores the survival and differentiation of new born cells in the hippocampus

and ameliorates depressive symptoms in chronically stressed rats. *Neuroscience letters*. 2009;455(3):178-82.

139. Suvrathan A, Tomar A, Chattarji S. Effects of chronic and acute stress on rat behaviour in the forced-swim test. *Stress*. 2010;13(6):533-40.

140. Bernal-Morales B, Contreras CM, Cueto-Escobedo J. Acute restraint stress produces behavioral despair in weanling rats in the forced swim test. *Behavioural processes*. 2009;82(2):219-22.

141. Chaturvedi HK, Bapna JS, Chandra D. Effect of fluvoxamine and N-methyl-D-aspartate receptor antagonists on shock-induced depression in mice. *Indian journal of physiology and pharmacology*. 2001;45(2):199-207.

142. Estanislau C, Ramos AC, Ferraresi PD, Costa NF, de Carvalho HM, Batistela S. Individual differences in the elevated plus-maze and the forced swim test. *Behavioural processes*. 2011;86(1):46-51.

143. Lino-de-Oliveira C, De Lima TC, de Padua Carobrez A. Structure of the rat behaviour in the forced swimming test. *Behavioural brain research*. 2005;158(2):243-50.

144. Cryan JF, Valentino RJ, Lucki I. Assessing substrates underlying the behavioral effects of antidepressants using the modified rat forced swimming test. *Neuroscience and biobehavioral reviews*. 2005;29(4-5):547-69.

145. Castagne V, Porsolt RD, Moser P. Use of latency to immobility improves detection of antidepressant-like activity in the behavioral despair test in the mouse. *European journal of pharmacology*. 2009;616(1-3):128-33.

146. Tamburella A, Leggio GM, Micale V, Navarria A, Bucolo C, Cicirata V, et al. Behavioural and neurochemical changes induced by stress-related conditions are counteracted by the neurokinin-2 receptor antagonist saredutant. *The international journal of neuropsychopharmacology*. 2013;16(4):813-23.

147. McCormick CM, Smith C, Mathews IZ. Effects of chronic social stress in adolescence on anxiety and neuroendocrine response to mild stress in male and female rats. *Behavioural brain research*. 2008;187(2):228-38.

148. Toledo-Rodriguez M, Sandi C. Stress during Adolescence Increases Novelty Seeking and Risk-Taking Behavior in Male and Female Rats. *Frontiers in behavioral neuroscience*. 2011;5:17.

149. Salvagno GL, Sanchis-Gomar F, Picanza A, Lippi G. Red blood cell distribution width: A simple parameter with multiple clinical applications. *Critical reviews in clinical laboratory sciences*. 2015;52(2):86-105.
150. Lippi G, Turcato G, Cervellin G, Sanchis-Gomar F. Red blood cell distribution width in heart failure: A narrative review. *World journal of cardiology*. 2018;10(2):6-14.
151. Danner M, Kasl SV, Abramson JL, Vaccarino V. Association between depression and elevated C-reactive protein. *Psychosomatic medicine*. 2003;65(3):347-56.
152. Gimeno D, Kivimaki M, Brunner EJ, Elovainio M, De Vogli R, Steptoe A, et al. Associations of C-reactive protein and interleukin-6 with cognitive symptoms of depression: 12-year follow-up of the Whitehall II study. *Psychological medicine*. 2009;39(3):413-23.
153. Berk M, Williams LJ, Jacka FN, O'Neil A, Pasco JA, Moylan S, et al. So depression is an inflammatory disease, but where does the inflammation come from? *BMC medicine*. 2013;11:200.
154. Bankier B, Barajas J, Martinez-Rumayor A, Januzzi JL. Association between C-reactive protein and generalized anxiety disorder in stable coronary heart disease patients. *European heart journal*. 2008;29(18):2212-7.
155. Duivis HE, Vogelzangs N, Kupper N, de Jonge P, Penninx BW. Differential association of somatic and cognitive symptoms of depression and anxiety with inflammation: findings from the Netherlands Study of Depression and Anxiety (NESDA). *Psychoneuroendocrinology*. 2013;38(9):1573-85.
156. Lappe JM, Horne BD, Shah SH, May HT, Muhlestein JB, Lappe DL, et al. Red cell distribution width, C-reactive protein, the complete blood count, and mortality in patients with coronary disease and a normal comparison population. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*. 2011;412(23-24):2094-9.
157. Kalay N, Aytekin M, Kaya MG, Ozbek K, Karayakali M, Sogut E, et al. The relationship between inflammation and slow coronary flow: increased red cell distribution width and serum uric acid levels. *Archives of the Turkish Society of Cardiology*. 2011;39(6):463-8.
158. Demircan F, Gozel N, Kilinc F, Ulu R, Atmaca M. The Impact of Red Blood Cell Distribution Width and Neutrophil/Lymphocyte Ratio on the Diagnosis of Major Depressive Disorder. *Neurology and therapy*. 2016;5(1):27-33.
159. Peng Y-F, Zhong S-M, Luo B, Qin Y-H, Wei Y-S. Evaluation of red blood cell distribution width and neutrophil to lymphocyte ratio in patients with major depressive disorder. *Int J Clin Exp Med*. 2016;9(2):3242-6.

160. Martins EC, Silveira LDF, Viegas K, Beck AD, Fioravanti Junior G, Cremonese RV, et al. Neutrophil-lymphocyte ratio in the early diagnosis of sepsis in an intensive care unit: a case-control study. *Revista Brasileira de terapia intensiva*. 2019;31(1):64-70.
161. Hickman DL. Evaluation of the neutrophil:lymphocyte ratio as an indicator of chronic distress in the laboratory mouse. *Lab animal*. 2017;46(7):303-7.
162. Swan MP, Hickman DL. Evaluation of the neutrophil-lymphocyte ratio as a measure of distress in rats. *Lab animal*. 2014;43(8):276-82.
163. Jacob Filho W, Lima CC, Paunksnis MRR, Silva AA, Perilhao MS, Caldeira M, et al. Reference database of hematological parameters for growing and aging rats. *The aging male : the official journal of the International Society for the Study of the Aging Male*. 2018;21(2):145-8.
164. Nemzek JA, Bolgos GL, Williams BA, Remick DG. Differences in normal values for murine white blood cell counts and other hematological parameters based on sampling site. *Inflammation research : official journal of the European Histamine Research Society [et al]*. 2001;50(10):523-7.
165. Northern AL, Rutter SM, Peterson CM. Cyclic changes in the concentrations of peripheral blood immune cells during the normal menstrual cycle. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine Society for Experimental Biology and Medicine*. 1994;207(1):81-8.
166. Baydyuk M, Xu B. BDNF signaling and survival of striatal neurons. *Frontiers in cellular neuroscience*. 2014;8:254.
167. Eckert A, Karen S, Beck J, Brand S, Hemmeter U, Hatzinger M, et al. The link between sleep, stress and BDNF. *European Psychiatry*. 2017;41(S1):S282-S.
168. Mancini GF, Marchetta E, Pignani I, Trezza V, Campolongo P. Social Defeat Stress During Early Adolescence Confers Resilience Against a Single Episode of Prolonged Stress in Adult Rats. *Cells*. 2021;10(2).
169. Zhang X, Li H, Sun H, Jiang Y, Wang A, Kong Y, et al. Effects of BDNF Signaling on Anxiety-Related Behavior and Spatial Memory of Adolescent Rats in Different Length of Maternal Separation. *Frontiers in psychiatry*. 2020;11:709.
170. Murinova J, Hlavacova N, Chmelova M, Riecan sky I. The Evidence for Altered BDNF Expression in the Brain of Rats Reared or Housed in Social Isolation: A Systematic Review. *Frontiers in behavioral neuroscience*. 2017;11:101.

171. Evans J, Sun Y, McGregor A, Connor B. Allopregnanolone regulates neurogenesis and depressive/anxiety-like behaviour in a social isolation rodent model of chronic stress. *Neuropharmacology*. 2012;63(8):1315-26.
172. Mpofana T, Daniels WM, Mabandla MV. Exposure to Early Life Stress Results in Epigenetic Changes in Neurotrophic Factor Gene Expression in a Parkinsonian Rat Model. *Parkinson's disease*. 2016;2016:6438783.
173. Sun Y, Evans J, Russell B, Kydd R, Connor B. A benzodiazepine impairs the neurogenic and behavioural effects of fluoxetine in a rodent model of chronic stress. *Neuropharmacology*. 2013;72:20-8.
174. Der-Avakian A, Markou A. The neurobiology of anhedonia and other reward-related deficits. *Trends in neurosciences*. 2012;35(1):68-77.
175. Gabbay V, Ely BA, Li Q, Bangaru SD, Panzer AM, Alonso CM, et al. Striatum-based circuitry of adolescent depression and anhedonia. *Journal of the American Academy of Child and Adolescent Psychiatry*. 2013;52(6):628-41 e13.
176. Uys M, Shahid M, Sallinen J, Dreyer W, Cockeran M, Harvey BH. The alpha2C-adrenoceptor antagonist, ORM-10921, has antipsychotic-like effects in social isolation reared rats and bolsters the response to haloperidol. *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry*. 2016;71:108-16.
177. Scaccianoce S, Del Bianco P, Paolone G, Caprioli D, Modafferi AM, Nencini P, et al. Social isolation selectively reduces hippocampal brain-derived neurotrophic factor without altering plasma corticosterone. *Behavioural brain research*. 2006;168(2):323-5.
178. Altar CA, Cai N, Bliven T, Juhasz M, Conner JM, Acheson AL, et al. Anterograde transport of brain-derived neurotrophic factor and its role in the brain. *Nature*. 1997;389(6653):856-60.
179. Roceri M, Cirulli F, Pessina C, Peretto P, Racagni G, Riva MA. Postnatal repeated maternal deprivation produces age-dependent changes of brain-derived neurotrophic factor expression in selected rat brain regions. *Biological psychiatry*. 2004;55(7):708-14.
180. Zuccato C, Ciammola A, Rigamonti D, Leavitt BR, Goffredo D, Conti L, et al. Loss of huntingtin-mediated BDNF gene transcription in Huntington's disease. *Science*. 2001;293(5529):493-8.
181. Jameel MK, Joshi AR, Dawane J, Padwal M, Joshi A, Pandit VA, et al. Effect of various physical stress models on serum cortisol level in wistar rats. *Journal of clinical and diagnostic research : JCDR*. 2014;8(3):181-3.

182. de Souza-Talarico JN, Marin MF, Sindi S, Lupien SJ. Effects of stress hormones on the brain and cognition: Evidence from normal to pathological aging. *Dementia & neuropsychologia*. 2011;5(1):8-16.
183. Arnsten AF. Stress signalling pathways that impair prefrontal cortex structure and function. *Nature reviews Neuroscience*. 2009;10(6):410-22.
184. Dominguez G, Henkous N, Prevot T, David V, Guillou JL, Belzung C, et al. Sustained corticosterone rise in the prefrontal cortex is a key factor for chronic stress-induced working memory deficits in mice. *Neurobiology of stress*. 2019;10:100161.
185. Davies E, MacKenzie SM. Extra-adrenal production of corticosteroids. *Clinical and experimental pharmacology & physiology*. 2003;30(7):437-45.
186. Jankord R, Solomon MB, Albertz J, Flak JN, Zhang R, Herman JP. Stress vulnerability during adolescent development in rats. *Endocrinology*. 2011;152(2):629-38.
187. Bhat MS, Rao G, Murthy KD, Bhat PG. Housing in pyramid counteracts neuroendocrine and oxidative stress caused by chronic restraint in rats. *Evidence-based complementary and alternative medicine : eCAM*. 2007;4(1):35-42.
188. Yin YY, Ming L, Zheng LF, Kan HW, Li CR, Li WP. Bioactive compounds from *Paecilomyces tenuipes* regulating the function of the hypothalamo-hypophyseal system axis in chronic unpredictable stress rats. *Chinese medical journal*. 2007;120(12):1088-92.
189. Lightman SL, Harbuz MS. Expression of corticotropin-releasing factor mRNA in response to stress. *Ciba Foundation symposium*. 1993;172:173-87; discussion 87-98.
190. Romeo RD, McEwen BS. Stress and the adolescent brain. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2006;1094:202-14.
191. Schiepers OJ, Wichers MC, Maes M. Cytokines and major depression. *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry*. 2005;29(2):201-17.
192. Hayley S, Poulter MO, Merali Z, Anisman H. The pathogenesis of clinical depression: stressor- and cytokine-induced alterations of neuroplasticity. *Neuroscience*. 2005;135(3):659-78.
193. Wohleb ES, Patterson JM, Sharma V, Quan N, Godbout JP, Sheridan JF. Knockdown of interleukin-1 receptor type-1 on endothelial cells attenuated stress-induced neuroinflammation and prevented anxiety-like behavior. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2014;34(7):2583-91.

194. Tsai SJ. Effects of interleukin-1 β polymorphisms on brain function and behavior in healthy and psychiatric disease conditions. *Cytokine & growth factor reviews*. 2017;37:89-97.
195. Kovacs D, Eszlari N, Petschner P, Pap D, Vas S, Kovacs P, et al. Effects of IL1 β single nucleotide polymorphisms on depressive and anxiety symptoms are determined by severity and type of life stress. *Brain, behavior, and immunity*. 2016;56:96-104.
196. Johnson JD, Barnard DF, Kulp AC, Mehta DM. Neuroendocrine Regulation of Brain Cytokines After Psychological Stress. *Journal of the Endocrine Society*. 2019;3(7):1302-20.
197. Zhao X, Cao F, Liu Q, Li X, Xu G, Liu G, et al. Behavioral, inflammatory and neurochemical disturbances in LPS and UCMS-induced mouse models of depression. *Behavioural brain research*. 2019;364:494-502.
198. Goshen I, Kreisel T, Ben-Menachem-Zidon O, Licht T, Weidenfeld J, Ben-Hur T, et al. Brain interleukin-1 mediates chronic stress-induced depression in mice via adrenocortical activation and hippocampal neurogenesis suppression. *Molecular psychiatry*. 2008;13(7):717-28.
199. Willner P. The chronic mild stress (CMS) model of depression: History, evaluation and usage. *Neurobiology of stress*. 2017;6:78-93.
200. McKim DB, Weber MD, Niraula A, Sawicki CM, Liu X, Jarrett BL, et al. Microglial recruitment of IL-1 β -producing monocytes to brain endothelium causes stress-induced anxiety. *Molecular psychiatry*. 2018;23(6):1421-31.
201. Baffi JS, Palkovits M. Fine topography of brain areas activated by cold stress. A fos immunohistochemical study in rats. *Neuroendocrinology*. 2000;72(2):102-13.
202. Floyd RA. Antioxidants, oxidative stress, and degenerative neurological disorders. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine Society for Experimental Biology and Medicine*. 1999;222(3):236-45.
203. Berlett BS, Stadtman ER. Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *The Journal of biological chemistry*. 1997;272(33):20313-6.
204. Tamarit J, de Hoogh A, Obis E, Alsina D, Cabisco E, Ros J. Analysis of oxidative stress-induced protein carbonylation using fluorescent hydrazides. *Journal of proteomics*. 2012;75(12):3778-88.
205. Zlatkovic J, Todorovic N, Boskovic M, Pajovic SB, Demajo M, Filipovic D. Different susceptibility of prefrontal cortex and hippocampus to oxidative stress following chronic social isolation stress. *Molecular and cellular biochemistry*. 2014;393(1-2):43-57.

206. Lucca G, Comim CM, Valvassori SS, Reus GZ, Vuolo F, Petronilho F, et al. Effects of chronic mild stress on the oxidative parameters in the rat brain. *Neurochemistry international*. 2009;54(5-6):358-62.
207. Madrigal JL, Olivenza R, Moro MA, Lizasoain I, Lorenzo P, Rodrigo J, et al. Glutathione depletion, lipid peroxidation and mitochondrial dysfunction are induced by chronic stress in rat brain. *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology*. 2001;24(4):420-9.
208. Wu R, Feng J, Yang Y, Dai C, Lu A, Li J, et al. Significance of Serum Total Oxidant/Antioxidant Status in Patients with Colorectal Cancer. *PloS one*. 2017;12(1):e0170003.
209. Bernhardt LK, Madhyastha S, Bairy L, Kishore A. Status of the brain antioxidant system at different growing periods after prenatal stress and N -acetyl cysteine administration. *Folia neuropathologica*. 2017;55(1):38-48.
210. Cumurcu BE, Ozyurt H, Etikan I, Demir S, Karlidag R. Total antioxidant capacity and total oxidant status in patients with major depression: impact of antidepressant treatment. *Psychiatry and clinical neurosciences*. 2009;63(5):639-45.