

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI

ELLAGİK ASİT'İN FARE DEPRESYON MODELLERİNDE
BEYİN KAYNAKLI NÖROTROFİK FAKTÖR
DÜZEYLERİNE ETKİLERİ

Hatice Aslı BEDEL

YÜKSEK LİSANS TEZİ

2016-ANTALYA

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI

ELLAGİK ASİT'İN FARE DEPRESYON MODELLERİNDE BEYİN
KAYNAKLI NÖROTROFİK FAKTÖR DÜZEYLERİNE ETKİLERİ

Hatice Aslı BEDEL

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Coşkun USTA

Bu tez Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından 71 proje numarası ile desteklenmiştir.

“Kaynakça gösterilerek tezinden yararlanılabilir”

2016-ANTALYA

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne;

Bu çalışma jürimiz tarafından Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı Tıbbi Farmakoloji Programında yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir. 01/07/2016

İmza

Tez Danışmanı : Prof.Dr. Coşkun USTA
Akdeniz Üniversitesi



Üye : Prof.Dr. Sadi S. ÖZDEM
Akdeniz Üniversitesi



Üye : Yrd.Doç.Dr. Şükriye YEŞİLOT
Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi



Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulunun/...../..... tarih ve/..... sayılı kararıyla kabul edilmiştir.

Enstitü Müdürü

Prof.Dr.Narin DERİN

ETİK BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı beyan ederim.

Hatice Aslı BEDEL

İmza

Tez Danışmanı

Prof.Dr. Coşkun USTA

İmza

TEŞEKKÜR

Lisansüstü eğitimim boyunca kendisine her başvurduğumda kıymetli vaktini ve fikirlerini benimle paylaşan, tez çalışmamın planlanması, projelendirilmesi ve sonuçlarının değerlendirilmesiyle sabır ve titizlikle ilgilenen, sadece bilim alanında değil hayatın ta kendisinde de görüş açımı genişleten, sayfalarca yazsam da teşekkürümün yine az kalacağı değerli hocam Prof. Dr. Coşkun USTA'ya, yüksek lisans çalışmalarım süresince kapısını rahatlıkla çalabildiğim ve düşüncelerimi rahatlıkla söyleyebildiğim için çok teşekkür ederim.

Yüksek lisans eğitimim süresince bilgilerinden, deneyimlerinden ve akademik bakış açılarından yararlanma olanağı bulduğum ve deneysel çalışmalarımda desteğini eksik etmeyen anabilim dalımızın öğretim üyelerine en içten saygı, sevgi ve teşekkürlerimi sunuyorum.

Davranış deneylerinde hep yanımda olarak beni destekleyen Arş.Gör. Ceren KENCEBAY MANAS'a ve Sayın Prof.Dr. Narin DERİN'e teşekkür ederim.

Anabilim dalımızın tüm araştırma görevlilerine ve A.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü personeline desteklerinden ötürü teşekkür ederim.

Evliliğimiz süresince olduğu gibi tez çalışmalarım sırasında da sabırla, inançla ve özveriyle hayatımı kolaylaştıran sevgili eşim Uzm.Dr. Cihan BEDEL'e ve onun olup 25 Haziran 2012'den itibaren benim de olan ailesine,

Tez dönemim de dâhil hayatımın her anında yanımda olan annem Ummahan DADAK, babam Mehmet DADAK ve kardeşim Bengisu DADAK'a,

Her zaman beni destekleyen teyzem Öğr. Fatma DİLEK, tezimin dil bilgisi yönünden incelemesini yapan Alb. Aziz DİLEK ve ailesine çok teşekkür ediyorum.

ÖYP. Arş.Gör. Ecz. Hatice Aslı BEDEL

ÖZET

Amaç: Bu çalışmanın amacı farelerde ellagik asitin (EA) antidepresan-benzeri aktivitesini araştırmaktır. EA'nın bu etkisinde altta yatan mekanizmayı ortaya çıkarmak için beyin kaynaklı nörotrofik faktörün (BKNF) olası rolü araştırılmak istenmiştir.

Yöntem: Çalışmada 25-30 gr ağırlığında, erkek balb/c fareler kullanıldı. Hayvanlar 5 gruba ayrıldı; taşıyıcı (0,1 ml/gün), sertralin (5mg/kg), EA (1, 2,5, 5 mg/kg) ve 14 gün boyunca ilaçlar intraperitonel olarak enjekte edildi. Lokomotor aktiviteleri açık alan testi ile ölçüldü. Kuyruk asma testi ve zorlu yüzme testi depresyon modeli olarak kullanıldı. Davranış testlerinden sonra fareler servikal dislokasyonla sakrifiye edilip western blot analizleri yapıldı.

Bulgular: EA'nın üç dozu ve sertralin kontrol grubu ile karşılaştırıldığında hayvanların spontan lokomotor aktivitelerinde anlamlı değişikliğe yol açmamıştır. Kuyruk asma testinde EA'nın üç dozu kontrol grubuyla karşılaştırıldığında hareketsiz kalma süresinde istatistiksel olarak anlamlı azalmalar görüldü. Zorlu yüzme testinde EA 1 ve 5 mg/kg dozlarında kontrol grubuyla karşılaştırıldığında hareketsiz kalma süresinde anlamlı bir değişikliğe neden olmadığı ancak 2,5 mg/kg dozda belirgin bir azalmaya neden olduğu görüldü. Ayrıca EA tedavisinin farelerin hipokampal BKNF düzeylerinde artışa neden olduğu saptandı.

Sonuç: Bu çalışmada EA'nın lokomotor aktiviteyi değiştirmeden farelerde antidepresan-benzeri etkiler oluşturduğu görülmüştür. Bununla birlikte EA'nın antidepresan-benzeri etkisinde BKNF'deki artışın rol oynayabileceği düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Ellagik asit, BKNF, depresyon

ABSTRACT

Objective: The aim of present study was to evaluate the antidepressant-like activity of ellagic acid (EA) in mice. For understanding underlying mechanisms, the possible role of brain derived neurotrophic factor (BDNF) in EA's antidepressant-like effect was also investigated.

Method: Male balb/c mice weighing 25-30 gr were used for the study. Animals were divided into 5 groups (n:10): vehicle (0,1ml/day), sertraline (5 mg/kg), EA (1-2,5-5 mg/kg) and drugs were daily injected by intraperitoneal route during 14 days. Locomotor activity was measured by open field test. Tail Suspension Test (TST) and Forced Swim Test (FST) were conducted to mice as depression models. After behavioural tests each mice was sacrificed by cervical dislocation to obtain samples for western blot analysis.

Results: All three doses of EA and sertraline did not significantly affect the spontaneous locomotor activity of mice compared to vehicle group. EA in three different doses produced statistically significant decrease in immobility time as compared to vehicle group in TST. EA at 1 and 5 mg/kg doses did not produce any significant effect in immobility time as compared to vehicle group in FST. But EA produced significantly reduced immobility time at 2,5 mg/kg dose. EA treatment increased hippocampal BDNF levels in mice compared to vehicle group.

Conclusion: The present study demonstrates that EA is able to produce antidepressant-like effect in mice which is not due to an increase in the locomotor activity. Moreover the antidepressant-like effects of EA seems to be mediated by increased BDNF levels in mice hippocampus.

Key Words: Ellagic acid, BDNF, depression

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
İÇİNDEKİLER	iii
SİMGELER ve KISALTMALAR	v
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
TABLolar DİZİNİ	viii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1.Depresyon	2
2.2.Beyin Kaynaklı Nörotrofik Faktör	5
2.3.Depresyon ve BKNF	8
2.4.Ellagik Asit	11
2.5.Ellagik Asitin Biyoyararlanımı ve Metabolizasyonu	13
2.6.Deneysel Depresyon Modellerinde Kullanılan Kriterler	16
2.7.MDB'nin Patofizyolojisini Anlamak İçin Kullanılan Hayvan Modelleri	17
3. GEREÇ ve YÖNTEM	19
3.1.Deney Hayvanları	19
3.2.Davranış Deneyleri	20
3.2.1.Açık Alan Testi (Lokomotor Aktivite)	20
3.2.2.Kuyruk Asma Testi	20
3.2.3.Zorlu Yüzme Testi	20
3.3.Hipokampusun Çıkarılması	22
3.4.Bradford Yöntemi ile Protein Miktar Tayini	24
3.5.Hipokampal BKNF Ekspresyonunun Western Blot Yöntemi ile Belirlenmesi	25
3.5.1.Western Blot	26
3.6.Kullanılan Kimyasallar	31

3.7.Kullanılan Cihazlar	33
3.8.İstatistiksel Analiz	36
4. BULGULAR	37
4.1.Açık Alan Testi (Lokomotor Aktivite) Sonuçları	37
4.2.Kuyruk Asma Testi Sonuçları	38
4.3.Zorlu Yüzme Testi Sonuçları	38
4.4.Western Blot Sonuçları	39
5. TARTIŞMA	41
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	44
KAYNAKLAR	45
ÖZGEÇMİŞ	66

SİMGELER ve KISALTMALAR

ABD	: Amerika Birleşik Devletleri
APS	: Amonyum Persülfat
BKNF	: Beyin Kaynaklı Nörotrofik Faktör
BSA	: Sığır Serum Albumini (Bovine Serum Albumin)
COMT	: Katekol-O-metil Transferaz
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
DSM	: Mental Bozuklukların Tanısal ve Sayımsal El Kitabı (The Diagnostic and statistical Manual of Mental Disorders)
EA	: Ellagik Asit
ECL	: Güçlendirilmiş Kemilüminsans (Enhanced Chemiluminescence)
EEG	: Elektroensefalografi
EKT	: Elektrokonvülsif Tedavi
ET	: Ellagitanin
FDA	: Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (Food and Drug Administration)
GABA	: γ - Amino Bütirik Asit
GAPDH	: Gliseraldehid 3-Fosfat Dehidrogenaz
HCl	: Hidroklorik Asit
i.p.	: İntraperitoneal
KAT	: Kuyruk Asma Testi
MAO	: Mono Amin Oksidaz
MDB	: Major Depresif Bozukluk
mRNA	: Mesajcı Ribonükleik Asit
NaCl	: Sodyum Klorür
NaOH	: Sodyum Hidroksit
NF- κ B	: Nükleer Faktör Kappa B
NT	: Nörotrofin
PVDF	: Polivinilidin Florür
SBF	: Sinir Büyüme Faktörü

SDS	: Sodyum Dodesil Sülfat
SDS-PAGE	: Sodyum Dodesil Sülfat - Poli Akrilamit Jel Elektroforezi
SSRI	: Selektif Serotonin Reuptake İnhibitörü
TBS	: Tris-tamponlu Salin (Tris-Buffered Saline)
TEMED	: Tetra Metil Etilen Diamin
Trk	: Tropomiyozin-ilışkili Kinaz
V	: Volt
WHO	: Dünya Sağlık Örgütü (World Health Organization)
ZYT	: Zorlu Yüzme Testi

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil	Sayfa
2.1. Beyin kaynaklı nörotrofik faktörün şematik gösterimi	6
2.2. Ellagik asitin kimyasal yapısı	12
3.1. Açık alan testi düzeneği	20
3.2. Kuyruk asma testi düzeneği	21
3.3. Zorlu yüzme testi düzeneği	22
3.4. Fare kafa derisinin altından beyninin görüntüsü	23
3.5. Fare beyinde sağ ve sol hemisferdeki hipokampus	23
3.6. Fare beyninin ve sol hemisferden disekte edilmiş hipokampusunun septotemporal (S-T) görüntüsü	24
3.7. Buz dolu köpük kutu içinde elektroforez basamağındaki yürütme tankı	28
3.8. Transfer işleminden sonra membranın pons ile boyanması	29
3.9. Western blot yöntemi basamakları	31
4.1. Ellagik asit ve sertralin tedavisinin açık alan testindeki etkileri	37
4.2. Ellagik asit ve sertralin tedavisinin kuyruk asma testindeki etkileri	38
4.3. Ellagik asit ve sertralin tedavisinin zorlu yüzme testindeki etkileri	39
4.4. Fare hipokampus dokusunda BKNF ekspresyonunun western blot yöntemi ile gösterilmesi	39
4.5. EA ve sertralin tedavisinin erkek balb/c fare hipokampusunda BKNF düzeylerine etkisi	40

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo	Sayfa
Tablo 2.1. MDB semptomları ve deneysel hayvanlardaki davranışsal ve fizyolojik değişimleri ölçen bu semptomlarla ilişkilendirilen testler	17
Tablo 3.1. Deney hayvanlarının ayrıldığı gruplara ait özellikler	19



1. GİRİŞ

Depresyon bilindiği üzere oldukça sık görülen bir ruhsal rahatsızlıktır. Toplumda iş ve güç kaybına neden olmaktadır. Dolayısıyla depresyon tedavisi oldukça önemlidir ve tedavide kullanılan değişik nörotransmitter sistemlerini etkileyen ilaçlar mevcuttur. Depresyon tedavisinde kullanılan ilaçlar genellikle monoamin hipotezine dayanan tedavi yöntemleridir. Depresyonda monoamin hipotezi dışında nöronal plastisite hipotezi gibi yeni hipotezler de söz konusudur. Bu hipoteze göre depresyonda özellikle hipokampusta beyin kaynaklı nörotrofik faktör (BKNF) gibi moleküllerin azaldığı ileri sürülmektedir. Nörotrofik faktörler santral ve periferik sinir sisteminde nöronların proliferasyonu, farklılaşmasında ve plastisitede önemli rol oynarlar. Dolayısıyla santral sinir sistemi hastalıklarındaki rolleri çok yoğun bir şekilde araştırılmaktadır. Depresyon tedavisinde yeni bakış açıları sağlamak amacıyla depresyonda da BKNF'nin antidepresanlarla ilişkisi çalışılmaktadır. Yapılan çalışmalarda antidepresanların BKNF düzeylerini arttırdığı ve bir korelasyon gösterdiği saptanmıştır.

Ellagik asit (EA) son zamanlarda üzerinde yoğun çalışmaların yapıldığı polifenollerden biridir. Antiinflamatuvar, antioksidan ve antikanserojen etkilerinin yanı sıra santral sinir sisteminde de önemli etkilerinin olduğu görülmektedir. Literatürde antidepresan, antiepileptik ve nöroprotektif etkileri ile ilgili çok nadir çalışmalar mevcuttur. Ancak yine de son zamanlarda santral sinir sistemi üzerine olan etkileri dikkat çekmektedir. Bu konuda yeni çalışmaların yapıldığı görülmektedir. Bu nedenle bu tezde fare depresyon modellerinde EA'nın antidepresan-benzeri etkilerini araştırmak amaçlanmıştır. Ancak literatüre katkı sağlaması açısından EA'nın antidepresan-benzeri etkisinde hipokampustaki BKNF düzeylerine olan etkisinin araştırılması da amaçlarımız arasında yer almaktadır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Depresyon

Major depresif bozukluk (MDB) popülasyonun %2-5'ini etkileyen ve sık görülen hastalıklardan biridir (Murray ve Lopez, 2013). Türkiye'de en son Refik Saydam Hıfzısıhha Merkezi Başkanlığı tarafından yapılan Türkiye Hastalık Yüğü Çalışması 2004 verilerine göre unipolar depresif bozukluk ruhsal hastalıklar açısından kadınlarda birinci sırada iken erkeklerde de ikinci sıradadır. Hastalık yükünü oluşturan ilk 10 hastalık arasında da dördüncüdür (Ünüvar ve ark., 2006). Hastaların en az %30'unda 1 yıl süreyle çoklu antidepresan tedavisi almalarına rağmen remisyon gözlenmemektedir (Warden ve ark., 2007).

Depresyonun temel etyolojisi hakkında kesin bilgiye sahip değiliz, ancak çocukluk döneminde yaşanan suistimaller ve yetişkinlikteki stres gibi çeşitli faktörlerin görülme riskini arttırdığı bilinmektedir (Bradley ve ark., 2008; Danese ve ark., 2009; Paolucci ve ark., 2001; Risch ve ark., 2009; Widom ve ark., 2007). Depresyonda en çok rastlanan bulgulardan biri de manyetik rezonans görüntüleme çalışmalarıyla da desteklenen hipokampus hacminin azalmasıdır (Campbell ve ark., 2004; McKinnon ve ark., 2009; Videbech ve Ravnkilde, 2004). Preklinik çalışmalardan elde edilen verilere göre nöronal ve glial yeniden şekillenme ya da kayıp, nöronal ölüm ve baskılanmış yetişkin nöroenezini de içeren birkaç mekanizmanın hipokampal hacim azalmasının potansiyel nedenlerinden olabileceği düşünülmektedir (Czeh ve Lucassen, 2007; Sapolsky, 2000). Depresif hastaların en azından bir kısmında hipotalamo-hipofiz-adrenal aksın bozulduğu ve glukokortikoid salınımını etkileyebilen anormallikler ortaya çıktığı bildirilmiştir (Barden, 2004).

Depresif sendromlar, "Mental Bozuklukların Tanısal ve Sayımsal El Kitabı-5"te (DSM-5) tanımlanmıştır (Association, 2013). Buna göre ardışık iki hafta boyunca neredeyse her gün, günün büyük kısmında ortaya çıkan aşağıdaki semptomlardan en az beş tanesinin bulunması gerekmektedir. Semptomlardan biri depresif ruh hali veya ilgi/istek kaybı olmalıdır.

- Depresif ruh hali- üzüntü, çökkünlük, boşluk, çaresizlik hissi
- İlgi ve zevk kaybı
- Uykusuzluk veya aşırı uyuma
- İştah kaybı ya da kilo değişikliği
- Psikomotor retardasyon veya ajitasyon
- Düşük enerji
- Kötü konsantrasyon
- Değersizlik veya suçluluk düşünceleri
- Tekrarlayan ölüm veya intihar düşünceleri

Yoğun araştırmalara rağmen depresyona neden olan kesin nörobiyolojik süreç tam olarak anlaşılamamıştır. MDB'nin altında yatan nöropatoloji ile ilişkili en yaygın olarak kabul edilen hipotez monoamin hipotezidir (Schildkraut, 1965). Bu hipotez sinaptik aralıktaki bozulmuş monoamin nörotransmisyonuna vurgu yapar. Depresyon tedavisinde kullanılan ilk ilaçlar yaklaşık 50 yıl önce şans eseri keşfedilmiştir. Tüberküloz tedavisinde kullanılan iproniazid bu bileşiklerin ilkidir. İproniazidin tüberküloz hastalarının duygu durumunu yükselttiği gözlenmiş, ardından iproniazid tüberkülozu olmayan depresif hastalara verilmiş ve böylece iproniazidin antidepresan etkinliği gösterilmiştir. Yaklaşık aynı zamanlarda trisiklik yapısında bir antihistaminik olan imipraminin de antidepresan etkisi bulunmuştur. Sonrasındaki çalışmalar imipramin ve iproniazidin ekstrasellüler serotonin ve noradrenalin konsantrasyonunu arttırdığını göstermiştir. Bu yükselmeyi imipraminin bu iki nörotransmitterin geri alımını inhibe ederek, iproniazidin ise bu iki nörotransmitteri metabolize eden ana enzim olan monoamin oksidazı inhibe ederek gerçekleştirdiği gösterilmiştir. Bu buluşlar duygu durum bozukluklarının tedavisinde bir devrim niteliğinde olmuş ve daha sonraki antidepresanların geliştirilmesine katkı sağlamıştır. Bu antidepresanlar arasında serotonin ve / veya noradrenalinin presinaptik uçtaki reuptakini inhibe ederek etki

gösteren trisiklik antidepresanlar bulunmaktadır. Bu moleküller modern antidepresan sınıflarının oluşmasında şablon olarak kullanılmıştır. Modern antidepresanlar arasında selektif serotonin reuptake inhibitörü (SSRI), noradrenalin reuptake inhibitörü, serotonin ve noradrenalin reuptake inhibitörü yer almaktadır. Bu yeni sınıf ilaçların klinikte kullanılmaya başlamasıyla monoamin teorisinde bazı soru işaretlerinin olduğu görülmüştür. Örneğin, antidepresanlar sinaptik monoamin transmisyonunu dakikalar içinde arttırırken klinik etkinin ortaya çıkması 2-4 haftayı bulmaktadır. Monoamin teorisi depresif hastalarda kaydedilen makroskobik ve mikroskobik yapısal değişiklikleri açıklayamaz (Czeh ve ark., 2016). Klinikte kullanılan trisiklik veya SSRI gibi antidepresanlar; antidepresan etkilerini ekstrasellüler monoamin (özellikle serotonin ya da noradrenalin) düzeylerini modüle ederek gösterirler. Bu ilaçlar ekstrasellüler monoamin miktarını saatler içinde arttırabilirken antidepresan yanıt gecikmekte ve genellikle etkili antidepresan yanıtın gözlenebilmesi için haftalar süren tedavi gerekmektedir (Trivedi ve ark., 2006). Bu nedenle ekstrasellüler monoamin düzeylerini arttırmanın altında yatan diğer mekanizmaların antidepresan yanıtı aracılık ettiği ileri sürülmektedir. Bu bağlamda BKNF ile antidepresan etki mekanizması arasında ilişki bulunmuştur (Duman ve ark., 1997; Ghosh ve ark., 1994; Monteggia ve ark., 2004).

Diğer nörotransmitterlerde görülen bariz değişiklikler, hipotalamus-hipofiz-adrenal aksındaki fonksiyon bozukluğu ve son zamanlarda üzerinde durulan bağırsak florasındaki değişiklikler (Mayer ve ark., 2014) ve potansiyel inflamatuvar mekanizmaların (Rosenblat ve ark., 2014) depresyon fizyopatolojisine eşlik ettiği bildirilmiştir. Ayrıca glutamat (Sanacora ve ark., 2012) ve GABA (Luscher ve ark., 2011) gibi diğer nörotransmitterin ve kortikotropin salıveren hormonu (Lloyd ve Nemeroff, 2011) da içeren birçok nöropeptidin depresyon fizyopatolojisinde rol oynayabileceğini ileri süren farklı teoriler ortaya atılmıştır. Daha sonra geliştirilen teorilerde nöroplastisite ile ilişkili değişikliklerin öneminden bahsedilmiştir ve hastalığın fizyopatolojisinde yetişkinlerdeki hipokampal nöroenezin (Castren, 2005; Eisch ve Petrik, 2012; Lucassen ve ark., 2010; Miller ve Hen, 2015) ve BKNF gibi nörotrofik faktörlerin kritik rolü olduğu düşünülmektedir (Numakawa ve ark., 2014). Çok yakın zamanda değişik nöronal yolları etkileyen histon modifikasyonu ve DNA metilasyonu gibi epigenetik mekanizmaların MDB’de önemli katkısı olduğu gösterilmiştir (Sun ve ark., 2013).

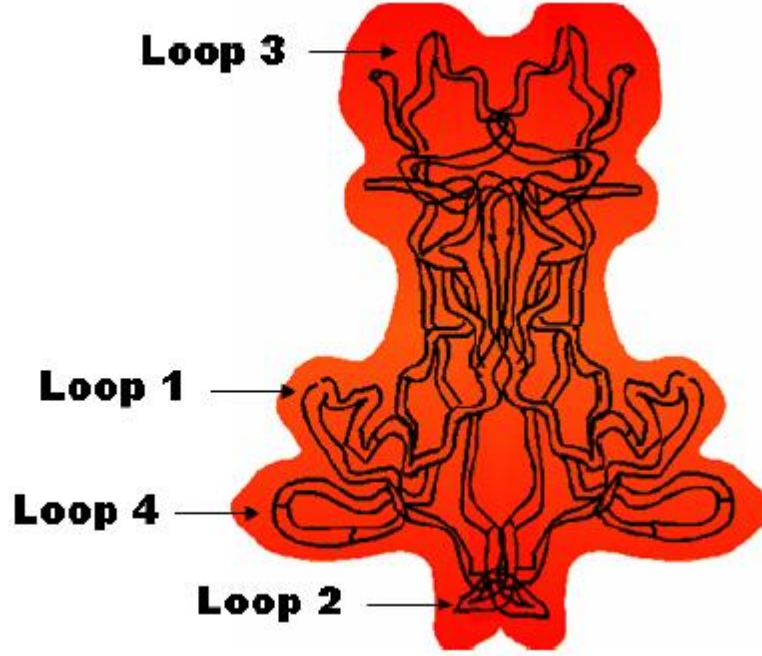
Günümüzde depresyon tedavisinde kullanılan farmakolojik ajanlar trisiklik antidepresanlar, monoamin oksidaz inhibitörleri, SSRI, serotonin noradrenalin reuptake inhibitörleri, atipik antidepresanlar (bupropiyon, mirtazapin, nefazodon, trazodon, mianserin, reboksetin, tianeptin, vortikoksetin, agomelatin) olarak sınıflandırılabilir. Ayrıca elektrokonvülsif tedavi (EKT), fokal beyin stimülasyonu (Vagus Siniri Stimülasyonu, Transkranial Manyetik Stimülasyon, Derin Beyin Stimülasyonu) gibi alternatifler de mevcuttur (Block ve Nemeroff, 2014).

Bütün bu yeni teorilerin ışığında depresyon tedavisinde kullanılmak üzere yeni ilaçlara gereksinim duyulmaktadır. Ancak son zamanlarda depresyon da dâhil nöropsikiyatrik bozuklukların tedavisinde kullanılabilecek ilaç araştırmalarında ciddi bir hayal kırıklığı söz konusudur. Bununla birlikte ilaç sanayisi mental bozukluklarda ilaç geliştirilmesinin major yatırım açısından “çok zor” olduğu hükmüne varmışlardır (Hyman, 2014). Bu sebeplerden dolayı, beyinde ilaç hedefi olabilecek yeni moleküller (reseptörler, enzimler vb.) keşfedilmesi veya nöron dışı santral sinir sistemi hücrelerinin fonksiyonlarının bilinmesi önemlidir.

2.2. Beyin Kaynaklı Nörotrofik Faktör

Hastalıklarla ilişkisi bilinen ve üzerinde çalışılan BKNF nörotrofin ailesinin bir üyesidir. Nörotrofin kelimesi sinir hücresi “nöron” ve Yunanca beslenme anlamına gelen “trophe” kelimelerinin birleşmesi ile oluşmuştur. Tarihsel açıdan bakıldığında nöronal sağkalım ve farklılaşmayı destekleyen trofik (besleyici) proteinler olarak ortaya çıkan nörotrofinler, son zamanlarda sinaptik iletim ve plastisite modülatörü olarak bilinmektedir (Bibel ve Barde, 2000; Park ve Poo, 2013). Nörotrofinler yaklaşık 13500 daltonluk alt ünitelerin nonkovalent olarak birleştiği dimerler halinde bulunur (Bothwell ve Shooter, 1977; Radziejewski ve ark., 1992) (Şekil 2.1). Nörotrofinlerden ilk keşfedileni sinir büyüme faktörü (SBF) adı verilen proteindir. SBF’nin keşfinden yaklaşık 30 yıl sonra Barde ve arkadaşları domuz beyninden nöronal sağkalım oluşturan bir faktör izole etmişler ve bu proteini BKNF olarak adlandırmışlardır (Barde ve ark., 1982). 1989’da BKNF’nin temel yapısı ve beyindeki ekspresyonu tanımlanmıştır ve aminoasit sekansı düzeyinde BKNF’nin SBF ile oldukça homolog olduğu bulunmuştur (Leibrock ve ark., 1989). Benzer bir aminoasit sekansına sahip nörotrofin-3 (NT-3) ve

nörotrofin-4/5 (NT-4/5) adlı moleküler de klonlanmıştır (Ip ve ark., 1992; Maisonpierre ve ark., 1990). Nörotrofin ailesinin üyelerinin keşfi sinir sisteminin gelişimi sırasında nöronal iletişimin oluşumunu ve yetişkin beyindeki sinaptik plastisiteyi, hafıza ve öğrenmeyi kavramayı sağlamıştır. Nörotrofinler beyin bağlantısı, nöronal plastisite, sinaptik bütünlük ve nörogenezde önemli aracı moleküllerdir (Ghosh ve Greenberg, 1995; Lee ve ark., 2002).



Şekil 2.1. Beyin kaynaklı nörotrofik faktörün şematik gösterimi (Geral ve ark., 2013)

Nörotrofik proteinler 2 tip reseptöre bağlanırlar: genel reseptör $p75^{NTR}$ ve yüksek afiniteyle bağlandığı tropomiyozin-ilişkili kinaz (Trk) reseptör. $p75^{NTR}$; tümör nekrozis faktör reseptör ailesinin bir üyesidir. Trk reseptörü de tirozin kinaz reseptör ailesinin bir üyesidir (Pattarawarapan ve Burgess, 2003; Reichardt, 2006). Bütün nörotrofik faktörler $p75^{NTR}$ reseptörlerine benzer afinite ile bağlanırlar ($K_d \approx 10^{-9}$ M) ancak Trk reseptörlerine daha seçici olarak ve yüksek afiniteyle ($K_d \approx 10^{-11}$ M) bağlanırlar. SBF Trk A reseptörüne, BDNF ve NT-4/5 Trk B reseptörüne, NT-3 de Trk C reseptörüne yüksek afiniteyle bağlanır (Pattarawarapan ve Burgess, 2003).

BKNF 1982 yılında domuz beyninden duyuşal nöronlar için hücre sağı kalımını sağılayan bir faktör olarak saflaştıırılmıştır (Barde *ve ark.*, 1982; Cohen *ve ark.*, 1954). BKNF kalp, böbrek, akciğer ve testis gibi dokularda yaygın bir şekilde eksprese edilse de fötal gelişim sırasında BKNF ekspresyonunun diğerk dokulara göre beyinde daha fazla olduğıu saptanmıştır (Kato-Semba *ve ark.*, 1997). Memeli santral sinir sisteminde en çok bulunan nörotrofin BKNF'dir. Özellikle beyinde hipokampus, serebral korteks, amigdala ve serebellumda eksprese edilir (Conner *ve ark.*, 1997; Ernfors *ve ark.*, 1990; Hofer *ve ark.*, 1990; Yan *ve ark.*, 1997). BKNF'yi kodlayan gen kromozomun 11p13 bölgesinde lokalize olmuştur (Maisonpierre *ve ark.*, 1990). Bu gen MDB için birçok aday genden birisidir (Levinson, 2006). Endoplazmik retikulumda pre-pro-molekül olarak sentezlenir ve iki kesilme basamağına uğrar. Pre-pro'dan proBKNF aracılığıyla olgunlaşmış formuna döner (Pang *ve ark.*, 2004; Revest *ve ark.*, 2014). Nöronal aktivite sırasında BKNF sinaptik aralığa salıverilir ve reseptörü olan Trk B'ye bağlanır. BKNF bağlanmasının ardından Trk B homodimerizasyon ve otofosforilasyona uğrar ve böylece ikincil yolakların aktivasyonu sonucu eksprese olan moleküller nöronal bütünlük ve sağıkalımda rol oynar (Chao, 2003). BKNF'nin nöron olgunlaşmasında, sinaps oluşumunda ve sinaptik plastisitede rolü bulunmaktadır (Park ve Poo, 2013). BKNF'nin kortikal ve hipokampal nöron hücre kültürlerinde hücrenin soma, akson ve dendritlerinden nöronal aktiviteye-bağımlı bir şekilde salgılanabildiğıi gösterilmiştir (Edelmann *ve ark.*, 2014; Lessmann ve Brigadski, 2009). Lessmann ve arkadaşları BKNF sekresyonunun iyonotropik glutamat reseptörleri ya da L-tipi voltaj kapılı kalsiyum kanallarına bağımlı kalsiyum influsu aracılığıyla gerçekleştiğini göstermiştir. (Lessmann ve Brigadski, 2009).

BKNF nöronların dendritlerinde ve glialarda sentezlenir ve salıverildiğıi yer olan terminallere transfer edilir (Lessmann ve Brigadski, 2009). BKNF yüksek afinite ile Trk B'ye bağlanır (Soppet *ve ark.*, 1991). BKNF nörotrofin ailesinin diğerk üyeleri gibi düşük afiniteyle de olsa p75 nörotrofin reseptörüne de bağlanır (Meeker ve Williams, 2015). Birçok çalışmada BKNF-Trk B'nin sinaptik plastisite mekanizmalarında kritik role sahip olduğıu gösterilmiştir. Trk B reseptörleri hem presinaptik hem de postsinaptik yerleşimlidir. BKNF'nin postsinaptik yanıtlarda olduğıu gibi nörotransmitter salınımını regüle ettiğıi gösterilmiştir (Madara ve Levine, 2008). BKNF'nin Trk B'ye bağlanması

en az üç intrasellüler sinyal yolağını düzenler (Park ve Poo, 2013). Birinci yolak; protein kinaz C aktivasyonuna yol açan fosfolipaz C- γ 'yi içerir. İkinci yolak downstream etkilere yol açan Ras'ı aktive eden mitojen-aktive protein kinazdır. Üçüncü yolak da Proteinkinaz B yolağını aktive eden fosfotidilinozitol-3-kinaz yolağıdır.

Fare beyinde BKNF mRNA ve protein ekspresyonları embriyonik gelişim sırasında saptanabilir hâle gelir ve en yüksek düzeylerine postnatal 10-14.günlerinde ulaşır. Yetişkin farede BKNF tüm beyinde eksprese edilir. Yetişkin farede BKNF ekspresyonunun en yüksek düzeyleri hipokampus nöronlarında görülür. Nöronal BKNF ekspresyonu; kalsiyum-aracılı kanallar üzerinden membran depolarizasyonu ve GABA ve glutamat nörotransmisyonu gibi birçok uyarandan etkilenir (Aid ve ark., 2007).

Antidepresan tedavinin bir sonucu olarak BKNF ekspresyonu, sekresyonu ve fonksiyonundaki değişimlerden ötürü sinaptik düzeyde terapötik yapısal ve fonksiyonel değişiklikler gözlenir (Martinowich ve Lu, 2008). Açık bir şekilde görülmektedir ki duygu durum bozukluklarında ve antidepresan yanıtta BKNF ve serotonin nöronal devrelerde birbiriyle bağlantılıdır.

2.3. Depresyon ve BKNF

Birçok çalışmada başta depresyon olmak üzere şizofreni gibi psikiyatrik bozuklukların ve nörodejeneratif bozuklukların patogeneğinde BKNF'nin rol oynadığı gösterilmiştir (Cannon ve ark., 2008; Castren ve Rantamaki, 2010; Pillai, 2008). Bazı yazarlar depresyonda nörotrofin teorisini geliştirmişlerdir. Bu teoriye göre nörogenesis ve nöronal plastisitedeki yetersizlik; MDB gibi stresle indüklenen bozuklukların etyolojik faktörüdür (Duman, 2002). Düşük BKNF üretimi MDB'yi hızlandırıyor olabilir (Karege ve ark., 2002). Depresyon şiddetindeki artış düşük serum BKNF düzeyleri ile ilişkilendirilmiştir. Antidepresan tedavi de BKNF düzeylerini normal seviyeye çekmiştir (Gonul ve ark., 2005).

BKNF'nin antidepresan yanıtı dâhil edildiği ilk çalışmalar konvansiyonel antidepresan ilaçların EKT'de olduğu gibi BKNF ve Trk B mRNA ekspresyonunu hipokampus ve kortikal bölgelerde arttırdığının gösterildiği çalışmalardır. Üstelik bu artış için gerekli olan zaman aralığı antidepresan-benzeri yanıt başlangıcıyla benzer bulunmuştur (Nibuya

ve ark., 1995; Nibuya ve ark., 1996). Bir çalışmada hipokampusun dentat girus ya da CA3 bölgesine düşük doz BKNF'nin direkt olarak infüzyonunun 3 gün içinde antidepresan-benzeri etkiyi indüklemeye etkili olduğu saptanmıştır ve BKNF üzerinden antidepresan etkinin oluşmasında bu bölgelerin anahtar rol oynayabileceği düşünülmüştür (Shirayama ve ark., 2002). Bu çalışmada BKNF'nin infüzyonundan sonra 10.güne kadar devam eden antidepresan bir etkinin olduğu, bu zaman aralığının da proteinin degradasyonu için geçen süre olduğu bildirilmiştir. Bununla birlikte BKNF'nin uzun dönem antidepresan etkiye aracılık etmek için sürekli plastisite mekanizmasını başlatabildiği gösterilmiştir. Başka bir çalışmada BKNF'nin periferik subkutan enjeksiyonunun, kemirgenlerde antidepresan-benzeri ve anksiyolitik-benzeri etki gösterdiği, kronik stresin depresyonla ilişkili etkilerini önlediği ve prefrontal korteks ve hipokampusta hücre sağkalımını arttırdığı gösterilmiştir (Schmidt ve Duman, 2010).

Depresyonlu hastalarda prefrontal korteks, hipokampus, amigdala ve serumdaki BKNF ya da Trk B düzeylerinin azaldığı gösterilmiştir (Dwivedi ve ark., 2003; Guilloux ve ark., 2012; Karege ve ark., 2002; Karege ve ark., 2005; Kim ve ark., 2007; Shimizu ve ark., 2003; Tripp ve ark., 2012). Ayrıca depresif hastaların serum BKNF düzeylerindeki azalmanın (Karege ve ark., 2002; Kim ve ark., 2007; Shimizu ve ark., 2003) antidepresanlarla geri döndürülebildiği de bildirilmiştir (Chen ve ark., 2001; Sen ve ark., 2008; Shimizu ve ark., 2003). Depresyondaki kişilere kronik antidepresan tedavisi uygulanmasından sonra BKNF ve Trk B mRNA ekspresyonlarının serebellumda da arttığı gösterilmiştir (Bayer ve ark., 2000). Kemirgen depresyon modellerinde de BKNF ve Trk B ekspresyon düzeylerinin azaldığı gösterilmiştir. Normal sıçan beyinde yapılan çalışmalarda trisiklik antidepresanlar (imipramin, desipramin vb.) (Balu ve ark., 2008; Nibuya ve ark., 1995; Russo-Neustadt ve ark., 1999), SSRI (fluoksetin, paroksetin, sertralin gibi) (Balu ve ark., 2008; Coppel ve ark., 2003; De Foubert ve ark., 2004; Nibuya ve ark., 1995), noradrenerjik ve spesifik serotonerjik antidepresanlar (mirtazapin, mianserin gibi) (Nibuya ve ark., 1995; Rogoz ve ark., 2005) ve monoamin oksidaz inhibitörleri (tranilipromin) (Balu ve ark., 2008; Nibuya ve ark., 1995; Russo-Neustadt ve ark., 1999) uygulandıktan sonra hipokampal ve kortikal BKNF/Trk B düzeyleri artmıştır. Elektrokonvülsif uyarılar da BKNF ekspresyonlarını kortekste (Angelucci ve ark., 2002; Nibuya ve ark., 1995) ve hipokampusta (Altar ve ark., 2004; Altar ve ark.,

2003; Nibuya *ve ark.*, 1995; Smith *ve ark.*, 1997) arttırmıştır. Spesifik bir Trk B agonisti olan 7,8-dihidroksiflavon ve onun O-metillenmiş metabolitleri zorlu yüzme testinde (ZYT) ve kuyruk asma testinde (KAT) antidepresan-benzeri etki göstermiştir (Liu *ve ark.*, 2013). Sıçan orta beynine BKNF'nin direkt infüzyonu antidepresan-benzeri etkileri indüklemiştir (Siuciak *ve ark.*, 1997). Şaşırtıcı bir şekilde sıçan beynindeki Trk B fosforilasyonu da antidepresanlar tarafından arttırılmıştır (Saarelainen *ve ark.*, 2003). BKNF nakavt fare ile yapılan bir çalışmada imipraminin Trk B fosforilasyonunu indüklediği gösterilmiştir. Bu da antidepresanla indüklenen Trk B aktivasyonunun BKNF'den bağımsız olabileceğini düşündürmektedir (Rantamaki *ve ark.*, 2011).

BKNF sinyalinin antidepresan yanıtındaki varlığıyla ilgili ileri kanıtlar yüksek afiniteli BKNF reseptörü olan Trk B ile ilgili çalışmalardan elde edilmiştir. Preklinik modellerde de antidepresan-benzeri yanıtı aracılık etmek için antidepresan ilaçların fonksiyonel Trk Breseptörüne ihtiyaç duydukları gösterilmiştir (Rantamaki *ve ark.*, 2007; Saarelainen *ve ark.*, 2003). Daha ilginç bir şekilde kronik antidepresan tedavisi Trk B reseptörünün fosforilasyonunu arttırmıştır. Bu durum hipokampusta ve anterior singulat kortekste BKNF aktivitesini arttırmıştır. Böylece BKNF-Trk B sinyalinin bu beyin bölgelerinde antidepresan etkilere aracılık etmede önemli rolü olduğu düşünülmektedir. Bu son çalışma aynı zamanda BKNF intrasellüler sinyalinin pekiştirmek için monoaminlere ihtiyaç olduğunu göstermektedir. Aynı zamanda monoamin baskılanmasının antidepresanla indüklenen Trk B aktivasyonunu önlediği gösterilmiştir (Rantamaki *ve ark.*, 2007). Hipokampus ve prefrontal kortekste BKNF'nin antidepresan yanıtlara aracılık ettiği ile ilgili güçlü kanıtlar varken diğer beyin bölgelerindeki BKNF'nin de antidepresan yanıtta rol oynadığı gösterilmiştir. Duygu durum bozukluklarındaki rolü nedeniyle dikkat çeken bir diğer beyin bölgesi de lateral habenuladır. Lateral habenulanın depresyonda aşırı aktive olduğu ve konvansiyonel antidepresan ilaçların antidepresan etkinliğinin bir parçası olduğu gösterilmiştir (Proulx *ve ark.*, 2014; Sartorius ve Henn, 2007). Ancak, bu bölgedeki BKNF'nin antidepresan yanıtta ya da depresyon-benzeri davranışta rol oynayıp oynamadığı henüz belirlenmemiştir.

Sonuç olarak, hipokampustaki BKNF-Trk B sinyalinin en azından prelinik hayvan modellerinde konvansiyonel antidepresanlara karşı gelişen antidepresan yanıtta kritik bir rol oynadığı düşünülmektedir.

2.4. Ellagik Asit

Doğal ürünler ilaç geliştirmede kullanılan önemli kaynaklardan biridir (Newman ve Cragg, 2012). FDA-onaylı ilaçların %50'den fazlası doğal ürünler ya da doğal ürünlerin türevleridir (Chin ve ark., 2006). Dahası doğal ürünlerin hücresel hedeflere özel seçiciliği vardır (Lagunin ve ark., 2010). WHO verilerine göre dünya nüfusunun yaklaşık %80'i temel sağlık bakımları için geleneksel tıba güvenmektedir (Farnsworth ve ark., 1985).

2015 yılında verilen Nobel Fizyoloji ya da Tıp ödülü doğal ürünler ve ihmal edilmiş hastalıklar üzerinde yapılan çalışmaları kapsamaktadır. Bu ödül iki ayrı çalışmaya verilmiştir. Bunlardan biri geleneksel Çin tıbbında kullanılan artemisininin yeni bir antimaleryal ilaç olarak keşfi ile Çinli bilim kadını Profesör Youyou Tu'ya verilmiştir. (https://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/2015/).

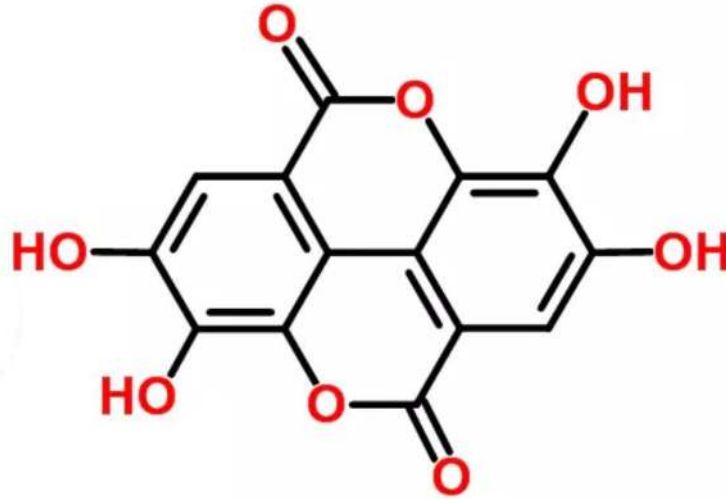
Taninler çeşitli bitki türlerinde bulunan polifenolik bileşiklerdir. Suda çözünürler ve moleküler kütlesi 500-2000 Dalton arasındadır. Bitki fizyolojisinde taninler genelde dört gruba ayrılırlar: gallotaninler, ellagitaninler (ET), kondanse taninler ve kompleks taninler (Khanbabaee ve van Ree, 2001). Bu moleküllerden ET'ler birçok bitki familyasının en çok görülen bileşenidir (Niemetz ve Gross, 2005). 500'den fazla doğal üründe bulunan ET'ler taninlerin en geniş grubunu oluşturmaktadır (Khanbabaee ve van Ree, 2001).

Son yıllarda, işlenmemiş besinlerde bulunan moleküllerin biyolojik aktivitelerine olan ilgi artmaktadır. Bu tür bileşenlerin önemli bir kısmını ET gibi alt grupları olan polifenoller oluşturur. ET'ler kompleks kimyasal yapıları ile karakterizedir. ET'ler spontan laktonizasyonla heksahidroksidifenoik aside dönüşür ve bu bileşik de sonrasında ellagik asite (EA) çevrilir. ET'lerin ve metabolitlerinin antikanser aktivitesi serbest radikal tutucu yetenekleriyle ilişkilendirilmiştir. Böylece ET'ler oksidatif stresi önler ya da azaltır. Aksi hâlde oksidatif stres karsinogenezi indükler ki bu durum

ateroskleroz ve kardiyovasküler hastalıkların ana nedenidir (Kaneto *ve ark.*, 2010). ET’lerce zengin besinlerin (ceviz, nar) tüketilmesi ile kardiyovasküler hastalıklardan koruyucu etki açısından ilişki bulunmuştur (Beretta *ve ark.*, 2009; Larrosa *ve ark.*, 2010).

Sağlığı destekleyici özelliklerinden ve önemli biyolojik aktivitelerinden dolayı ETler nutrasötik sınıfına dâhil edilmektedir. Dünya piyasasında EA ya da ET içeren besin ya da tıbbi bitkilerin ekstraktları bulunmaktadır. Örneğin; VitaPurity Ellagic Ultra™ , Ellagic acid Young Again™ , PomActiv™ ve Pomegranate Extract. Türkiye’de de New Life AnOx 23™ isimli preparatta 7 mg EA bulunmaktadır.

EA (2,3,7,8-tetrahidroksi[1]-benzopiranol[5,4,3-cde]benzopiran-5,10-dion) oldukça termostabil bir moleküldür (erime noktası 350°C) ve moleküler ağırlığı 302.197 g.mol⁻¹ ‘dir. Su, alkol ve eterde çok az çözünür ancak potasyum hidroksitte daha iyi çözünür (Grasser ve Enna, 1922) (Şekil 2.2).



Şekil 2.2. Ellagik asitin kimyasal yapısı

EA’nın glukoz ya da kinik asit ile esterlenmesi ile ET’ler oluşur. 500’den fazla değişik ET varlığı bildirilmiştir (Feldman *ve ark.*, 1999).

EA, lipofilik bölgesini temsilen 4 halkaya; hidrofilik bölgesini temsilen de 4 fenolik grup ve 2 laktona sahiptir. Fenolik grupları hidrojen-oluşturucu; laktonlar da elektron alıcı özelliktedir (Aguilera-Carbo *ve ark.*, 2005). EA özellikleri, uygulamaları ve insan sağlığına yararları nedeniyle son yıllarda ticari olarak ilgi uyandıran bir bileşiktir. EA aynı zamanda doğal selektif östrojen reseptör modülatörüdür (Papoutsi *ve ark.*, 2005). EA'yı serbest hâlde içermeyen bitkilerden EA temini ET'lerin gastrointestinal sistemde hidrolize olmasıyla gerçekleşir. Bu sebepten dolayı EA bitkisel besinlerdeki hidrolize olabilen taninlerin varlığı için kimyasal bir indikatör olarak kullanılabilir. Aynı zamanda diyetle alınan ET'nin biyoyararlanımı için biyomarker olarak da kullanılabilir (Seeram *ve ark.*, 2004).

2.5. Ellagik Asitin Biyoyararlanımı ve Metabolizması

ET ve EA'nın biyoyararlanımı ve metabolizması bu fitokimyasalların biyolojik rolünü ve in vivo etkisini anlamak için öğrenilmesi gereken konulardır. Genellikle büyük moleküler boyutu olduğu için ET'ler absorbe edilemez (Cerdea *ve ark.*, 2003b; Cerda *ve ark.*, 2005). Ancak, nar ET'leri sıçanlara uzun süre yüksek doz verildiğinde az miktarda nardaki ET'lerden olan punikalajin plazmada tespit edilmiştir (Cerdea *ve ark.*, 2003a). İnce bağırsağın fizyolojik koşulları altında ET'ler hidrolize olarak EA'yı oluşturur (Larrosa *ve ark.*, 2006). Serbest EA alımından 30-90 dakika içinde hızlıca absorbe olur. Bu durumda mideden ve ince bağırsağın proksimalinden direkt absorpsiyonu söz konusudur (Seeram *ve ark.*, 2004; Stoner *ve ark.*, 2006; Stoner *ve ark.*, 2005). Bazı çalışmalarda EA plazmada saptanmasına karşın diğer çalışmalarda serbest EA absorpsiyonuna rastlamamışlardır. ET'lerin ve serbest EA'nın biyoyararlanımı bu bileşenlerin gastrointestinal sistemin hangi bölgesinden absorbe edildiğine bağlıdır. In vitro çalışmalarla ET'lerin midenin asidik yapısına ve gastrik enzimlerin (pepsin, renin, gastrik lipaz) varlığına karşı dayanıklı olduğu gösterilmiştir (HCl, pH 1.8-2.0). Ayrıca midede ne hidrolize olup serbest EA açığa çıkarır ne de degrade olur (Quideau, 2009). Dahası pankreatik enzimler ve safra tuzları da ET'leri EA'ya hidrolize edemez. Asitlenmiş kimüs küçük porsiyonlar halinde mideden pH'nın daha yüksek olduğu gastrointestinal sistemin ileri bölümlerine (duodenum, ince bağırsak) taşınır (pH 7,1-8,4). ET'lerin de hidrolize olabilmesi için en iyi koşullar nötral ya da hafif alkali pH'dır (pH 7-7.3) (Larrosa *ve ark.*, 2006). ET'lerin kompleks kimyasal yapıları nedeniyle

mideden absorbe olmaları mümkün değildir. Ancak serbest EA molekülleri için sindirim sistemindeki absorpsiyon midede başlar (Lipinska *ve ark.*, 2014).

Gastrointestinal sistem hücreleri tarafından EA absorbe edilir ve hızlıca katekol-O-metiltransferaz (COMT) enzimi ile metil eterlerine dönüştürülür. COMT intrasellüler bir enzim olup katekolaminlere 2 metil eter grubu ekleyerek bozulmalarına neden olur.

Sindirimin diğer kısımlarında ET'ler ve EA intestinal mikrobiyota tarafından dibenzopiranon metabolitlerine (Ürolitin A ve B) dönüştürülürler. Ürolitinler bağırsaktan absorbe edilip glukronidasyona uğrarlar (Tomás-Barberán *ve ark.*, 2009). Sıçanlarda ve farelerde yapılan çalışmalar genellikle ET yerine EA kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Sıçanlarda EA'nın oral alımını takiben dozun %10'u 3,8-dihidroksi-6H-dibenzo[b,d]piran-6-on (Ürolitin) olarak idrar ve feçesle atılır (Doyle ve Griffiths, 1980). Farelere ise daha yüksek doz verildiğinde absorpsiyon oranı %28 bulunmuştur (Teel ve Martin, 1988). İdrarda ve feçeste başka bir metabolit tespit edilmiş ancak tanımlanamamıştır. Bu iki metabolit de mikrofloral orijinlidir. İntraperitonel uygulamayı takiben üçüncü bir metabolit daha idrarda tespit edilmiştir. Germ-free hayvanların feçesinde az miktar değişmemiş EA'ya rastlanırken, normal sıçanların feçesinde ya da idrarında rastlanmamıştır. Dolayısıyla ET'lerin en önemli metaboliti ürolitinlerdir. ET içeren absorbe edilmemiş besinlerin intestinal bakteriler tarafından metabolizasyonu sırasında oluşurlar. Ürolitinler sonrasında enterohepatik sirkülasyona karışır (Cerdea *ve ark.*, 2004)(Tomás-Barberán *ve ark.*, 2006). Ürolitinler hormon analogları gibi rol oynayabilen biyoaktif bileşiklerdir (Heber, 2008; Seeram *ve ark.*, 2004)(Seeram *ve ark.*, 2006b).

İnsanlarda yapılan çalışmalarda nar suyu tüketiminden sonra plazmada EA bulunurken, punikalajine rastlanmamıştır. 25 mg EA ve 318 mg punikalajin içeren nar suyu alımından 1 saat sonra EA'nın plazma konsantrasyonu 31-33 ng/ml bulunmuştur (Mertens-Talcott *ve ark.*, 2006; Seeram *ve ark.*, 2006a; Seeram *ve ark.*, 2004). Sıçanlarda ise nar yaprağı ekstresi tüketildikten sonra plazmalarında hem EA hem de punikalajin bulunabilir (Cerdea *ve ark.*, 2003a)(Lei *ve ark.*, 2003). Yan ve arkadaşları 50 mg/kg (tek doz) EA'nın sıçan beyinde ulaştığı düzeyi belirlemişlerdir. Buna göre EA plazmada 0,31µM maksimum konsantrasyonuna ulaşırken sıçan beyinde oldukça

düşük konsantrasyonlarda (<12,5 ng/g doku) belirlenmiştir (Yan ve ark., 2014). Buna rağmen EA nöroproteksiyonu indüklemeye yeteneğine sahiptir. Bu yeteneği antioksidan kapasitesine bağlanmaktadır. Ancak ileri çalışmalarla EA'nın santral sinir sisteminde oluşturduğu bu etkinin mekanizması araştırılmalıdır.

EA'ya atfedilen çeşitli farmakolojik özelliklerinin EA'nın kendisine mi metabolitlerine mi ya da her ikisine birden mi bağlı olduğu henüz net olarak bilinmemektedir (Bisen ve ark., 2012).

EA'nın etkileri üzerine ilk çalışmalar 1960'lı yıllarda kan basıncı ve pıhtılaşma üzerine etkileriyle ilişkilidir (Bhargava ve Westfall, 1969; Botti ve Ratnoff, 1964). EA'nın antiinflamatuvar (Park ve ark., 2016) (Rosillo ve ark., 2012), antidiyabetik (Fatima ve ark., 2015), antioksidan (Özkaya ve ark., 2010; Priyadarsini ve ark., 2002), antikanserojen (Wang ve ark., 2016) etkilere sahip olduğu gösterilmiştir.

NF-κB redoks regülasyonu ve inflamatuvar yönle ilişkilendirilen bir transkripsiyon faktörüdür (Mattson ve ark., 1997; Salminen ve ark., 2011). EA'nın NF-κB inhibitörü bir ajan olduğu sıçan böbreği, fare karaciğeri ve akciğeri gibi birçok deneysel modelle gösterilmiştir (Ahad ve ark., 2014; El-Garhy ve ark., 2014; Lee ve ark., 2014; Zhou ve ark., 2014). Pirinçcioğlu ve arkadaşları karbon tetraklorüre (CCl₄) maruz kalan sıçanlarda nar suyunun beyinde antioksidan etkiyi indüklediğini göstermiştir (Pirinccioglu ve ark., 2014).

Girish ve arkadaşları 2012 yılında yaptıkları bir çalışmada zorlu yüzme testi ve kuyruk asma testi kullanarak farelerde EA'nın antidepresan benzeri etkinliği olduğunu bildirmişlerdir (Girish ve ark., 2012). Aynı şekilde Dhingra ve arkadaşları yaptığı çalışmalarda EA'nın antidepresan etkinliği olabileceğini ileri sürmüşlerdir (Dhingra ve Chhillar, 2012). Ferreres ve arkadaşları da EA'nın MAO A inhibitörü etkisinin olabileceğini ve bu etkisinin antidepresan etkiden sorumlu olabileceğini bildirmiştir (Ferreres ve ark., 2013).

2.6. Deneyisel Depresyon Modellerinde Kullanılan Kriterler

1969'da McKinney ve Bunney yeni ufuklar açan yazılarında geçerli bir depresyon modelinin sağlaması gereken 5 kriteri şöyle önermişlerdir:

- 1) Semptomların benzerliği
- 2) Gözlenebilir ve ölçülebilir davranışsal değişiklikler
- 3) Gözlemciler arası uyuma
- 4) Antidepresan tedavilere yanıt
- 5) Sistemin tekrarlanabilirliği (McKinney ve Bunney, 1969)

1984 yılında Willner ideal olarak bir hayvan modelinin en az 3 major kriteri yerine getirmesi gerektiğini öne sürmüştür (Willner, 1984). Şimdi ise birçok araştırmacı Willner tarafından ortaya atılan 3 major kritere ilave olarak etyolojik geçerliği de dâhil etmişlerdir. Bu kriterleri özetlemek istersek; hayvan modellerinin, birçok açıdan insan durumunu taklit etmesi gerekir:

- 1) *Görünüş geçerliliği*: Davranışsal fenotip ile klinik semptom profili arasındaki benzerlik (Face validity)
- 2) *Yapısal geçerlik*: Benzer nörobiyolojik temelde oluşması (Construct validity)
- 3) *Öngörü geçerliği*: İnsan hastalıklarında kullanılan klinikte etkili antidepresan tedavisiyle deneyde kullanılan hayvanda iyileşme veya azalma olması ve tam tersi olarak da klinikte etkili olmayan tedavi ile hayvanda değişiklik gözlenmemesi (Predictive validity)
- 4) *Etyolojik geçerlik*: İnsanlarda hastalık ortaya çıkarmada önemli olduğu bilinen olaylarla başlamaları (Etiological validity)

Şu anda ne yazık ki depresyonda kullanılan hiçbir model bu dört kriteri tam anlamıyla sağlayamamaktadır. Bazı MDB semptomlarını taklit eden modeller ve antidepresanların belli bir grubunun (SSRI) etkinliğini test etmek için kullanılan birkaç basit test (ör: zorlu

yüzme testi) vardır. Tablo 2.1, MDB'nin major semptomları ve potansiyel biyomarkerlarını ve deneysel hayvanlarda bunlara benzeyen davranışsal ve fizyolojik fenotipleri ve bunları belirlemek için kullanılabilecek testleri özetlemektedir. Şu unutulmamalıdır ki; bu basit testler ya da görüntüleme metotları depresyonun geçerli hayvan modelleri olarak gördüğümüz kompleks deneysel pardigmalarla eşit değildir (Czeh *ve ark.*, 2016).

2.7. MDB'nin Patofizyolojisini Anlamak İçin Kullanılan Hayvan Modelleri

1. Depresyonun nörokimyasal modeli
2. Depresyonun sosyal strese dayalı etyolojik modelleri
(Ayrılma, Uzun süreli izolasyon, Sosyal hiyerarşi)
3. Çevresel strese dayalı, depresyonun etyolojik modelleri
(Öğrenilmiş çaresizlik, Zorlu yüzme testi / Kuyruk asma testi, Kronik stres)
4. Olfaktör bulbektomi
5. Genetik modeller olarak sınıflandırılabilir (Czeh *ve ark.*, 2016).

Tablo 2.1. MDB semptomları ve deneysel hayvanlardaki davranışsal ve fizyolojik değişimleri ölçen bu semptomlarla ilişkilendirilen testler

DSM-5 kriterleri	Deneysel hayvanlarda ilişkilendirilen fizyolojik ya da davranışsal fenotip	Fizyolojik değişikliği belirlemek için davranış ya da metodu ölçen testler
Depresif ruh hali-	-	-
İlgi ve zevk kaybı	Anhedoni-benzeri davranış	Sükroz tercihi İntrakranial kendi kendine stimülasyon Şartlı yer tercihi Dişi idrarı koklama
Kilo değişikliği ya da iştah kaybı	Kilo alma veya verme	Vücut ağırlığı ölçümleri
Uykusuzluk veya aşırı uyuma	Değişmiş diurnal ritim	Diurnal aktivite ölçümü Uyku EEG
Psikomotor ajitasyon veya retardasyon	Davranışsal umutsuzluk, değişmiş lokomotor aktivite	Zorlu yüzmeye testi Kuyruk asma testi Öğrenilmiş çaresizlik Azalmış kafes aktivitesi Koşu bandı Yuva yapma
Değersizlik veya suçluluk düşünceleri	-	Tımar etme (grooming)* Kürk durumunun değerlendirilmesi*
Tekrarlayan ölüm veya intihar düşünceleri	-	-
Kararsızlık ya da kötü konsantrasyon	Kognitif bozukluklar	Morris su labirenti Y-labirenti

Değersizlik veya suçluluk düşünceleri ve tekrarlayan ölüm veya intihar düşüncelerinin hayvanlarda taklit edilmesinin imkânsız olduğu unutulmamalıdır. *Antropomorfik bir bakış açısıyla hayvan kendini uygun şekilde tımar etmek için değersiz hissettiğinde sonuç olarak kürk durumunun kademeli olarak kötüleşeceği öne sürülebilir.

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Deney Hayvanları

Çalışmada Akdeniz Üniversitesi Deney Hayvanları Ünitesinden temin edilen ve aynı ünite de barındırılan erkek 2-3 aylık albino fareler (25-30gr) kullanıldı. Deney hayvanları 5 gruba ayrıldı (Tablo 3.1). Her bir gruptaki farelere 14 gün boyunca günde 1 defa olacak şekilde intraperitoneal (i.p.) yoldan, 1 ml ilaç veya taşıyıcı (vehicle) uygulaması yapıldı.

	Grup adı	Kullanılan ilaç	Günlük dozu	Tedavi süresi	Uygulama yolu	Hayvan sayısı
Grup 1	Kontrol	Taşıyıcı	1 ml	14 gün	i.p.	10
Grup 2	Sertralin	Sertralin	5mg/kg	14 gün	i.p.	10
Grup 3	EA1mg/kg	Ellagik asit	1mg/kg	14 gün	i.p.	10
Grup 4	EA2,5mg/kg	Ellagik asit	2,5mg/kg	14 gün	i.p.	10
Grup 5	EA5mg/kg	Ellagik asit	5mg/kg	14 gün	i.p.	10

Tablo 3.1. Deney hayvanlarının ayrıldığı gruplara ait özellikler

Hayvanlar deney süresince 22-25°C oda sıcaklığında ve 12 saat aydınlık-12 saat karanlıkta olacak şekilde standart bir şekilde su ve yiyeceklerle beslendi. Çalışma protokolü Akdeniz Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından onaylandı (07 sayı- 45 karar no 09.06.2014). 14.günün sonunda hayvanlar davranış testlerinin yapılacağı odaya getirilip yarım saat odaya alışmaları için beklendi. Sonrasında sırasıyla açık alan testi, kuyruk asma testi ve zorlu yüzme testi yapıldı. Davranış deneylerinden sonra hayvanlar sakrifiye edilerek hipokampusları çıkarıldı. Hipokampustaki BKNF protein düzeylerini belirlemek için Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Araştırma ve Uygulama Merkezinde western blot analizi yapıldı.

3.2. Davranış Deneyleri

3.2.1. Açık Alan Testi (Lokomotor Aktivite)

40 cm yüksekliğinde siyah akrilik malzemeden yapılmış kenarları 80 cm olan kare alan kullanıldı. Fareler düzeneğin ortasına yerleştirilip 5 dakika boyunca alanı keşfederken video kaydı yapıldı. Noldus EthoVision® XT bilgisayar yazılımı yardımıyla katedilen mesafe verileri hesaplandı (Şekil 3.1) (Prior *ve ark.*, 2004).



Şekil 3.1. Açık alan testi düzeneği

3.2.2. Kuyruk Asma Testi

Fareler kuyruğundan Şekil 3.2’de görüldüğü düzenekten asılarak vücudu havada aşağı gelecek şekilde sarkıtıldı. Test boyunca deneklerin havada asılı durumdayken hareketsiz kalma süreleri video aracılığıyla kayıt altına alındı. Deneyin ilk 2 dakikası alıştırma periyodu olarak değerlendirildi ve son 4 dakika içerisinde deney hayvanının hareketsiz kaldığı süre saniye cinsinden kaydedildi (Steru *ve ark.*, 1985).

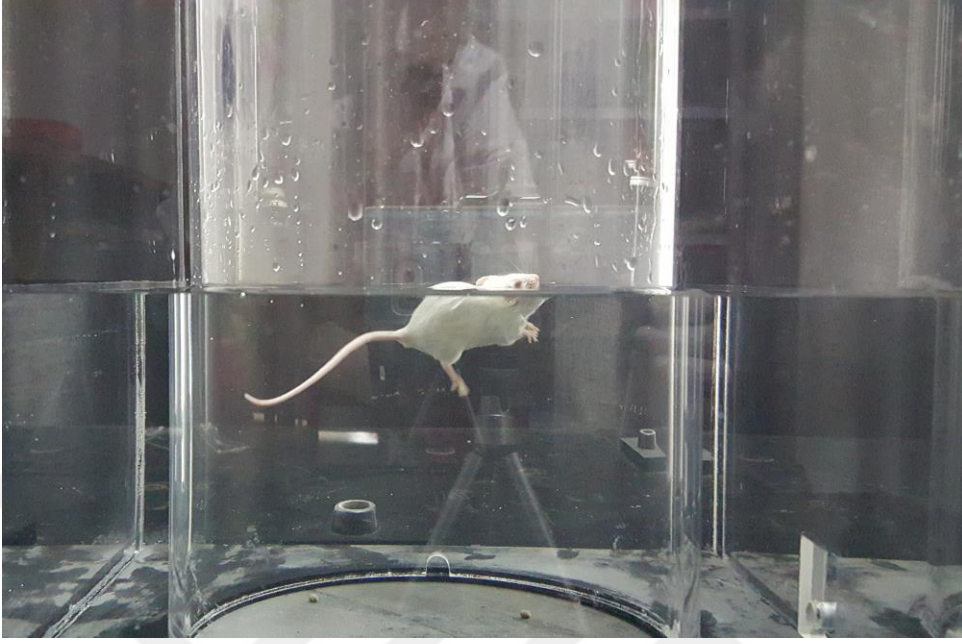
3.2.3. Zorlu Yüzme Testi

Fareler 50 cm yüksekliğinde, 18 cm çapında, şeffaf akrilik malzemeden yapılmış silindir bir tankta yüzdürüldü. Silindir tankın dış kısmı kare prizma şeklinde başka bir tank ile çevrilidir. Bu şekilde olmasının nedeni video kaydı sırasındaki optik

yanılsamayı engellemektir. Silindir tank 20 cm yüksekliğinde 24 °C'lik su ile doldurulmuştur. 20 cm yükseklik hayvanların kuyruk kısımlarıyla tankın dip kısmına değmesini engelleyecek düzey olarak saptanmıştır. Geriye kalan 30 cm'lik boş kısım hayvanların kenara tutunarak ve sıçrayarak dışarı çıkmalarını engellemektedir. Fareler 6 dakika boyunca yüzdürüldü. Bu testin amacı hayvanların 4 dakika boyunca hareketsiz kalma süreleri hesaplamaktır. Bu amaçla test boyunca deneklerin bireysel davranışları video kaydına alındı. Deneyin ilk 2 dakikası hayvanların alıştırma periyodu olarak değerlendirildi ve son 4 dakika içerisinde deney hayvanının hareketsiz kaldığı süre saniye cinsinden kaydedildi (Şekil 3.3) (Porsolt *ve ark.*, 1977).



Şekil 3.2. Kuyruk asma testi düzeneği



Şekil 3.3. Zorlu yüzmeye testi düzeneği

3.3. Hipokampusun Çıkarılması

Davranış testleri tamamlanan farelere eter anestezisi altında servikal dislokasyon uygulandı. Beyin sapından hayvanın yüzüne doğru bistüri ile kesi atılarak kafatası üstündeki deri ve diğer bağ dokular yanlara doğru açıldı (Şekil 3.4). Deney hayvanı servikal bölgeden fleksiyona getirilerek arkadan öne doğru beyin dokusu zedelenmeden kafa tası yanlara doğru açıldı. Kranium açıldıktan sonra baş aşağı çevrilen (prefrontal korteksi yere bakacak şekilde) hayvanın beyin dokusu pens yardımıyla kraniumun sinirlerinden ayrılıp yerçekimi etkisiyle buzun üzerindeki petri kabının içine dorsal kısım üste gelecek şekilde konuldu. Olfaktor bulbus ve beyin sapı bistüri ile ayrılarak atıldı. Beyin dokusu arka ortasından yavaşça yanlara doğru açıldı. Hipokampusun altına kıvrık uçlu diseksiyon pensi ile girildi (Şekil 3.5). Hipokampusun tam olarak alt kısmına girildiğinden emin olunduktan sonra hipokampus yavaşça yanlara doğru dikkatlice açılarak beyinden çıkartıldı. Ependorflara alınan hipokampus dokuları sıvı nitrojen ile dondurulduktan sonra -80°C 'deki buzdolabında saklandı. Hipokampus dokuları tartıldıktan sonra her 200 mg doku için proteaz inhibitörü içeren lizis tamponundan 600 μl eklendikten sonra mekanik olarak ezildi. Ependorflara aktarılan hipokampuslar vortekslendikten sonra, 30 sn 10000 rpm'de santrifüj edildi. Elde edilen süpernatantlar

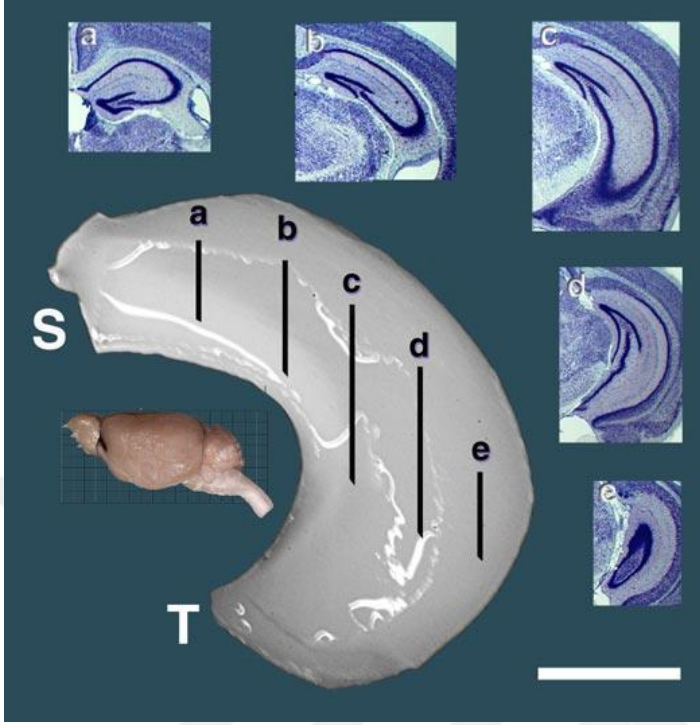
başka ependorflara aktararak 3 kez sıvı azot ile dondurulup çözüldükten sonra lizis tamponu ile 4 kat sulandırıldı. Şekil 3.6'da başka bir çalışmaya ait fare beyini ve hipokampusu gösterilmiştir.



Şekil 3.4.Fare kafa derisinin altından beyninin görüntüsü



Şekil 3.5.Fare beyinde sağ ve sol hemisferdeki hipokampus



Şekil 3.6. Fare beyninin ve sol hemisferden disekte edilmiş hipokampusunun septotemporal (S-T) görüntüsü. Nissl boyama yöntemiyle hipokampus iç anatomisinin koronal düzlemde 5 farklı gösterimi (a-e) (Lu ve ark., 2001).

3.4. Bradford Yöntemi ile Protein Miktar Tayini

Hazırlanan doku lizatları -80°C 'den çıkartılıp çözündükten sonra vortekslendi. 10000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi ve lizatlar yeniden buz üzerine alındı. Her defasında 2 kat dilüe edilmiş 7 standart solüsyon 96 kuyucuklu plağın ilk sütununa sırasıyla teker teker ilave edildi. Kuyucuklara konan her bir solüsyonun üzerine 1XDYE ilave edildi. Dilüe edilmiş örnekler de sırasıyla 96 kuyucuklu plağa yerleştirildi ve üzerine 1XDYE ilave edildi. 96 kuyucuklu plaka alüminyum folyoya sarılıp oda sıcaklığında yarım saat bekletildi. Spektrofotometre ile 595 nm'de ölçüm yapıldı. Elde edilen grafiğe göre western blot protokolü için, her örnekte eşit miktarda protein olacak şekilde hesaplamalar yapıldı.

3.5. Hipokampal BKNF Ekspresyonunun Western Blot Yöntemi ile Belirlenmesi

Western blot yönteminde kullanılan solüsyonlar aşağıda belirtildiği şekilde hazırlandı:

- ✓ *Resolving Buffer (Ayrıştırıcı tampon)*: 181,64 gr trisbase tartılıp 1 litre distile suda (dH_2O) çözüldü ve pH'sı HCl ve NaOH kullanılarak 8.8'e pH-metre yardımıyla ayarlandı (1,5M TrisBase pH: 8.8).
- ✓ *Stacking Buffer (İstifleyici tampon)*: 60,5 gr trisbase tartılıp ve 1 litre distile suda çözüldü ve pH'sı HCl ve NaOH kullanılarak 6.8'e pH-metre yardımıyla ayarlandı (0,5M TrisBase pH: 6.8).
- ✓ *10X Running Buffer (Yürütme tamponu)*: 5 gr SDS tartılıp 50 ml distile su ile karıştırıldı ve süzgeç kâğıdından geçirilip filtrelendi. 15 gr trisbase ve 94 gr glisin tartılıp 50 ml %10 filtrelenmiş SDS eklendikten sonra 1 litreye distile su ile tamamlandı.
- ✓ *10X TBS*: 24.2 gr Trisbase ve 80 gr NaCl tartılıp 800 ml dH_2O içerisinde çözdürüldükten sonra 1 litreye distile su ile tamamlandı ve pH'sı HCl ve NaOH kullanılarak 7.6'ya pH-metre yardımıyla ayarlandı. Bu stok solüsyondan 1 litre 1x TBS ve 1ml Tween 20 karışımı hazırlandı. 1XTBS-Tween20 hazırlanması: 100 ml 10XTBS + 900 ml distile su + 1 ml Tween20
- ✓ *2X SDS Loading Dye (Yükleme boyası)*: 20 ml dH_2O + 40 ml gliserol + 20 ml %10 SDS + 20 ml stacking buffer + 6 mg bromofenol mavisi karıştırılıp her birinde 950 μl olacak şekilde ependorflara bölündü. Ependorflar -80°C 'lik buzdolabına kaldırılıp kullanılacağı zaman çeker ocakta 50 μl 2-merkaptotanol eklendi.
- ✓ *%10 APS*: Her western deneyi için taze hazırlandı. 1,5 ml'lik ependorf içine 0,1 gr APS alınıp 1 ml distile suda çözdürüldü. Bu çözelti oda sıcaklığında stabil olmadığı için derhal buza alındı.
- ✓ *Transfer Buffer (Aktarma tamponu)*: Her western çalışması için taze olarak hazırlandı. 7,5 gr glisin + 14,5 gr trisbase + 2 litre distile su + 500 ml metanol. Karıştırma cihazında mıknatıslı balık yardımıyla 5 dakika karıştırıldı.
- ✓ *Commasive Mavi*: 200 ml asetik asit + 1800 ml dH_2O + 0,5 gr comassie mavi 1 saat boyunca karıştırılıp süzgeç kâğıdı ile filtreden geçirildi.

- ✓ *Destain (Boya uzaklaştırma):* 75 ml metanol + 25 ml asetik asit + 150 ml distile su
- ✓ *%5 Bloklama (Engelleme) solüsyonu :* 50 ml'lik plastik falkon tüpüne süt tozundan 2,5 gram tartılıp üzerine 50 ml 1XTBS-Tween20 eklendi. 1-2 dakika vortekslendi.
- ✓ *%1 Bovine Serum Albumin (BSA):* 1 gr BSA, 100 ml 1XTBS-Tween20 ile karıştırıldı.

3.5.1. Western Blot

1) *Ön hazırlık:* Kontaminasyonu önlemek için, kullanılan malzemelerden temizlenmeye uygun olanları %70'lik alkolle temizlendi. Jellerin katılaşmaları için döküldükleri camlar, aralarına ayırıcı koyularak jel dökme aparatına yerleştirildi ve camlar arasında kalan boşluğa jeller sıvı hâldeyken önce alt jel, alt jel katılaştıktan sonra da üst jel pipet yardımıyla döküldü.

2) *Resolving jel (alt jel) hazırlama:* Resolving jelin yüzdesi incelenecek proteinin ağırlığına (kDa) göre seçildi. BKNF'nin ağırlığı 14 kDa, dimer yapısı da 28 kDa olduğu için %12'lik jel hazırlandı. 36 kDa'luk GAPDH (Gliseraldehid 3-fosfat dehidrogenaz) için ise %10'luk jel hazırlandı. %10'luk alt jelin hazırlanması: 11,55 ml distile su + 7,5 ml alt jel hazırlama tamponu (resolving buffer) + 10,5 ml akrilamid:bisakrilamid+ 300 µl %10 APS + 300 µl %10 SDS + 30 µl TEMED 50 ml'lik plastik falkon tüp içinde karıştırıldı.

%12'lik alt jelin hazırlanması: 10,5 ml distile su + 7,5 ml alt jel hazırlama tamponu (resolving buffer) + 12 ml akrilamid:bisakrilamid+ 300 µl %10'luk APS + 300 µl %10 SDS + 30 µl TEMED 50 ml'lik plastik falkon tüp içinde karıştırıldı. TEMED katalizör görevi üstlendiği için en son katıldı ve karışım jelleşmeden sıvı hâldeyken hızlıca pipet yardımıyla camlar arasına döküldü. Üst yüzeyin düzgün olması için jelin üstüne %1 SDS döküldü. Jelin donması falkon tüp içinde arta kalan karışıma bakılarak takip edildi. Alt jel polimerize olduktan sonra cam yana yatırılarak %1 SDS peçeteye emdirildi.

3) *Stacking jelin (üst jel) hazırlanması*: 6 ml distile su + 2,5 ml üst jel hazırlama tamponu (stacking buffer) + 1,25 ml akrilamid:bisakrilamid + 100 µl %10 APS + 100 µl %10 SDS + 10 µl TEMED 15 ml'lik plastik falkon tüp içinde karıştırıldı. TEMED katalizör görevi üstlendiği için en son katıldı ve üst jel pipet yardımıyla alt jelin üstüne dökülerek 16 dişi bulunan tarak hava kabarcığı kalmayacak şekilde, üst jel sıvı hâldeyken camların arasına yerleştirildi. Üst jel polimerize olduktan sonra tarak dikkatlice çıkarıldı ve jelde 16 adet, örnek yüklenebilecek kuyucuklar elde edilmiş oldu.

4) *1X Running buffer (yürütme tamponu) hazırlanması*: 10X Running bufferdan 100 ml alınıp üzerine 900 ml distile su ilave edildi. Bu solüsyon yürütme tankına döküldü.

5) *Örneklerin hazırlanması*: Bütün işlemler buzda çalışıldı. Bir ependorf tüpüne örnekten 20 µl alınıp üzerine 10 µl loading dye (yükleme boyası) eklendi. Örnekler tek tek vortekslenip 30 sn 10000 rpm'de santrifüj yapıldı. Sonikasyon (hücreyi ya da kimyasal bileşiği, yüksek frekansta ses dalgaları etkisine bırakarak parçalama) işlemine tabi tutuldu. Sonikasyon sonrası ependorfun çeperine sıçrayanların dibe çökmesi için tekrar 30 sn 10000 rpm'de santrifüj yapıldı. 95°C'de ısıtıcıda 5 dakika bekletildi.

6) *Örneklerin jele yüklenmesi*: Yürütme tankının içine kuyucukları bulunan jel içeren 2 adet cam set ve running buffer koyuldu. İlk kuyucuklara belli kDa'larda belli renkler veren protein ladder (7µl) referans olarak yüklendi. Hazırlanan örnekler kuyucuklara kılcal pipet ucu yardımıyla yüklendi.

7) *Örneklerin yürütülmesi (run)*: Yürütme tankı buz dolu köpük kutunun içine konuldu. Western tankı güç kaynağına bağlandı. Örnekler stackingden resolvinge geçerken voltaj artırıldı. Stackingi geçene kadar 120V'da, stackingi geçince proteinler jelin sonuna kadar 130V'da yürütüldü. Örneklerdeki proteinler, elektirik akımı aracılığı ile moleküler ağırlığı büyük olanlar üstte, moleküler ağırlığı küçük olanlar ise altta kalacak şekilde jelin alt kısmına doğru yürütüldü. Örnekler jelin en alt kısmına gelince güç kaynağı kapatılarak yürütme işlemi durduruldu (Şekil 3.7).

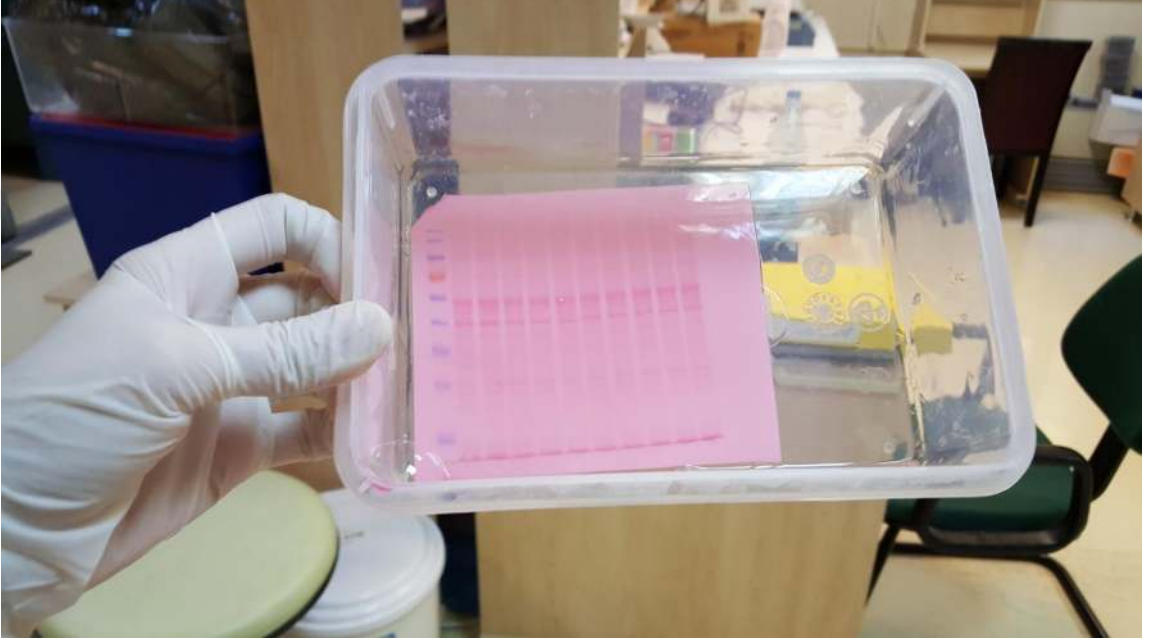


Şekil 3.7. Buz dolu köpük kutu içinde elektroforez basamağındaki yürütme tankı

8) *Transfer aşaması:* Camlar ayrılıp jeller çıkarıldı ve transfer tamponunda ıslatıldı. Jel boyutlarında kesilen PVDF (polivinilidin florür) membran metanolde 1 dakika ıslatıldı. Proteinlerin jelden membrana transferi işleminde kullanılacak olan süngerler ve sünger boyutunda kesilen whatman kağıdı transfer tamponunda ıslatıldı. Sırasıyla; siyah kapak-sünger- whatman kâğıdı (3 kat) – jel – membran - whatman kâğıdı- sünger – beyaz kapak olacak şekilde kaset içinde sandivic hazırlandı. Jel hariç her malzeme kasete koyulduktan sonra cam baget üzerinde gezdirerek jel ile membran arasında hava kabarcığı oluşması önleildi. Kaset adı verilen aparat transfer tankına yerleştirildi, tankın tamamı transfer tamponu ile dolduruldu. Tank güç kaynağına bağlandı. Buz dolu köpükten yapılmış kutu içerisinde gece boyu 30 V’da transfere bırakıldı.

9) *Membranın ve jelin boyanması:* Ertesi sabah transferi tamamlamak için güç kaynağı kapatıldı. Membran ve jel transfer işleminin düzgün gerçekleşip gerçekleşmediğini kontrol etmek için geçici olarak boyanıp boyası uzaklaştırıldı. Bu işlem için membran metanolde 1 dakika bekletildikten sonra metanol alınıp membranın üzerine pembe-kırmızı renkli ponceau (pons) solüsyonu döküldü. 3 dakika shakerda sallandırıldı. Jel ise Coomassie mavi solüsyonu ile 15 dakika shakerda sallandırıldı. Belirtilen sürelerin sonunda jel destain ile membran 1XTBS-Tween 20 ile yıkandı. Membran yıkanmadan

önce, jel ise destain ile yıkandıktan sonra protein bantları görünür hâle gelir. Böylece örneklerin eşit miktarda yüklenip yüklenmediği, yürütme ve transfer işlemi sırasında protein bantlarının dağılıp dağılmadığı gözlemsel olarak kontrol edildi (Şekil 3.8).



Şekil 3.8. Transfer işleminden sonra membranın pons ile boyanması

10) *Bloklama*: Membranın üzerinde protein bağlanmamış alanlara sonrasında ekleyeceğimiz antikor non-spesifik olarak bağlanmasın diye protein bağlanmamış alanları kaplaması için üzerine %5 bloklama solüsyonu döküldü. Oda sıcaklığında, shakerda 2 saat bu solüsyonda sallandırıldı.

11) *Primer antikor*: 15 ml'lik plastik falkon tüp içinde %1 BSA ile 1:1500 oranında anti-BKNF antikor hazırlandı. 8 ml %1 BSA'dan alıp 5,3 µl anti-BKNF eklendi. GAPDH için ise primer antikor 1:10000 oranında hazırlandı.

12) *Blotlama*: Bloklama işlemi bittikten sonra %5 bloklama solüsyonu uzaklaştırılıp primer antikorla işaretleme basamağına geçildi. Membran kendi boyutundan biraz büyük boyutlarda olacak şekilde 3 kenarından kesilen şeffaf poşet dosyanın arasına proteinin bağlandığı yüzeyi üste gelecek şekilde yerleştirildi. Poşet ağzı yapıştırma makinasında

poşet dosyanın diğer 2 kenarı sırasıyla yapıştırıldıktan sonra antikor solüsyonu açık kenardan membranın üzerine döküldü. En son kenar da poşet içerisinde kalan hava kabarcıkları antikor solüsyonunu dökmeden dikkatli bir şekilde çıkarıldıktan sonra yapıştırıldı. BKNF için membran, antikor solüsyonuyla birlikte +4°C'deki buzdolabında, nutating karıştırıcıda sallandırılarak gece boyu bekletildi. GAPDH için ise 1-2 saat oda sıcaklığında membran antikor solüsyonunda shakerda sallandırıldı.

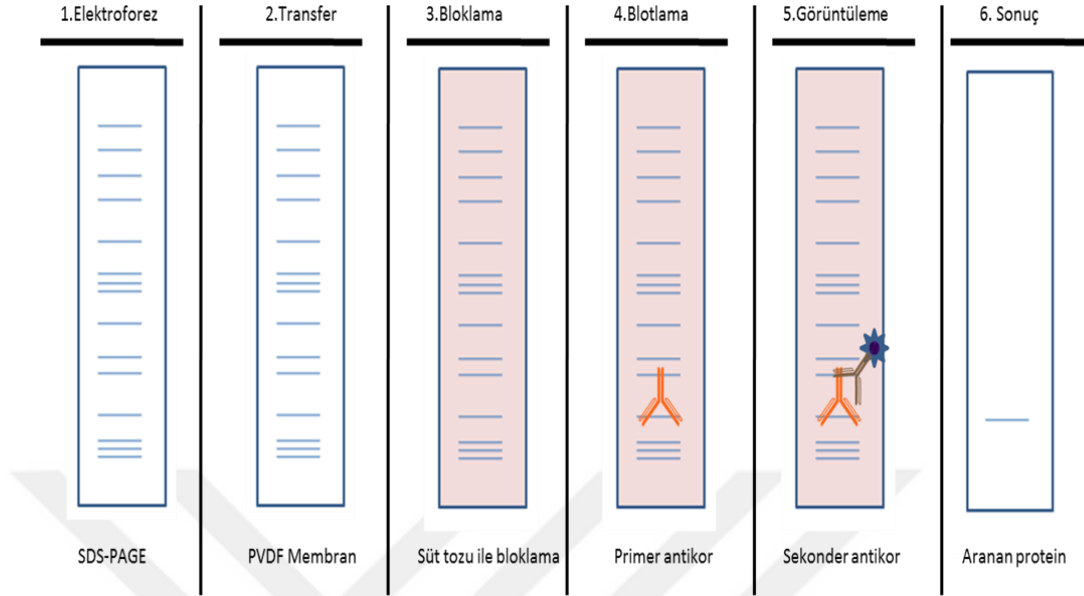
13) *Yıkama*: Antikor solüsyonu uzaklaştırılıp membran 3 kez 10'ar dakika 1XTBS-Tween20 ile yıkandı.

14) *Sekonder antikor*: Sekonder antikor primer antikorun kaynağına göre seçildi. Anti-BKNF Abcam (Ab6201) tavşan kaynaklı üretilmiştir. Bu sebeple sekonder olarak anti-tavşan antikor kullanıldı. %1BSA ile 1:2000 oranında anti-tavşan antikoru ile membran 2 saat oda sıcaklığında shakerda sallandırıldı. GAPDH için ise yıkama yapıldıktan sonra 1:5000 oranında anti-fare sekonder antikor ile membran 1-2 saat oda sıcaklığında shakerda sallandırıldı.

15) *Yıkama*: Sekonder antikor solüsyonu döküldükten sonra membran 3 kez 10'ar dakika 1XTBS-Tween20 ile yıkandı.

16) *Görüntüleme*: ECL için 1:1 oranında hidrojen peroksit ile luminol/güçlendirici ajan karıştırıldı. Membranın üzerine ECL dökülüp 3 dakika beklendi. Membranı X-ray film kaseti içine koyduktan sonra karanlık odada membranın üzerine medikal X-ray filmi konuldu ve ışımının yoğunluğuna göre bekletilip X-ray filmi görüntüleme cihazına gönderildi. Cihazdan çıkan film üzerinde aradığımız proteinin (BKNF) kDa'nunda görülen çizgiler yoğunluklarına göre kıyaslandı. Bu kıyaslama için housekeeping kontrol (bütün hücrelerde olduğu bilinen GAPDH, beta-aktin, tubulin gibi proteinler) olarak GAPDH kullanıldı.

Western blot yönteminin basamakları Şekil 3.9'da özetlenmiştir.



Şekil 3.9.Western blot yöntemi basamakları. (1) Proteinler, jel elektroforezi ile moleküler ağırlıklarına göre ayrılır. (2) Jeldeki ayrılma düzenini koruyacak şekilde proteinler PVDF membrana transfer edilir. (3) Membran üzerindeki protein içermeyen boş alanlar bloklama solüsyonu ile kaplanır. (4) Primer antikor aranan proteine bağlanır. (5) Sekonder antikor ise primer antikora bağlanır ve sekonder antikorun bağlanmayan ucundaki HRP enzimi ECL ile tepkimeye girerek ışımaya yapar. (6) X-ray filmi ile aranan proteinin yoğunluğuna göre çizgiler elde edilir (Gallagher ve Wiley, 2008).

3.6. Kullanılan Kimyasallar

Sarf Malzeme Adı	Katalog Numarası	Marka	Ülke
Akrilamid/bisakrilamid	BP1404-250	Fisher	ABD
Anti-BKNE antikor	ab6201	Abcam	İngiltere
Anti-GAPDH antikor	H86045M	Meridian	ABD
APS (Amonyumpersülfat)	401165000	Acros	ABD
Bradford protein assay kit	5000201	Biorad	ABD
Bromofenol mavisi	B-092-25	Goldbio	ABD

BSA (Sığır Serum Albumini)	A-420-10	Goldbio	ABD
Commassive mavi	1154440025	Merck	Almanya
ECL	170-5061	Biorad	ABD
Ellagik asit	A15722	Alfa Aesar	Almanya
Gliserol	BP229-1	Fisher Bio	ABD
Glisin	G-630-500	Goldbio	ABD
Membran (PVDF, 0.2µm)	ISEQ00010	Millipore	ABD
Metanol	1060082500	Merck	Almanya
NaCl (Sodyum klorür)	1064041000	Merck	Almanya
Önceden boyanmış protein marker	26619	Pierce	ABD
Ponceau	161470250	Acros	ABD
Proteaz inhibitör kokteyli	11 836 145 001	Roche	İsviçre
SDS (Sodyum Dodesil Sülfat)	A7279-1000	Applichem	Almanya
Sekonder Antikor Anti-Mouse	sc-2005	Santa Cruz	ABD
Sekonder Antikor Anti-Rabbit	sc-2004	Santa Cruz	ABD
Sertralin	S0507	Tci America	ABD
Süt tozu		Nestle	Türkiye
TEMED (Tetrametiletilendiamin)	1107320100	Merck	Almanya

Trisbase	BP152-1	Fisher Scientific	ABD
Tween 20	8221840500	Merck	Almanya
2-merkaptotanol	8057400250	Merck	Almanya

3.7. Kullanılan Malzemeler

Demirbaş / Sarf Malzeme Adı	Katalog Numarası	Marka	Ülke
Açık alan testi düzeneği		Commat	Türkiye
Buz makinesi	AF100	Scotsman	ABD
Cam baget	1547	EGAŞ	Türkiye
Cam plate	SE6102	GeHealthcare	İngiltere
Çeker ocak		Heraeus	Almanya
Tek kullanımlık pipet 25 ml	CLS4489	Sigma-Aldrich	ABD
Tek kullanımlık pipet 10 ml	CLS4488	Sigma-Aldrich	ABD
Tek kullanımlık pipet 5 ml	CLS4487	Sigma-Aldrich	ABD
Tek kullanımlık pipet 2 ml	CLS4486	Sigma-Aldrich	ABD
Tek kullanımlık pipet 1 ml	CLS4485	Sigma-Aldrich	ABD
Distile su cihazı	TANKMPK01	Millipore	ABD
Elektronik terazi	AW120	Shimadzu	Japonya
Güç kaynağı	4006038	Biorad	ABD

Isıtıcılı manyetik karıştırıcı	MSH-20A	Witeg	Almanya
Jele örnek yüklemesi için kılcal pipet ucu	MN520R-LRS	Therapak	ABD
Kapaklı enderford tüpü 1,5 ml	14-222-156	Fisher Scientific	ABD
Konik polipropilen santrifüj tüpü 15 ml	339650	ThermaScientific	ABD
Kuru blok ısıtıcı	BioTDB-100	Biosan	Letonya
Manyetik balık		Balmumcu kimya	Türkiye
Medikal film işlemcisi	SRX-101A	Konica Minolta	Japonya
Medikal X-ray film		Kodak	ABD
Metal spatula	1561	EGAŞ	Türkiye
Mikrofüj	16	Beckman Coulter	ABD
Mikroplate spektrofotometre	51119300	ThermoFisher	ABD
Mini saklama kabı		Üçsan Plastik	Türkiye
Neo-frost buzdolabı	B19540NM	Beko	Türkiye
Noldus Ethovision		Commat	Türkiye
Nutating karıştırıcı	83007-210	VWR	ABD
pH-metre	CG840	Schott	Almanya

Pipet tabancası (Macroman)	F110751	Gilson	ABD
Pipet ucu 100-1000 µl	CLS4868	Sigma-Aldrich	ABD
Pipet ucu 200 µl	T-200-Y	Axygen	ABD
Polipropilen 250 ml mezür		Isolab	Almanya
Polipropilen 3000 ml kulplu beher		Isolab	Almanya
Polistiren santrifüj tüpü 50 ml (falkon tüp)	352073	Biostad	Kanada
Poşet ağzı yapıştırma makinesi	401HM	Polystar	Almanya
Şeffaf poşet dosya		Noki	Türkiye
Tahterevalli rocker (sallama düzeni)	SSL4	Stuart	İngiltere
Tek kanallı ayarlanabilir pipetör (2-20 µl, 20-200 µl, 100-1000 µl) + 3 pipet ucu kutusu	Z683892-1EA	Sigma-Aldrich	ABD
Transfer cihazı		Amersham	İngiltere
X-ray film kaseti	FBXC810	Fisher Biotech	ABD
Vertikal yürütme tankı	SE600	GeHealthcare	İngiltere
Vorteks	F202A0173	Velp Scientifica	İtalya

Zorlu yüzme testi düzeneği		Commat	Türkiye
-50°C ile -86°C arasında sıcaklığa sahip dikey derin dondurucu	11700370	ThermoFisher	ABD
96 yuvalı plate	CLS3300-50EA	Sigma-Aldrich	ABD

3.8. İstatistiksel Analiz

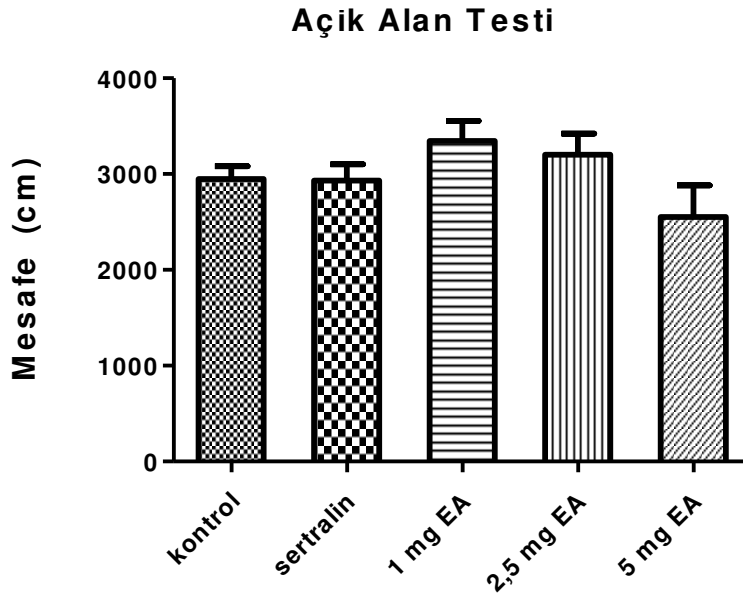
Sonuçların istatistiksel analizi Graph-Pad bilgisayar programında student t-testi kullanılarak yapıldı. p değerleri 0,05'in altında bulunan değerler anlamlı kabul edildi. Tüm değerler ortalama $\pm$ standart hata olarak ifade edildi.

4. BULGULAR

Çalışmada başlangıçta ve 14 gün tedavi edildikten sonra gruplar arasında hayvanların ağırlıklarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı. Aynı şekilde gruplar arasında gözlemsel olarak herhangi bir anksiyete belirtisi (idrar ve defekasyon sayıları açısından) gözlemlenmemiştir.

4.1. Açık Alan Testi (Lokomotor Aktivite) Sonuçları

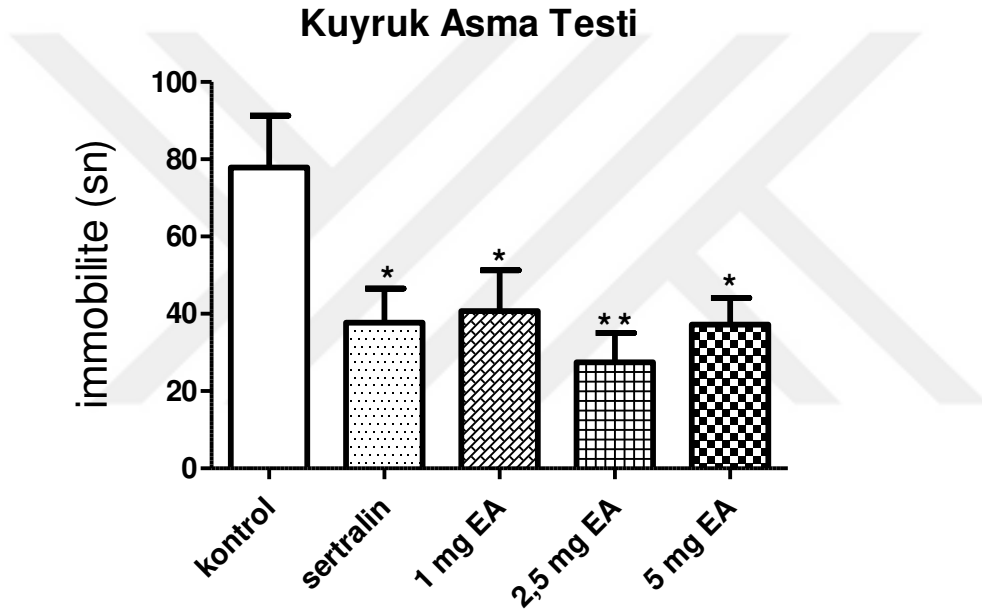
EA'nın farelerin motor fonksiyonlarını değiştirerek KAT ve ZYT sonuçlarını etkileyip etkilemediğini araştırmak amacıyla açık alan testi gerçekleştirildi. EA (1, 2.5 ve 5 mg/kg) ve sertralin (5 mg/kg) grubu kontrol grubuyla karşılaştırıldığında motor fonksiyonları test etmek amacıyla yapılan açık alan testinde motor hareketlilik açısından istatistiksel olarak herhangi bir fark görülmemiştir (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. Ellagik asit ve sertralin tedavisinin açık alan testindeki etkileri

4.2. Kuyruk Asma Testi Sonuçları

Antidepresan etkinin bir belirtisi olarak KAT’de hayvanların hareketsiz kalma süreleri (immobilite) açısından değerlendirildiğinde kontrol grubuna göre EA (1, 2.5ve 5 mg/kg) ve sertralin (5 mg/kg) tedavisiyle istatistiksel olarak anlamlı bir azalma olduğu görülmüştür ($p<0,05$). Bu azalmanın en belirgin olarak 2,5 mg doz EA’da olduğu saptanmıştır ($p<0,001$) (Şekil 4.2).

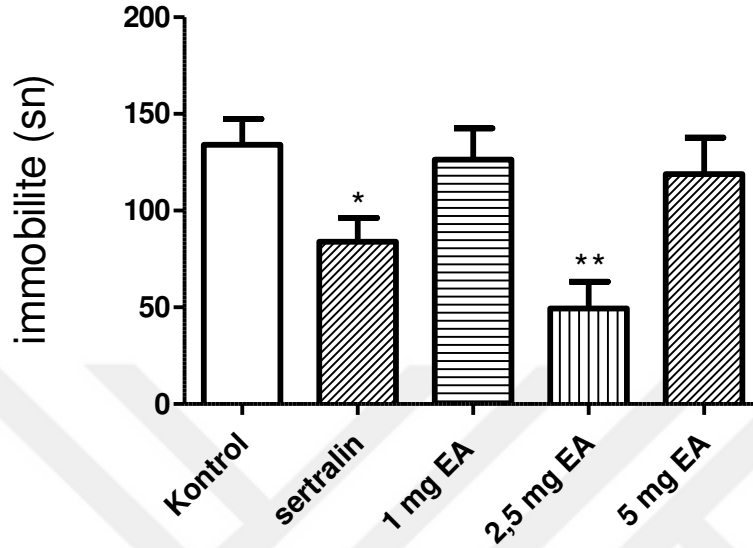


Şekil 4.2. Ellagik asit ve sertralin tedavisinin kuyruk asma testindeki etkileri. * $p<0,05$ (kontrol grubu ile karşılaştırıldığında). ** $p<0,001$ (kontrol grubu ile karşılaştırıldığında).

4.3. Zorlu Yüzme Testi Sonuçları

ZYT’de kontrol grubu ile sertralin (5 mg/kg) grubu arasında hayvanların hareketsiz kalma süreleri açısından değerlendirildiğinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu görülmüştür ($p<0,05$). EA’nın 1 mg/kg ve 5 mg/kg dozlarında kontrol grubu ile karşılaştırıldığında hareketsiz kalma süreleri açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı görülmüştür. Ancak 2,5 mg/kg EA kullanıldığında kontrol grubu ile karşılaştırıldığında sertralin grubundan daha belirgin olmak üzere istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu görülmüştür ($p<0,001$) (Şekil 4.3).

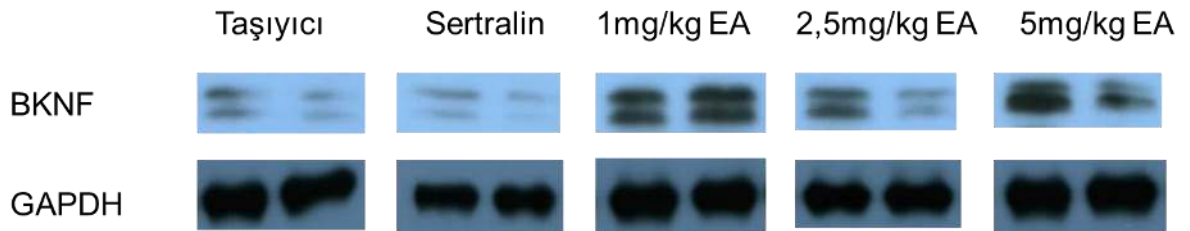
Zorlu Yüzme Testi



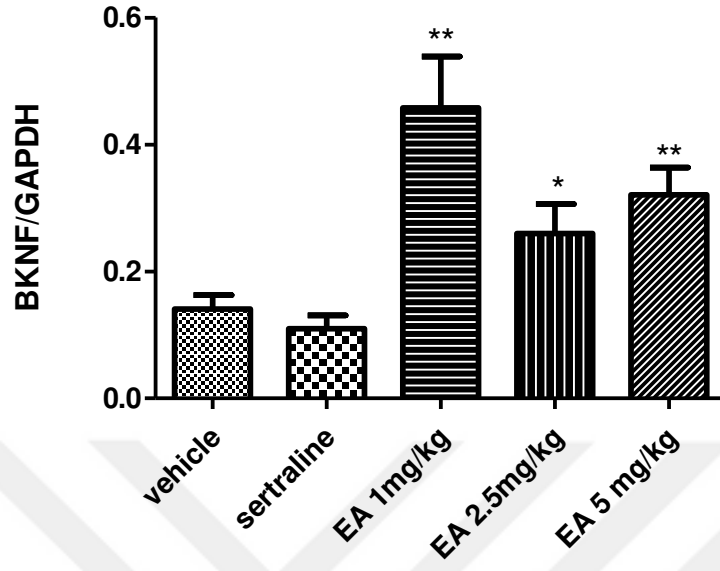
Şekil 4.3. Ellagik asit ve sertralin tedavisinin zorlu yüzme testindeki etkileri. * $p < 0,05$ (kontrol grubu ile karşılaştırıldığında). ** $p < 0,001$ (kontrol grubu ile karşılaştırıldığında).

4.4. Western Blot Sonuçları

EA'nın tüm dozlarında kontrol grubu ile karşılaştırıldığında hipokampus BDNF protein düzeylerinde belirgin bir artma olduğu görülmüştür (Şekil 4.4). Hipokampus BDNF düzeyleri GAPDH ile oranlanıp protein analizleri karşılaştırıldığında ise sertralin grubunda istatistiksel olarak anlamlı bir artış olmadığı ancak EA grubunda belirgin bir artış olduğu saptanmıştır (Şekil 4.5).



Şekil 4.4. Fare hipokampus dokusunda BDNF ekspresyonunun western blot yöntemi ile gösterilmesi. Her bir gruptan ikişer örnek gösterilmiştir. BDNF ekspresyonları kontrol proteini olan GAPDH ile kıyaslanmıştır.



Şekil 4.5.Ellagik asit ve sertralin tedavisinin erkek balb/c fare hipokampusunda BDNF düzeylerine etkisi (* $p<0.05$, ** $p<0.01$).

5. TARTIŞMA

Depresyon dünyada oldukça sık görülen tıbbi sorunlardan biridir. Depresyon tedavisinde kullanılan önemli ilaçlar olmasına karşın yeni ilaçlar elde etmek amacıyla araştırmalar devam etmektedir. Aynı şekilde depresyon tedavisinde doğal ürünlerin kullanılmasına odaklanan araştırmaların sayısı artmaktadır (Williams *ve ark.*, 2004). EA polifenolik yapıda bir bileşik olarak *in vivo* ve *in vitro* çalışmalarda antiinflamatuvar (Park *ve ark.*, 2016)(Rosillo *ve ark.*, 2012), antidiyabetik (Fatima *ve ark.*, 2015), antioksidan (Özkaya *ve ark.*, 2010; Priyadarsini *ve ark.*, 2002), antikanserojen (Wang *ve ark.*, 2016) etkilere sahip olduğu gösterilmiştir. Aynı şekilde EA'nın santral sinir sisteminde nöroprotektif etkilere sahip olduğuna dair çalışmalar da mevcuttur (Pavlica ve Gebhardt, 2005). Bu çalışmada fare depresyon modellerinde EA'nın antidepresan-benzeri etkiye sahip olduğu ve bu etkiye hipokampal BKNF düzeylerindeki artışın eşlik ettiği bulunmuştur.

Östrojenler klasik antidepresan ilaçların etkilerini potansiyelize edebilir (Bernardi *ve ark.*, 1989). Bu nedenle çalışmamızda erkek fareler kullanılmıştır. ZYT'de seksüel farklılığın antidepresan-benzeri etkileri değiştirebileceği gösterilmiştir (Slattery ve Cryan, 2012). KAT'de ise seksüel farklılığın etkileri çok iyi çalışılmamasına karşın yine de biz çalışmamızda erkek fareleri tercih ettik. Bununla birlikte sirkadiyen ritim hayvansal depresyon modellerinde antidepresan etkinliği değiştirebilir (Easton *ve ark.*, 2003). Bu amaçla çalışmamızda deneyler her hayvana saat 9-15 arasında uygulanacak şekilde yapıldı. Ayrıca EA oral yolla kullanıma uygun olmakla birlikte biyoyararlanımında değişiklikler ve zorluklar söz konusu olabilir (Lei *ve ark.*, 2003). Bu nedenden dolayı biz EA'yı intraperitonel yolla uygulamayı tercih ettik.

ZYT ve KAT gibi depresyon modelleri yeni antidepresan ilaçların araştırılmasında sıklıkla başvurulan deneysel modellerdir. Klasik antidepresan ilaçların ZYT ve KAT deneylerinde hayvanların hareketsiz kalma süresini azalttığı bilinmektedir. Bu nedenle bu çalışmada EA'nın antidepresan-benzeri etkisini araştırmak amacıyla bu hayvan modelleri kullanılmıştır. Bu konuda son zamanlarda Girish ve arkadaşları EA'nın ZYT'de antidepresan-benzeri etki gösterdiğini ve bu etkinin serotonerjik ve

noradrenerjik sistemle ilişkili olduğunu saptamışlardır (Girish ve ark., 2012). Bizim çalışmamızda da 2.5 mg/kg dozunda EA verildiğinde istatistiksel olarak anlamlı antidepresan-benzeri aktivite saptanmıştır. Ancak bu antidepresan-benzeri aktivitenin doz bağımlı olmadığı görülmüştür. EA'nın düşük ve yüksek dozunda (1 ve 5 mg/kg) antidepresan-benzeri etki görülmemiştir ve U şeklinde doz-yanıt eğrisi elde edilmiştir. Literatürü incelediğimizde bazı çalışmalarda antidepresan etkili bileşiklerin benzer şekilde U şeklinde bir doz-yanıt eğrisi oluşturdıkları saptanmıştır (Nakazawa ve ark., 2003; Posser ve ark., 2009). Girish ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada EA'nın antidepresan-benzeri etkisinin 25-50-100 mg/kg dozlarda ve oral olarak verilmesiyle; Dhingra ve arkadaşlarının çalışmasında da 8,75-17,5-35 mg/kg dozda ve oral olarak verilmesiyle elde edildiği görülmüştür. Bizim çalışmamızda ise EA farklı olarak 1-2,5-5 mg/kg dozlarında intraperitonel olarak kullanılmıştır. ZYT'de bazı ilaçlarla yapılan çalışmalarda yanlış negatif ve yanlış pozitif sonuçlar elde etmek söz konusu olabilir. SSRI tedavileri ile hayvanların yüzme davranışlarında bir artış söz konusu olabilir bu da yanlış negatif sonuçlar oluşturabilir. Bu nedenle çalışmamızda suyun miktarını ayarlamak amacıyla 20 cm'lik bir derinlik oluşturulmuştur (Detke ve ark., 1995). İkinci olarak bazı santral sinir sisteminde etkili ilaçlar ZYT'de yanlış pozitif sonuçlar verebilir (Bourin ve ark., 2001). Bu amaçla lokomotor aktivite testi yapılarak yanlış pozitif sonucun önüne geçilmesi amaçlanmaktadır. Locomotor aktiviteyi arttıran veya azaltan bir ilaç zorlu yüzme testi sonuçlarını etkileyebilir. Biz de çalışmamızda EA'nın lokomotor aktivite üzerine etkilerini açık alan testi ile araştırdık. ZYT'de elde edilen imobilite süresindeki azalmanın motor aktivitenin değişmesiyle ilişkili olmadığı saptanmıştır.

KAT aynı şekilde fare modellerinde antidepresan etkinin araştırılmasında sıklıkla kullanılan bir modeldir. Antidepresan-benzeri etkinin araştırıldığı ilaçlar için oldukça spesifik yanıtlar ortaya koyduğu gösterilmiştir (Cryan ve ark., 2005). Çalışmamızda KAT'de EA'nın hareketsiz kalma süresini bütün dozlarında (1-2,5-5 mg/kg) azalttığı bulunmuştur. Elde edilen bu bulgular Girish ve arkadaşları ve Dhingra ve arkadaşlarının yaptığı çalışmalarla uyumlu bulunmuştur. Bu çalışmalarla uyumlu olarak KAT'de EA'nın her 3 dozunda da antidepresan-benzeri etkinlik saptanmıştır.

BKNF nöronal olgunlaşma, sinaps oluşumu ve plastisitede rol oynayan, iyi bilinen nörotrofinlerden biridir (Park ve Poo, 2013). BKNF özellikle depresyonu yakından ilgilendiren hipokampal sinaptik plastisitede önemli rol oynamaktadır (Waterhouse ve Xu, 2009). Son zamanlarda BKNF'nin antidepresan etki için gerekli olduğu ve antidepresan yanıtlara aracılık etmede hipokampustaki BKNF'nin güçlü bir rol oynadığını gösteren çalışmalar vardır. Örneğin ketaminin antidepresan etkisinde BKNF-Trk B sinyal yolağının rol oynadığına dair güçlü kanıtlar mevcuttur (Garcia ve ark., 2008). Bu nedenden dolayı biz de çalışmamızda EA'nın antidepresan-benzeri etkisinde BKNF'nin ilişkisini araştırmayı amaçladık ve 14 gün EA tedavisinin bütün dozlarında fare hipokampal BKNF protein düzeyinin arttığını saptadık. Bu çalışmanın sonuçlarından EA'nın antidepresan etkisinin en azından bir kısmının BKNF protein düzeyindeki artışa bağlı olduğu kanısına varılmıştır.

Sonuç olarak; çalışmamızda 14 günlük EA tedavisinin fare ZYT ve KAT'de antidepresan-benzeri etkiler oluşturduğu ve bu etkinin lokomotor aktivite değişikliklerine bağlı olmadığı gösterilmiştir. Bununla birlikte, EA ile oluşan antidepresan-benzeri etkinin fare hipokampal BKNF düzeylerindeki artışla ilişkili olduğu görülmüştür. Bundan sonraki çalışmalarda BKNF artışı ile antidepresan etki arasında rol oynayabilecek reseptörler veya hücre içi yolakların rollerinin araştırılmasına ihtiyaç duyulmaktadır.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

EA, üzerinde oldukça yoğun çalışmaların yapıldığı polifenolik bir bileşiktir ve EA'nın vücutta önemli etkileri olduğu gösterilmiştir. Biz de daha öncesinde EA'nın damar gevşetici etkilerini çalışmıştık (Yılmaz ve Usta, 2013). Ayrıca EA ile ilişkili bir derleme yayımlamıştık (Usta ve ark., 2013). Son zamanlarda ise EA'nın santral sinir sistemindeki etkileri üzerine çalışmalar yoğunlaşmıştır. Bu nedenle biz de bu tezde fare depresyon modellerinde EA'nın antidepresan-benzeri etkilerini gösterdik. Ortaya çıkan bu etkinin depresyonda önemli bir nörotrofik molekül olan ve ruhsal hastalıklarla ilişkisi çalışılan BDNF ile ilişkisini ortaya koyduk. Bundan sonraki çalışmalarda EA'nın BDNF düzeylerini nasıl artırdığının hücresel etki mekanizmasının araştırılması hedeflenmektedir.

KAYNAKLAR

Aguilera-Carbo A, Garcia-Agustince C, Belmares R, Aguilar C. Inhibitory Effect of ellagic acid from pomegranate husk (*Punica granatum*) and (*Larrea tridentata*) on different foodborn pathogens. In Proceeding of the International Congress on Food Safety, 2005.

Ahad A, Ganai AA, Mujeeb M, Siddiqui WA. Ellagic acid, an NF-kappaB inhibitor, ameliorates renal function in experimental diabetic nephropathy. *Chem Biol Interact.* 2014; 219: 64-75.

Aid T, Kazantseva A, Piirsoo M, Palm K, Timmusk T. Mouse and rat BDNF gene structure and expression revisited. *J Neurosci Res.* 2007; 85: 525-535.

Altar CA, Laeng P, Jurata LW, Brockman JA, Lemire A, Bullard J, Bukhman YV, Young TA, Charles V, Palfreyman MG. Electroconvulsive seizures regulate gene expression of distinct neurotrophic signaling pathways. *J Neurosci.* 2004; 24: 2667-2677.

Altar CA, Whitehead RE, Chen R, Wortwein G, Madsen TM. Effects of electroconvulsive seizures and antidepressant drugs on brain-derived neurotrophic factor protein in rat brain. *Biol Psychiatry.* 2003; 54: 703-709.

Angelucci F, Aloe L, Jimenez-Vasquez P, Mathe AA. Electroconvulsive stimuli alter the regional concentrations of nerve growth factor, brain-derived neurotrophic factor, and glial cell line-derived neurotrophic factor in adult rat brain. *J ECT.* 2002; 18: 138-143.

Association D-AP. Diagnostic and statistical manual of mental disorders. Arlington: American Psychiatric Publishing. 2013.

Balu DT, Hoshaw BA, Malberg JE, Rosenzweig-Lipson S, Schechter LE, Lucki I. Differential regulation of central BDNF protein levels by antidepressant and non-antidepressant drug treatments. *Brain Res.* 2008; 1211: 37-43.

Barde YA, Edgar D, Thoenen H. Purification of a new neurotrophic factor from mammalian brain. *EMBO J.* 1982; 1: 549-553.

Barden N. Implication of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the pathophysiology of depression. *J Psychiatry Neurosci.* 2004; 29: 185-193.

Bayer TA, Schramm M, Feldmann N, Knable MB, Falkai P. Antidepressant drug exposure is associated with mRNA levels of tyrosine receptor kinase B in major depressive disorder. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2000; 24: 881-888.

Beretta G, Rossoni G, Santagati NA, Facino RM. Anti-ischemic activity and endothelium-dependent vasorelaxant effect of hydrolysable tannins from the leaves of *Rhus coriaria* (Sumac) in isolated rabbit heart and thoracic aorta. *Planta Med.* 2009; 75: 1482-1488.

Bernardi M, Vergoni AV, Sandrini M, Tagliavini S, Bertolini A. Influence of ovariectomy, estradiol and progesterone on the behavior of mice in an experimental model of depression. *Physiol Behav.* 1989; 45: 1067-1068.

Bhargava UC, Westfall BA. The mechanism of blood pressure depression by ellagic acid. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1969; 132: 754-756.

Bibel M, Barde YA. Neurotrophins: key regulators of cell fate and cell shape in the vertebrate nervous system. *Genes Dev.* 2000; 14: 2919-2937.

Bisen PS, Bundela SS, Sharma A. Ellagic Acid Chemopreventive Role in Oral Cancer. *Journal of Cancer Science & Therapy* 2012.

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

Bothwell MA, Shooter EM. Dissociation equilibrium constant of beta nerve growth factor. *J Biol Chem*. 1977; 252: 8532-8536.

Botti RE, Ratnoff OD. Studies on the Pathogenesis of Thrombosis: An Experimental "Hypercoagulable" State Induced by the Intravenous Injection of Ellagic Acid. *J Lab Clin Med*. 1964; 64: 385-398.

Bourin M, Fiocco AJ, Clenet F. How valuable are animal models in defining antidepressant activity? *Hum Psychopharmacol*. 2001; 16: 9-21.

Bradley RG, Binder EB, Epstein MP, Tang Y, Nair HP, Liu W, Gillespie CF, Berg T, Evces M, Newport DJ, Stowe ZN, Heim CM, Nemeroff CB, Schwartz A, Cubells JF, Ressler KJ. Influence of child abuse on adult depression: moderation by the corticotropin-releasing hormone receptor gene. *Arch Gen Psychiatry*. 2008; 65: 190-200.

Campbell S, Marriott M, Nahmias C, MacQueen GM. Lower hippocampal volume in patients suffering from depression: a meta-analysis. *Am J Psychiatry*. 2004 161: 598-607.

Cannon TD, Yolken R, Buka S, Torrey EF, Collaborative Study Group on the Perinatal Origins of Severe Psychiatric D. Decreased neurotrophic response to birth hypoxia in the etiology of schizophrenia. *Biol Psychiatry*. 2008; 64: 797-802.

Castren E. Is mood chemistry? *Nat Rev Neurosci*. 2005; 6: 241-246.

Castren E, Rantamaki T. The role of BDNF and its receptors in depression and antidepressant drug action: Reactivation of developmental plasticity. *Dev Neurobiol*. 2010; 70: 289-97.

Cerda B, Ceron JJ, Tomas-Barberan FA, Espin JC. Repeated oral administration of high doses of the pomegranate ellagitannin punicalagin to rats for 37 days is not toxic. *J Agric Food Chem.* 2003a; 51: 3493-501.

Cerda B, Espin JC, Parra S, Martinez P, Tomas-Barberan FA. The potent in vitro antioxidant ellagitannins from pomegranate juice are metabolised into bioavailable but poor antioxidant hydroxy-6H-dibenzopyran-6-one derivatives by the colonic microflora of healthy humans. *Eur J Nutr.* 2004; 43: 205-220.

Cerda B, Llorach R, Ceron JJ, Espin JC, Tomas-Barberan FA. Evaluation of the bioavailability and metabolism in the rat of punicalagin, an antioxidant polyphenol from pomegranate juice. *Eur J Nutr.* 2003b; 42: 18-28.

Cerda B, Tomas-Barberan FA, Espin JC. Metabolism of antioxidant and chemopreventive ellagitannins from strawberries, raspberries, walnuts, and oak-aged wine in humans: identification of biomarkers and individual variability. *J Agric Food Chem.* 2005; 53: 227-235.

Chao MV. Neurotrophins and their receptors: a convergence point for many signalling pathways. *Nat Rev Neurosci.* 2003; 4: 299-309.

Chen B, Dowlathshahi D, MacQueen GM, Wang JF, Young LT. Increased hippocampal BDNF immunoreactivity in subjects treated with antidepressant medication. *Biol Psychiatry.* 2001; 50: 260-265.

Chin YW, Balunas MJ, Chai HB, Kinghorn AD. Drug discovery from natural sources. *AAPS J.* 2006; 8: E239-253.

Cohen S, Levi-Montalcini R, Hamburger V. A Nerve Growth-Stimulating Factor Isolated from Sarcom as 37 and 180. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1954; 40: 1014-1018.

Conner JM, Lauterborn JC, Yan Q, Gall CM, Varon S. Distribution of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) protein and mRNA in the normal adult rat CNS: evidence for anterograde axonal transport. *J Neurosci*. 1997; 17: 2295-2313.

Coppell AL, Pei Q, Zetterstrom TS. Bi-phasic change in BDNF gene expression following antidepressant drug treatment. *Neuropharmacology*. 2003; 44: 903-910.

Cryan JF, Mombereau C, Vassout A. The tail suspension test as a model for assessing antidepressant activity: review of pharmacological and genetic studies in mice. *Neurosci Biobehav Rev*. 2005; 29: 571-625.

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

Czeh B, Lucassen PJ. What causes the hippocampal volume decrease in depression? Are neurogenesis, glial changes and apoptosis implicated? *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci*. 2007; 257: 250-260.

Danese A, Moffitt TE, Harrington H, Milne BJ, Polanczyk G, Pariante CM, Poulton R, Caspi A. Adverse childhood experiences and adult risk factors for age-related disease: depression, inflammation, and clustering of metabolic risk markers. *Arch Pediatr Adolesc Med*. 2009; 163: 1135-1143.

De Foubert G, Carney SL, Robinson CS, Destexhe EJ, Tomlinson R, Hicks CA, Murray TK, Gaillard JP, Deville C, Xhenseval V, Thomas CE, O'Neill MJ, Zetterstrom TS. Fluoxetine-induced change in rat brain expression of brain-derived neurotrophic factor varies depending on length of treatment. *Neuroscience*. 2004; 128: 597-604.

Detke MJ, Rickels M, Lucki I. Active behaviors in the rat forced swimming test differentially produced by serotonergic and noradrenergic antidepressants. *Psychopharmacology (Berl)*. 1995; 121: 66-72.

Dhingra D, Chhillar R. Antidepressant-like activity of ellagic acid in unstressed and acute immobilization-induced stressed mice. *Pharmacol Rep.* 2012; 64: 796-807.

Doyle B, Griffiths LA . The metabolism of ellagic acid in the rat. *Xenobiotica.* 1980; 10: 247-256.

Duman RS. Pathophysiology of depression: the concept of synaptic plasticity. *Eur Psychiatry.* 2002; 17: 306-310.

Duman RS, Heninger GR, Nestler EJ. A molecular and cellular theory of depression. *Arch Gen Psychiatry.* 1997; 54: 597-606.

Dwivedi Y, Rizavi HS, Conley RR, Roberts RC, Tamminga CA, Pandey GN. Altered gene expression of brain-derived neurotrophic factor and receptor tyrosine kinase B in postmortem brain of suicide subjects. *Arch Gen Psychiatry.* 2003; 60: 804-815.

Easton A, Arbuzova J, Turek FW. The circadian Clock mutation increases exploratory activity and escape-seeking behavior. *Genes Brain Behav.* 2003; 2: 11-19.

Edelmann E, Lessmann V, Brigadski T. Pre- and postsynaptic twists in BDNF secretion and action in synaptic plasticity. *Neuropharmacology.* 2014; 76: 610-627.

Eisch AJ, Petrik D. Depression and hippocampal neurogenesis: a road to remission? *Science.* 2012; 338: 72-75.

El-Garhy AM, Abd El-Raouf OM, El-Sayeh BM, Fawzy HM, Abdallah DM. Ellagic acid antiinflammatory and antiapoptotic potential mediate renoprotection in cisplatin nephrotoxic rats. *J Biochem Mol Toxicol.* 2014; 28: 472-479.

Ernfors P, Wetmore C, Olson L, Persson H. Identification of cells in rat brain and peripheral tissues expressing mRNA for members of the nerve growth factor family. *Neuron*. 1990; 5: 511-526.

Farnsworth NR, Akerele O, Bingel AS, Soejarto DD, Guo Z. Medicinal plants in therapy. *Bull World Health Organ*. 1985; 63: 965-981.

Fatima N, Hafizur RM, Hameed A, Ahmed S, Nisar M, Kabir N. Ellagic acid in *Emblica officinalis* exerts anti-diabetic activity through the action on beta-cells of pancreas. *Eur J Nutr*. 2015.

Feldman KS, Sahasrabudhe K, Smith RS, Scheuchenzuber WJ. Immunostimulation by plant polyphenols: a relationship between tumor necrosis factor- α production and tannin structure. *Bioorg Med Chem Lett*. 1999; 9: 985-990.

Ferreres F, Grosso C, Gil-Izquierdo A, Valentao P, Andrade PB. Ellagic acid and derivatives from *Cochlospermum angolensis* Welw. Extracts: HPLC-DAD-ESI/MS(n) profiling, quantification and in vitro anti-depressant, anti-cholinesterase and anti-oxidant activities. *Phytochem Anal*. 2013; 24: 534-540.

Gallagher SR, Wiley EA. *Current protocols essential laboratory techniques*. Wiley Hoboken, 2008.

Garcia LS, Comim CM, Valvassori SS, Reus GZ, Barbosa LM, Andreazza AC, Stertz L, Fries GR, Gavioli EC, Kapczinski F, Quevedo J. Acute administration of ketamine induces antidepressant-like effects in the forced swimming test and increases BDNF levels in the rat hippocampus. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2008; 32: 140-144.

Geral C, Angelova A, Lesieur S. From molecular to nanotechnology strategies for delivery of neurotrophins: emphasis on brain-derived neurotrophic factor (BDNF). *Pharmaceutics*. 2013; 5: 127-167.

Ghosh A, Carnahan J, Greenberg ME. Requirement for BDNF in activity-dependent survival of cortical neurons. *Science*. 1994; 263: 1618-1623.

Ghosh A, Greenberg ME. Distinct roles for bFGF and NT-3 in the regulation of cortical neurogenesis. *Neuron*. 1995; 15: 89-103.

Girish C, Raj V, Arya J, Balakrishnan S. Evidence for the involvement of the monoaminergic system, but not the opioid system in the antidepressant-like activity of ellagic acid in mice. *Eur J Pharmacol*. 2012; 682: 118-125.

Gonul AS, Akdeniz F, Taneli F, Donat O, Eker C, Vahip S. Effect of treatment on serum brain-derived neurotrophic factor levels in depressed patients. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci*. 2005; 255: 381-386.

Grasser G, Enna FGA. Synthetic tannins, their synthesis, industrial production and application. 1922.

Guilloux JP, Douillard-Guilloux G, Kota R, Wang X, Gardier AM, Martinowich K, Tseng GC, Lewis DA, Sibille E. Molecular evidence for BDNF- and GABA-related dysfunctions in the amygdala of female subjects with major depression. *Mol Psychiatry*. 2012; 17: 1130-1142.

Heber D. Multitargeted therapy of cancer by ellagitannins. *Cancer Lett*. 2008; 269: 262-268.

Hofer M, Pagliusi SR, Hohn A, Leibrock J, Barde YA. Regional distribution of brain-derived neurotrophic factor mRNA in the adult mouse brain. *EMBO J.* 1990; 9: 2459-2464.

Hyman SE. Revitalizing psychiatric therapeutics. *Neuropsychopharmacology.* 2014; 39: 220-229.

Ip NY, Ibanez CF, Nye SH, McClain J, Jones PF, Gies DR, Belluscio L, Le Beau MM, Espinosa R, 3rd, Squinto SP, et al. Mammalian neurotrophin-4: structure, chromosomal localization, tissue distribution, and receptor specificity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992; 89: 3060-3064.

Kaneto H, Katakami N, Matsuhisa M, Matsuoka TA. Role of reactive oxygen species in the progression of type 2 diabetes and atherosclerosis. *Mediators Inflamm* 2010: 453892.

Karege F, Perret G, Bondolfi G, Schwald M, Bertschy G, Aubry JM. Decreased serum brain-derived neurotrophic factor levels in major depressed patients. *Psychiatry Res.* 2002; 109: 143-148.

Karege F, Vaudan G, Schwald M, Perroud N, La Harpe R. Neurotrophin levels in postmortem brains of suicide victims and the effects of antemortem diagnosis and psychotropic drugs. *Brain Res Mol Brain Res.* 2005; 136: 29-37.

Kato-Semba R, Takeuchi IK, Semba R, Kato K. Distribution of brain-derived neurotrophic factor in rats and its changes with development in the brain. *J Neurochem.* 1997; 69: 34-42.

Khanbabaee K, van Ree T. Tannins: classification and definition. *Nat Prod Rep.* 2001; 18: 641-649.

Kim YK, Lee HP, Won SD, Park EY, Lee HY, Lee BH, Lee SW, Yoon D, Han C, Kim DJ, Choi SH. Low plasma BDNF is associated with suicidal behavior in major depression. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2007; 31: 78-85.

Lagunin A, Filimonov D, Poroikov V. Multi-targeted natural products evaluation based on biological activity prediction with PASS. *Curr Pharm Des*. 2010; 16: 1703-1717.

Larrosa M, Garcia-Conesa MT, Espin JC, Tomas-Barberan FA. Ellagitannins, ellagic acid and vascular health. *Mol Aspects Med*. 2010; 31: 513-539.

Larrosa M, Tomas-Barberan FA, Espin JC. The dietary hydrolysable tannin punicalagin releases ellagic acid that induces apoptosis in human colon adenocarcinoma Caco-2 cells by using the mitochondrial pathway. *J Nutr Biochem*. 2006; 17: 611-625.

Lee J, Duan W, Mattson MP. Evidence that brain-derived neurotrophic factor is required for basal neurogenesis and mediates, in part, the enhancement of neurogenesis by dietary restriction in the hippocampus of adult mice. *J Neurochem*. 2002; 82: 1367-1375.

Lee JH, Won JH, Choi JM, Cha HH, Jang YJ, Park S, Kim HG, Kim HC, Kim DK. Protective effect of ellagic acid on concanavalin A-induced hepatitis via toll-like receptor and mitogen-activated protein kinase/nuclear factor kappaB signaling pathways. *J Agric Food Chem*. 2014; 62: 10110-10117.

Lei F, Xing D-M, Xiang L, Zhao Y-N, Wang W, Zhang L-J, Du L-J. Pharmacokinetic study of ellagic acid in rat after oral administration of pomegranate leaf extract. *Journal of Chromatography B*. 2003; 796: 189-194.

Leibrock J, Lottspeich F, Hohn A, Hofer M, Hengerer B, Masiakowski P, Thoenen H, Barde YA. Molecular cloning and expression of brain-derived neurotrophic factor. *Nature*. 1989; 341: 149-152.

Lessmann V, Brigadski T. Mechanisms, locations, and kinetics of synaptic BDNF secretion: an update. *Neurosci Res.* 2009; 65: 11-22.

Levinson DF. The genetics of depression: a review. *Biol Psychiatry.* 2006; 60: 84-92.

Lipinska L, Klewicka E, Sojka M. The structure, occurrence and biological activity of ellagitannins: a general review. *Acta Sci Pol Technol Aliment.* 2014; 13: 289-299.

Liu X, Qi Q, Xiao G, Li J, Luo HR, Ye K. O-methylated metabolite of 7,8-dihydroxyflavone activates TrkB receptor and displays antidepressant activity. *Pharmacology.* 2013; 91: 185-200.

Lloyd RB, Nemeroff CB. The role of corticotropin-releasing hormone in the pathophysiology of depression: therapeutic implications. *Curr Top Med Chem.* 2011; 11: 609-617.

Lu L, Airey DC, Williams RW. Complex trait analysis of the hippocampus: mapping and biometric analysis of two novel gene loci with specific effects on hippocampal structure in mice. *J Neurosci.* 2001; 21: 3503-3514.

Lucassen PJ, Meerlo P, Naylor AS, van Dam AM, Dayer AG, Fuchs E, Oomen CA, Czeh B. Regulation of adult neurogenesis by stress, sleep disruption, exercise and inflammation: Implications for depression and antidepressant action. *Eur Neuropsychopharmacol.* 2010; 20: 1-17.

Luscher B, Shen Q, Sahir N. The GABAergic deficit hypothesis of major depressive disorder. *Mol Psychiatry.* 2011; 16: 383-406.

Madara JC, Levine ES. Presynaptic and postsynaptic NMDA receptors mediate distinct effects of brain-derived neurotrophic factor on synaptic transmission. *J Neurophysiol.* 2008; 100: 3175-3184.

Maisonpierre PC, Belluscio L, Squinto S, Ip NY, Furth ME, Lindsay RM, Yancopoulos GD. Neurotrophin-3: a neurotrophic factor related to NGF and BDNF. *Science*. 1990; 247: 1446-1451.

Martinowich K, Lu B. Interaction between BDNF and serotonin: role in mood disorders. *Neuropsychopharmacology*. 2008; 33: 73-83.

Mattson MP, Goodman Y, Luo H, Fu W, Furukawa K. Activation of NF-kappaB protects hippocampal neurons against oxidative stress-induced apoptosis: evidence for induction of manganese superoxide dismutase and suppression of peroxynitrite production and protein tyrosine nitration. *J Neurosci Res*. 1997; 49: 681-697.

Mayer EA, Knight R, Mazmanian SK, Cryan JF, Tillisch K. Gut microbes and the brain: paradigm shift in neuroscience. *J Neurosci*. 2014; 34: 15490-15496.

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

McKinnon MC, Yucel K, Nazarov A, MacQueen GM. A meta-analysis examining clinical predictors of hippocampal volume in patients with major depressive disorder. *J Psychiatry Neurosci*. 2009; 34: 41-54.

Meeker RB, Williams KS. The p75 neurotrophin receptor: at the crossroad of neural repair and death. *Neural Regen Res*. 2015; 10: 721-725.

Mertens-Talcott SU, Jilma-Stohlawetz P, Rios J, Hingorani L, Derendorf H. Absorption, metabolism, and antioxidant effects of pomegranate (*Punica granatum* L.) polyphenols after ingestion of a standardized extract in healthy human volunteers. *J Agric Food Chem*. 2006; 54: 8956-8961.

Miller BR, Hen R. The current state of the neurogenic theory of depression and anxiety. *Curr Opin Neurobiol.* 2015; 30: 51-58.

Monteggia LM, Barrot M, Powell CM, Berton O, Galanis V, Gemelli T, Meuth S, Nagy A, Greene RW, Nestler EJ. Essential role of brain-derived neurotrophic factor in adult hippocampal function. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004; 101: 10827-10832.

Murray CJ, Lopez AD. Measuring the global burden of disease. *N Engl J Med.* 2013; 369: 448-457.

Nakazawa T, Yasuda T, Ueda J, Ohsawa K. Antidepressant-like effects of apigenin and 2,4,5-trimethoxycinnamic acid from *Perilla frutescens* in the forced swimming test. *Biol Pharm Bull.* 2003; 26: 474-480.

Newman DJ, Cragg GM. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. *J Nat Prod.* 2012; 75: 311-335.

Nibuya M, Morinobu S, Duman RS. Regulation of BDNF and trkB mRNA in rat brain by chronic electroconvulsive seizure and antidepressant drug treatments. *J Neurosci.* 1995; 15: 7539-7547.

Nibuya M, Nestler EJ, Duman RS. Chronic antidepressant administration increases the expression of cAMP response element binding protein (CREB) in rat hippocampus. *J Neurosci.* 1996; 16: 2365-2372.

Niemetz R, Gross GG. Enzymology of gallotannin and ellagitannin biosynthesis. *Phytochemistry.* 2005; 66: 2001-2011.

Numakawa T, Richards M, Nakajima S, Adachi N, Furuta M, Odaka H, Kunugi H. The role of brain-derived neurotrophic factor in comorbid depression: possible linkage with steroid hormones, cytokines, and nutrition. *Front Psychiatry.* 2014; 5: 136.

Özkaya A, Celik S, Yüce A, Şahin Z, Yılmaz Ö. The effects of ellagic acid on some biochemical parameters in the liver of rats against oxidative stress induced by aluminum. *Kafkas Univ Vet Fak Derg.* 2010; 16: 263-268.

Pang PT, Teng HK, Zaitsev E, Woo NT, Sakata K, Zhen S, Teng KK, Yung WH, Hempstead BL, Lu B. Cleavage of proBDNF by tPA/plasmin is essential for long-term hippocampal plasticity. *Science.* 2004; 306: 487-491.

Paolucci EO, Genuis ML, Violato C. A meta-analysis of the published research on the effects of child sexual abuse. *J Psychol.* 2001; 135: 17-36.

Papoutsi Z, Kassi E, Tsiapara A, Fokialakis N, Chrousos GP, Moutsatsou P. Evaluation of estrogenic/antiestrogenic activity of ellagic acid via the estrogen receptor subtypes ERalpha and ERbeta. *J Agric Food Chem.* 2005; 53: 7715-7720.

Park H, Poo MM. Neurotrophin regulation of neural circuit development and function. *Nat Rev Neurosci.* 2013; 14: 7-23.

Park S, Seok JK, Kwak JY, Suh HJ, Kim YM, Boo YC. Anti-Inflammatory Effects of Pomegranate Peel Extract in THP-1 Cells Exposed to Particulate Matter PM10. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2016: 6836080.

Pattarawarapan M, Burgess K. Molecular basis of neurotrophin-receptor interactions. *J Med Chem.* 2003; 46: 5277-91.

Pavlica S, Gebhardt R. Protective effects of ellagic and chlorogenic acids against oxidative stress in PC12 cells. *Free Radic Res.* 2005; 39: 1377-90.

Pillai A. Brain-derived neurotrophic factor/TrkB signaling in the pathogenesis and novel pharmacotherapy of schizophrenia. *Neurosignals.* 2008; 16: 183-93.

Pirinccioglu M, Kizil G, Kizil M, Kanay Z, Ketani A. The protective role of pomegranate juice against carbon tetrachloride-induced oxidative stress in rats. *Toxicol Ind Health*. 2014; 30: 910-918.

Porsolt RD, Bertin A, Jalfre M. Behavioral despair in mice: a primary screening test for antidepressants. *Arch Int Pharmacodyn Ther*. 1977; 229: 327-336.

Posser T, Kaster MP, Barauna SC, Rocha JB, Rodrigues AL, Leal RB. Antidepressant-like effect of the organoselenium compound ebselen in mice: evidence for the involvement of the monoaminergic system. *Eur J Pharmacol*. 2009; 602: 85-91.

Prior H, Schwegler H, Marashi V, Sachser N. Exploration, emotionality, and hippocampal mossy fibers in nonaggressive AB/Gat and congenic highly aggressive mice. *Hippocampus*. 2004; 14: 135-140.

Priyadarsini KI, Khopde SM, Kumar SS, Mohan H. Free radical studies of ellagic acid, a natural phenolic antioxidant. *J Agric Food Chem*. 2002; 50: 2200-2206.

Proulx CD, Hikosaka O, Malinow R. Reward processing by the lateral habenula in normal and depressive behaviors. *Nat Neurosci*. 2014; 17: 1146-1152.

Quideau S. Chemistry and biology of ellagitannins: an underestimated class of bioactive plant polyphenols. World Scientific Singapore. 2009.

Radziejewski C, Robinson RC, DiStefano PS, Taylor JW. Dimeric structure and conformational stability of brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3. *Biochemistry*. 1992; 31: 4431-4436.

Rantamaki T, Hendolin P, Kankaanpaa A, Mijatovic J, Piepponen P, Domenici E, Chao MV, Mannisto PT, Castren E. Pharmacologically diverse antidepressants rapidly activate brain-derived neurotrophic factor receptor TrkB and induce phospholipase-

Cgamma signaling pathways in mouse brain. *Neuropsychopharmacology*. 2007; 32: 2152-2162.

Rantamaki T, Vesa L, Antila H, Di Lieto A, Tammela P, Schmitt A, Lesch KP, Rios M, Castren E. Antidepressant drugs transactivate TrkB neurotrophin receptors in the adult rodent brain independently of BDNF and monoamine transporter blockade. *PLoS One*. 2011; 6: e20567.

Reichardt LF. Neurotrophin-regulated signalling pathways. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2006; 361: 1545-1564.

Revest JM, Le Roux A, Roullot-Lacarrière V, Kaouane N, Vallee M, Kasanetz F, Rouge-Pont F, Tronche F, Desmedt A, Piazza PV. BDNF-TrkB signaling through Erk1/2 MAPK phosphorylation mediates the enhancement of fear memory induced by glucocorticoids. *Mol Psychiatry*. 2014; 19: 1001-1009.

Risch N, Herrell R, Lehner T, Liang KY, Eaves L, Hoh J, Griem A, Kovacs M, Ott J, Merikangas KR. Interaction between the serotonin transporter gene (5-HTTLPR), stressful life events, and risk of depression: a meta-analysis. *JAMA*. 2009; 301: 2462-2471.

Rogoz Z, Skuza G, Legutko B. Repeated treatment with mirtazepine induces brain-derived neurotrophic factor gene expression in rats. *J Physiol Pharmacol*. 2005; 56: 661-671.

Rosenblat JD, Cha DS, Mansur RB, McIntyre RS. Inflamed moods: a review of the interactions between inflammation and mood disorders. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2014; 53: 23-34.

Rosillo MA, Sanchez-Hidalgo M, Cardeno A, Aparicio-Soto M, Sanchez-Fidalgo S, Villegas I, de la Lastra CA. Dietary supplementation of an ellagic acid-enriched

pomegranate extract attenuates chronic colonic inflammation in rats. *Pharmacol Res.* 2012; 66: 235-242.

Russo-Neustadt A, Beard RC, Cotman CW. Exercise, antidepressant medications, and enhanced brain derived neurotrophic factor expression. *Neuropsychopharmacology.* 1999; 21: 679-682.

Saarelainen T, Hendolin P, Lucas G, Koponen E, Sairanen M, MacDonald E, Agerman K, Haapasalo A, Nawa H, Aloyz R, Ernfors P, Castren E. Activation of the TrkB neurotrophin receptor is induced by antidepressant drugs and is required for antidepressant-induced behavioral effects. *J Neurosci.* 2003; 23: 349-357.

Salminen A, Hyttinen JM, Kaarniranta K. AMP-activated protein kinase inhibits NF-kappaB signaling and inflammation: impact on healthspan and lifespan. *J Mol Med (Berl).* 2011; 89: 667-676.

Sanacora G, Treccani G, Popoli M. Towards a glutamate hypothesis of depression: an emerging frontier of neuropsychopharmacology for mood disorders. *Neuropharmacology.* 2012; 62: 63-77.

Sapolsky RM. Glucocorticoids and hippocampal atrophy in neuropsychiatric disorders. *Arch Gen Psychiatry.* 2000; 57: 925-935.

Sartorius A, Henn FA. Deep brain stimulation of the lateral habenula in treatment resistant major depression. *Med Hypotheses.* 2007; 69: 1305-1308.

Schildkraut JJ. The catecholamine hypothesis of affective disorders: a review of supporting evidence. *Am J Psychiatry.* 1965; 122: 509-522.

Schmidt HD, Duman RS. Peripheral BDNF produces antidepressant-like effects in cellular and behavioral models. *Neuropsychopharmacology.* 2010; 35: 2378-2391.

Seeram NP, Henning SM, Zhang Y, Suchard M, Li Z, Heber D. Pomegranate juice ellagitannin metabolites are present in human plasma and some persist in urine for up to 48 hours. *J Nutr.* 2006; 136: 2481-2485.

Seeram NP, Lee R, Heber D. Bioavailability of ellagic acid in human plasma after consumption of ellagitannins from pomegranate (*Punica granatum L.*) juice. *Clin Chim Acta* 2004; 348: 63-68.

Seeram NP, Lee R, Scheuller HS, Heber D. Identification of phenolic compounds in strawberries by liquid chromatography electrospray ionization mass spectroscopy. *Food Chemistry.* 2006; 97: 1-11.

Sen S, Duman R, Sanacora G. Serum brain-derived neurotrophic factor, depression, and antidepressant medications: meta-analyses and implications. *Biol Psychiatry.* 2008; 64: 527-532.

Shimizu E, Hashimoto K, Okamura N, Koike K, Komatsu N, Kumakiri C, Nakazato M, Watanabe H, Shinoda N, Okada S, Iyo M. Alterations of serum levels of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in depressed patients with or without antidepressants. *Biol Psychiatry.* 2003; 54: 70-75.

Shirayama Y, Chen AC, Nakagawa S, Russell DS, Duman RS. Brain-derived neurotrophic factor produces antidepressant effects in behavioral models of depression. *J Neurosci.* 2002; 22: 3251-3261.

Siuciak JA, Lewis DR, Wiegand SJ, Lindsay RM. Antidepressant-like effect of brain-derived neurotrophic factor (BDNF). *Pharmacol Biochem Behav.* 1997; 56: 131-137
Slattery DA, Cryan JF. Using the rat forced swim test to assess antidepressant-like activity in rodents. *Nat Protoc.* 2012; 7: 1009-1014.

Smith MA, Zhang LX, Lyons WE, Mamounas LA. Anterograde transport of endogenous brain-derived neurotrophic factor in hippocampal mossy fibers. *Neuroreport*. 1997; 8: 1829-1834.

Soppet D, Escandon E, Maragos J, Middlemas DS, Reid SW, Blair J, Burton LE, Stanton BR, Kaplan DR, Hunter T, Nikolics K, Parada LF. The neurotrophic factors brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 are ligands for the trkB tyrosine kinase receptor. *Cell*. 1991; 65: 895-903.

Steru L, Chermat R, Thierry B, Simon P. The tail suspension test: a new method for screening antidepressants in mice. *Psychopharmacology (Berl)*. 1985; 85: 367-370.

Stoner GD, Chen T, Kresty LA, Aziz RM, Reinemann T, Nines R. Protection against esophageal cancer in rodents with lyophilized berries: potential mechanisms. *Nutr Cancer*. 2006; 54: 33-46.

Stoner GD, Sardo C, Apseloff G, Mullet D, Wargo W, Pound V, Singh A, Sanders J, Aziz R, Casto B, Sun X. Pharmacokinetics of anthocyanins and ellagic acid in healthy volunteers fed freeze-dried black raspberries daily for 7 days. *J Clin Pharmacol*. 2005; 45: 1153-1164.

Sun H, Kennedy PJ, Nestler EJ. Epigenetics of the depressed brain: role of histone acetylation and methylation. *Neuropsychopharmacology*. 2013; 38: 124-137.

Teel RW, Martin RM. Disposition of the plant phenol ellagic acid in the mouse following oral administration by gavage. *Xenobiotica*. 1988; 18: 397-405.

Tomás-Barberán FA, Espín JC, García-Conesa MT. Bioavailability and metabolism of ellagic acid and ellagitannins. *Chemistry and biology of ellagitannins*. 2009; 7: 293-297.

Tomás-Barberán FA, Seeram NP, Espín JC. Bioavailability of pomegranate polyphenols. *Pomegranates Ancient Roots to Modern Medicine*. 2006; 3: 45-60.

Tripp A, Oh H, Guilloux JP, Martinowich K, Lewis DA, Sibille E. Brain-derived neurotrophic factor signaling and subgenual anterior cingulate cortex dysfunction in major depressive disorder. *Am J Psychiatry*. 2012; 169: 1194-1202.

Trivedi MH, Rush AJ, Wisniewski SR, Nierenberg AA, Warden D, Ritz L, Norquist G, Howland RH, Lebowitz B, McGrath PJ, Shores-Wilson K, Biggs MM, Balasubramani GK, Fava M, Team SDS. Evaluation of outcomes with citalopram for depression using measurement-based care in STAR*D: implications for clinical practice. *Am J Psychiatry*. 2006; 163: 28-40.

Usta C, Ozdemir S, Schiariti M, Puddu PE. The pharmacological use of ellagic acid-rich pomegranate fruit. *Int J Food Sci Nutr*. 2013; 64: 907-913.

Ünüvar N, Mollahaliloğlu S, Yardım N. Türkiye hastalık yükü çalışması 2004. TC Sağlık Bakanlığı, Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkezi Başkanlığı, Hıfzıssıhha Mektebi Müdürlüğü 1 Basım Ankara: Aydoğdu Ofset Matbaacılık San ve Tic Ltd Şti. 2006; 1-56.

Videbech P, Ravnkilde B. Hippocampal volume and depression: a meta-analysis of MRI studies. *Am J Psychiatry*. 2004; 161: 1957-1966.

Wang D, Chen Q, Liu B, Li Y, Tan Y, Yang B. Ellagic acid inhibits proliferation and induces apoptosis in human glioblastoma cells. *Acta Cir Bras*. 2016; 31: 143-149.

Warden D, Rush AJ, Trivedi MH, Fava M, Wisniewski SR. The STAR*D Project results: a comprehensive review of findings. *Curr Psychiatry Rep*. 2007; 9: 449-459.

Waterhouse EG, Xu B. New insights into the role of brain-derived neurotrophic factor in synaptic plasticity. *Mol Cell Neurosci*. 2009; 42: 81-89.

Widom CS, DuMont K, Czaja SJ. A prospective investigation of major depressive disorder and comorbidity in abused and neglected children grown up. *Arch Gen Psychiatry*. 2007; 64: 49-56.

Williams RJ, Spencer JP, Rice-Evans C. Flavonoids: antioxidants or signalling molecules? *Free Radic Biol Med*. 2004; 36: 838-849.

Willner P. The validity of animal models of depression. *Psychopharmacology (Berl)*. 1984; 83: 1-16.

Yan L, Yin P, Ma C, Liu Y. Method development and validation for pharmacokinetic and tissue distributions of ellagic acid using ultrahigh performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS). *Molecules*. 2014; 19: 18923-18935.

Yan Q, Rosenfeld RD, Matheson CR, Hawkins N, Lopez OT, Bennett L, Welcher AA. Expression of brain-derived neurotrophic factor protein in the adult rat central nervous system. *Neuroscience*. 1997; 78: 431-448.

Yilmaz B, Usta C. Ellagic acid-induced endothelium-dependent and endothelium-independent vasorelaxation in rat thoracic aortic rings and the underlying mechanism. *Phytother Res*. 2013; 27: 285-289.

Zhou E, Fu Y, Wei Z, Yang Z. Inhibition of allergic airway inflammation through the blockage of NF-kappaB activation by ellagic acid in an ovalbumin-induced mouse asthma model. *Food Funct*. 2014; 5: 2106-2112.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Hatice Aslı	Uyruğu	T.C.
Soyadı	BEDEL	Tel no	5055428538
Doğum tarihi	17/07/1985	e-posta	aslibedel@akdeniz.edu.tr

Eğitim Bilgileri

Mezun olduğu kurum		Mezuniyet yılı
Lise	Burdur Bucak Adem Tolunay Fen Lisesi	2003
Lisans	Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi	2007

İş Deneyimi

Görevi	Kurum	Süre (yıl-yıl)
Eczacı	Bursa Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi	2008-2011
Eczacı	Burdur Bucak Aslı Eczanesi	2011-2013
Araştırma Görevlisi	Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı	2013-halen

Yabancı Dilleri	Sınav türü	Puanı
İngilizce	ÜDS	65

Proje Deneyimi

Proje Adı	Destekleyen kurum	Süre (Yıl-Yıl)
ELLAGİK ASİT'İN FARE DEPRESYON MODELLERİNDE BEYİN KAYNAKLI NÖROTROFİK FAKTÖR (BKNF) DÜZEYLERİNE ETKİLERİ	Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi	2014-2016

Burslar-Ödüller:

8. Psikoformakoloji Kongresi & 4. Uluslararası Çocuk ve Ergen Psikofarmakolojisi Sempozyumu'nda poster ve sözel bildiri araştırma teşvik 3.lük ödülü

Yayınlar ve Bildiriler:

1) Kurtoglu E, Bedel A, Ugur Kurtoglu A, Usta C. *Pharmacovigilance study of iron chelators in Thalassemic patients*. European Pharma Congress. August 25-27, 2015 Valencia, Spain.

2) Bedel HA, Kencebay Manas C, Özbey G, Usta C. *The effects of ellagic acid on hippocampal brain-derived neurotrophic factor and serotonin transporter levels in mouse depression models*. The Eighth International Congress on Psychopharmacology & Forth International Symposium on Child and Adolescent Psychopharmacology. 20-24 April, Antalya, 2016.

3) Usta C, Bedel A, Uğur Kurtoğlu A, Kurtoğlu E. *Effects of Crabapple (Malus sylvestris) on Blood Glucose and Lipid Levels in Diabetic Rats*. Journal of Food and Nutrition Research. 2016 Vol:4 No:3 148-151