

T.C.
MANİSACELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı

**SIÇAN POSTTRAVMATİK STRES MODELİNDE MELATONİN
VE RAMELTEONUN ETKİNLİĞİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ**

UZMANLIK TEZİ
Dr. Ömer Can ATAK

Tez Danışmanı
Prof. Dr. Ercüment ÖLMEZ

Manisa 2022

T.C.
MANİSACELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı

**SIÇAN POSTTRAVMATİK STRES MODELİNDE MELATONİN
VE RAMELTEONUN ETKİNLİĞİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ**

UZMANLIK TEZİ
Dr. Ömer Can ATAK

Tez Danışmanı
Prof. Dr. Ercüment ÖLMEZ

Manisa 2022

ÖNSÖZ

Öncelikle, uzmanlık eğitimim ve tez çalışmam boyunca sonsuz sabır ve hoşgörüsü ile her an yanımda olan, bu süreçte derin bilgi ve tecrübelerinden istifade ettiğim, sadece bir akademisyen olarak değil, aynı zamanda insan olarak da örnek aldığım ve öğrencisi olmaktan onur duyduğum Prof. Dr. Ercüment ÖLMEZ'e en içten teşekkürlerimi sunarım.

Asistanlık sürecimde her konuda bilgi, tecrübe ve destekleriyle yanımda olan anabilim dalımız öğretim üyeleri Sayın Dekanımız Prof. Dr. Kamil VURAL, Prof. Dr. Tuğba ÇAVUŞOĞLU, Prof. Dr. Sedef GİDENER ve Dr. Öğr. Üyesi Ertan DARIVERENLİ'ye,

Tez sürecimdeki katkılarından dolayı Prof. Dr. İbrahim TUĞLU ve Prof. Dr. Funda KOSOVALI'ya,

Uzmanlık eğitimi süresince yardım, destek ve muhabbetleriyle çok iyi birer yol arkadaşı olan kıymetli asistan arkadaşlarım Dr. Pelin AKÇA, Dr. Dilek Gülce TATLI, Dr. Furkan ÖZTEKİN ve Dr. Elvan Hasan YILMAZ'a

Ve son olarak hayatım boyunca yanımda olup beni destekleyen anneme, babama ve canım kardeşime teşekkür ediyorum.

Ömer Can ATAK

Manisa, 2022

Bu çalışma Manisa Celal Bayar Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından 2020-068 proje numarasıyla desteklenmiştir.

TABLO DİZİNİ

Tablo 4.1. Sıçanlarda posttravmatik stres modelinde yüksek artı labirent testinde ölçülen parametrelerin gruplar arasında karşılaştırılması.....	20
Tablo 4.2. Sıçanlarda posttravmatik stres modelinde açık alan testinde ölçülen parametrelerin gruplar arasında karşılaştırılması.....	28



ŞEKİL DİZİNİ

Şekil 4.1. Sıçanlarda yüksek artı labirent testinde kat edilen mesafenin (m) uygulamalara ve deneyin aşamalarına göre değişimi.....	22
Şekil 4.2. Sıçanlarda yüksek artı labirent testinde mobil olarak geçen zamanın (s) uygulamalara ve deneyin aşamalarına göre değişimi.....	23
Şekil 4.3. Sıçanlarda yüksek artı labirent testinde İmmobil olarak geçen zamanın (s) uygulamalara ve deneyin aşamalarına göre değişimi.....	24
Şekil 4.4. Sıçanlarda yüksek artı labirent testinde şahlanma sayısının uygulamalara ve deneyin aşamalarına göre değişimi.....	25
Şekil 4.5. Sıçanlarda yüksek artı labirent testinde kapalı kolda geçirilen zamanın (s) uygulamalara ve deneyin aşamalarına göre değişimi.....	26
Şekil 4.6. Sıçanlarda yüksek artı labirent testinde açık kolda geçirilen zamanın uygulamalara ve deneyin aşamalarına göre değiş.....	27
Şekil 4.7. Sıçanlarda deney sonunda ölçülen kan kortizol düzeyi.....	30
Şekil 4.8. Sıçanlarda deney sonunda ELISA yöntemiyle çalışılan CRH düzeyleri.....	31
Şekil 4.9. Sıçanlarda deney sonunda ELISA yöntemiyle çalışılan BDNF düzeyleri.....	32
Şekil 4.10. Sıçanlarda deney sonunda ELISA yöntemiyle çalışılan pro-BDNF düzeyleri.....	33
Şekil 4.11. Sıçanlarda deney sonunda ELISA yöntemiyle çalışılan NTRK2 düzeyleri.....	34
Şekil 4.12. Sıçanlarda deney sonunda gerçekleştirilen İHK boyamalarında beyin hipokampus bölgesindeki CRH düzeylerinin h-skor analizi ile değerlendirilmesi.....	41
Şekil 4.13. Sıçanlarda deney sonunda gerçekleştirilen İHK boyamalarında beyin hipokampus bölgesindeki BDNF düzeylerinin h-skor analizi ile değerlendirilmesi.....	44
Şekil 4.14. Sıçanlarda deney sonunda gerçekleştirilen İHK boyamalarında beyin hipokampus bölgesindeki pro-BDNF düzeylerinin h-skor analizi ile değerlendirilmesi.....	47

Şekil 4.15. Sıçanlarda deney sonunda gerçekleştirilen İHK boyamalarında beyin hipokampus bölgesindeki NTRK2 düzeylerinin h-skor analizi ile değerlendirilmesi.....	50
---	----



RESİM DİZİNİ

Resim 4.1. Sıçanlarda deney sonunda beyin hipokampus bölgesinin HE boyaması ile değerlendirilmesi.....	36
Resim 4.2. Sıçanlarda deney sonunda beyin hipokampus bölgesinin Nissle boyaması ile değerlendirilmesi.....	38
Resim 4.3. Sıçanlarda deney sonunda gerçekleştirilen İHK boyamalarında beyin hipokampus bölgesindeki CRH düzeylerinin değerlendirilmesi.....	40
Resim 4.4. Sıçanlarda deney sonunda gerçekleştirilen İHK boyamalarında beyin hipokampus bölgesindeki BDNF düzeylerinin değerlendirilmesi.....	43
Resim 4.5. Sıçanlarda deney sonunda gerçekleştirilen İHK boyamalarında beyin hipokampus bölgesindeki pro-BDNF düzeylerinin değerlendirilmesi...	46
Resim 4.6. Sıçanlarda deney sonunda gerçekleştirilen İHK boyamalarında beyin hipokampus bölgesindeki NTRK2 düzeylerinin değerlendirilmesi.....	49

KISALTMALAR DİZİNİ

TSSB	Travma Sonrası Stres Bozukluğu
SSRI	Serotonin Geri Alım İnhibitörü
SNRI	Serotonin Noradrenalin Geri Alım İnhibitörü
ABD	Amerika Birleşik Devletleri
BDNF	Beyin Derive Nörotrofik Faktör
pro-BDNF	pro-Beyin Derive Nörotrofik Faktör
CRH	Kortikotropin Salıcı Hormon
TRKB	Tropomiyozin Reseptör Kinaz B
NTRK2	Nörotrofik Tirozin Reseptör Kinaz 2
GC	Glukokortikoid
CRF 1	Corticotropin-releasing hormone receptor 1
CRF 2	Corticotropin-releasing hormone receptor 2
FABP3	Fatty Acid Binding Protein 3
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
HPA	Hipotalamus hipofiz adrenal
µM	Mikromolar
NGF	Nöronal Büyüme Faktörü
NT3	Nörotrofin-3
NT4	Nörotrofin-4
mRNA	Messenger Ribonükleik Asit
NMDA	N-metil D-aspartat
PX	Pinealektomi
MEL	Melatonin
RAM	Ramelteon
AAT	Açık alan testi
YAL	Yüksek artı labirent
RPM	Dakika dönme hızı
Cm	Santimetre
HE	Hematoksilen eosin
İHK	İmmünohistokimya

H₂O	Su
PBS	Phosphate-buffer saline
DAB	3.3'diaminobenzidin
SH	Standart hata
ANOVA	Tek yönlü varyans analizi
m	Metre
s	Saniye



İÇİNDEKİLER TABLOSU

1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Travma Sonrası Stres Bozukluğu (TSSB).....	3
2.1.1 Travma Sonrası Stres Bozukluğunun Epidemiyolojisi.....	3
2.1.2 Travma Sonrası Stres Bozukluğunun Patogenezi	5
2.1.3. Travma Sonrası Stres Bozukluğunun Tedavisi	6
2.2. Deney Hayvanlarında TSSB Modelleri	7
2.3. Deney Hayvanlarında TSSB'nin Değerlendirilmesine Yönelik Analizler.....	8
2.3.1. Davranış Deneyleri	8
2.3.1.1. Açık Alan Testi	8
2.3.1.2. Yüksek Artı Labirent Testi.....	8
2.3.2. Biyokimyasal ve İmmünohistokimyasal Analizler	9
2.3.2.1. BDNF, Pro BDNF ve TRKB	9
2.3.2.2. Hipotalamo-Pitüiter-Adrenal (HPA) Aks, CRH ve Kortizol	10
2.4. Melatonin	12
2.4.1. Pinealektomi Modeli.....	13
2.5. Ramelteon	14
3. GEREÇ VE YÖNTEM	15
3.1. Deney Grupları	15
3.2. Pinealektomi İşlemi.....	15
3.3. Deney Protokolü	16
3.3.1. Stres-Tekrar Stres Modeli.....	16
3.4. Davranış Deneyleri.....	16
3.4.1. Yüksek Artı Labirent (YAL) Testi.....	16
3.4.2. Açık Alan (AA) Testi	17
3.5. Biyokimyasal Analizler	17
3.5.1. Kan Örneklerinin Alınması ve Kortizol Düzeyinin Çalışılması	17
3.5.2. Beyin Örneklerinin Alınması, Hipokampusun Çıkarılması ve Protein Düzeylerinin Çalışılması	18
3.6. Histopatolojik Analizler	18
3.6.1. İndirekt İmmünohistokimya Boyaması.....	19

3.7. İstatistiksel Analiz.....	19
4. BULGULAR	20
4.1. Davranış Deneyleri.....	20
4.1.1. Yüksek Artı Labirent	20
4.1.2. Açık Alan Testi.....	28
4.2. Biyokimyasal Bulgular	29
4.2.1. Kan Kortizol Düzeyleri	29
4.2.2. ELISA Protein Düzeyleri.....	30
4.3. Histopatolojik Bulgular.....	35
4.3.1 Hematoksilen Eosin Boyama Bulguları	35
4.3.2 İmmunohistokimya Bulguları	39
4.3.2.1 CRH Sonuçları	39
4.3.2.2 BDNF Sonuçları	42
4.3.2.3 proBDNF Sonuçları	45
4.3.2.4 NTRK2 Sonuçları	48
5. TARTIŞMA.....	51
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	56
7. ÖZET	57
8. SUMMARY	59
9. KAYNAKLAR.....	61

1. GİRİŞ

Travma sonrası stres bozukluğu (TSSB) önemli bir psikiyatrik rahatsızlık olup, travmatik olayların yaşanması ya da tanık olunması sonrasında görülmektedir. Semptomlar arasında olaya ait rahatsız edici ve istenmeyen hatıralar ve kabuslar, iritabilite, aşırı teyakkuzda olma, uykuya dalmada zorluk, konsantrasyonda azalma vardır. Tedavisinde en çok selektif serotonin geri alım inhibitörleri (SSRI) kullanılmakta olup, bu ilaçların etkisinin geç başlaması ve mevcut tedavilerin bazı semptomları iyileştirmede yetersiz kalabilmesi nedeniyle yeni tedavi arayışları sürmektedir.

Stres-tekrar stres modeli, travma sonrası stres bozukluğunu tetiklemede insanlardaki travmatik olayı taklit eden bir hayvan modeli olup, en çok kullanılan ve en etkili modeller arasındadır. Bu model ile TSSB hastalarındaki fiziksel, davranışsal, nörokimyasal ve nöroendokrin değişikliklere benzer değişiklikler hayvanlarda oluşturulabilmektedir.

Melatoninin TSSB etiyolojisindeki rolü tam olarak belli olmamasına karşın, düşük melatonin seviyelerinin hastalığa yakalanma riskinde artışla ilişkisi olabileceği ve melatonin uygulanmasının bazı hayvan deneylerinde ve insan vaka raporlarında semptomlarda gerilemeye yol açtığı bildirilmiştir. MT1 ve MT2 reseptörlerini seçici olarak uyaran ramelteon ise, uykuya dalma güçlüğüyle karakterize edilen uyku bozukluğu tedavisinde kullanılmak üzere onay almış olup, ABD'de kontrollü madde olarak sınıflandırılmayan onaylanmış ilk hipnotik ilaçtır. TSSB'deki etkinliği halen yeterince araştırılmamış bir moleküldür. Literatürde ramelteonun TSSB'deki olası etkinliğine ilişkin sadece tek bir çalışma grubunun yapmış olduğu 3 adet prelinik çalışma vardır. Bu çalışmalarda, stres+hatırlatıcı stres modelinden farklı olarak Fabp3 geninin elimine edildiği fareler kullanılmıştır. Ayrıca, sıçanlarda pinealektomi uygulamasının, yani fizyolojik melatonin düzeylerinin, TSSB modelindeki etkilerine yönelik bir çalışma bulunmamaktadır.

Bu araştırmada, pinealektomi uygulanmış ve uygulanmamış sıçanlarda, stres+hatırlatıcı stres ile oluşturulan TSSB modelinde melatonin ve ramelteonun etkinliğinin araştırılması amaçlanmıştır. Buna yönelik olarak, TSSB modeli oluşturulduktan sonra, davranış deneylerinin sonuçları değerlendirilmiş ve beyin dokusunda TSSB ile ilişkili olduğu düşünülen beyin türevli nörotrofik faktör (BDNF), pro-beyin türevli nörotrofik faktör (pro-BDNF), kortikotropin salıcı hormon (CRH) ve tropomiyozin reseptör kinaz (TrkB) düzeyleri immünohistokimya ve Elisa yöntemleri ile analiz edilmiştir. Sonuç olarak, bu çalışmanın sonuçları, TSSB'nin tedavisi ya da nlenmesine yönelik yeni yaklaşımlara katkı sağlayabilir.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Travma Sonrası Stres Bozukluğu (TSSB)

TSSB, istemsiz ve intrüzif (rahatsız edici, yineleyici) bilişsel fenomenlerle karakterize bir sendromdur. Bu istemsiz bilişsel fenomenler; flashbackler, kabuslar ve travmatik deneyimin intrüzif hatıralarını içerir (1). TSSB aynı zamanda bütün dikkatin tehdit edici uyaranların farkındalığına yönelttiği için (2), konsantrasyon sorunlarına ve hafıza bozukluklarına sebep olur (3). Tetikleyici travma olarak yaşanan olayların yelpazesi çok geniştir ve savaş, kişisel saldırı, doğal afetler, motorlu araç kazaları, tecavüz, çocuklukta fiziksel ve cinsel istismar, sevdiklerinin kaybı (4) ve yanıklar, kanser, miyokardiyal enfarktüs bu yelpaze içindedir (5,6). Semptomlar herhangi bir yaşta ortaya çıkabilir ve genellikle travmadan sonraki 3 ay içinde ortaya çıkar; ancak yıllar sonra da ortaya çıkabilir. Akut Stres Bozukluğunda (ASD), travmadan sonra 3 günden fazla, ancak 1 aydan kısa süre boyunca semptomlar mevcuttur. Buna karşılık, TSSB tanısı, semptomların 1 aydan fazla sürmesini gerektirir. Semptom süresi büyük ölçüde değişir, vakaların %50'den fazlası 3 ay içinde iyileşirken birçoğunun semptomları 1 yıldan uzun devam etmektedir (7). Semptomlar sıklıkla aralıklıdır ve nüks meydana gelebilir. TSSB, fiziksel hastalık şikayetleri, özellikle kas-iskelet, sinir, duyu, kalp-solunum, mide-bağırsak ve belirsiz semptom sunumları ile de güçlü bir şekilde ilişkilendirilebilir (8).

2.1.1 Travma Sonrası Stres Bozukluğunun Epidemiyolojisi

Travma sonrası stres bozukluğuna (TSSB) neden olan birçok farklı travma türü bulunmuştur. Bu türler ve oluşturdukları TSSB vakalarının oranı aşağıdaki gibidir:

- Seksüel ilişki şiddeti – %33 (tecavüz, çocuklukta cinsel istismar, eş şiddeti).
- Kişiler arası ilişkilerde travmatik deneyimler – %30 (sevilen birinin beklenmedik ölümü, bir çocuğun yaşamı tehdit eden hastalığı, sevilen birinin başına gelen travmatik olay).

- Kişiler arası şiddet – %12 (çocuklukta fiziksel istismar veya kişilerarası şiddete tanık olmak, fiziksel saldırı veya şiddetle tehdit edilmek).

- Organize şiddete maruz kalma – %3 (mülteci olmak, kaçırılmak, savaş bölgesinde sivil olarak bulunmak).

- Organize şiddete katılım – %11 (ölüme/ciddi yaralanmaya tanık olmak veya ceset bulmak, kazara veya kasten ölüme veya ciddi yaralanmaya neden olmak).

- Hayatı tehdit eden diğer travmatik olaylar – %12 (hayatı tehdit eden motorlu araç çarpışması, doğal afet, toksik kimyasallara maruz kalmak).

Bu olayların çoğu yaygındır ve çok sayıda bireyin etkilenmesiyle sonuçlanır. 24 ülkeyi kapsayan toplum temelli bir örneklem üzerinde yapılan bir çalışmada, TSSB'ye sebep olabilecek 29 tür travmatik olay olabileceği bildirilmiştir (9).

TSSB'nin yaşam boyu prevalansı Amerika Birleşik Devletleri'ndeki ve Kanada'daki genel yetişkin nüfusun örneklemelerinde %6,1 ila %9,2 arasında (10–13) değişmektedir. Bir yıllık prevalans oranları ise %3,5 ila %4,7 arasında değişmektedir (13,14).

Örnek olarak, Amerika Birleşik Devletleri'ndeki 5692 katılımcıdan oluşan bir örneklemde, katılımcıların %82,7'sinin, ciddi veya potansiyel olarak travmatik olaylara maruz kalmış olduğu bildirilmiştir ve travmaya maruz kalan katılımcıların %8,3'üne yaşam boyu TSSB teşhisi konulduğu bildirilmiştir. Bir birinci basamak kliniğinde yapılan çalışmada ise, hastaların %65'i ciddi ve potansiyel olarak travmatik olaylara maruz kalma öyküsü bildirmiştir ve %12'sinde TSSB geliştiği bildirilmiştir (12,15).

TSSB geliştirme olasılığının ve hastalığın ortaya çıkışının, bir dizi bireysel ve toplumsal risk faktöründen etkilendiği bildirilmiştir (16–18). Travma öncesi risk faktörleri şunları içerir:

- Cinsiyet
- Travma yaşı
- İrk
- Düşük eğitim seviyesi
- Düşük sosyoekonomik durum

- Ayrı, boşanmış veya dul olmak
- Travma geçmişi
- Genel çocukluk sıkıntısı
- Kişisel ve aile psikiyatrik geçmişi
- Bildirilen çocukluk çağı istismarı
- Zayıf sosyal destek
- Travmatik olaya tepkinin ilk şiddeti (11,19–22)

2.1.2 Travma Sonrası Stres Bozukluğunun Patogenezi

Travma sonrası stres bozukluğunun (TSSB) patofizyolojisinin çoğu belirsiz olsa da araştırma bulguları artmaktadır. Manyetik rezonans görüntüleme taramalarını kullanan çalışmalar, eşleştirilmiş kontrollere kıyasla TSSB'li hastalarda hipokampus, sol amigdala ve anterior singulat korteks hacminde azalma olduğunu göstermiştir (23,24). Çalışmalarda santral norepinefrin düzeylerinin artmasıyla, merkezi adrenerjik reseptörlerin down-regüle edildiği (25), kronik olarak azalmış glukokortikoid düzeylerinde reseptörlerin up-regülasyonu ve sol hemisferin bozukluğuna bağlı olarak hemisferik lateralizasyon gösterilmiştir (26).

Genetik faktörlerin çevresel faktörlerle etkileşmesi yoluyla TSSB'ye olan yatkınlığı artırabileceği düşünülerek bazı çalışmalar yapılmıştır (27,28). Büyük ölçekli genetik çalışmaların sonucuna göre, TSSB muhtemelen, genom boyunca binlerce lokustan etkilenen oldukça poligenik bir fenotip göstermektedir (29,30). Potansiyel bir gen-çevre etkileşiminin bir örneği olarak, stresle ilişkili gen olan FKBP5'te dört polimorfizmden birinin varlığı, çocuk istismarı öyküsü olan hastalarda TSSB riskinin artmasıyla ilişkilendirilmiştir (31).

Daha önce travmaya maruz kalmanın, sonraki travmatik olaylarla birlikte TSSB geliştirme riskini artırdığı gösterilmiştir (32). Bu "hassaslaşmanın" meydana geldiği mekanizma belirsizdir. Başka bir çalışmada, travma yaşamadan önce sağlıklı olan fakat ağır yaralanmalı kazaya maruz kalmış kazazedelerin, TSSB geliştirme insidansının düşük olduğu bulunmuştur (33).

2.1.3. Travma Sonrası Stres Bozukluğunun Tedavisi

Farmakolojik tedavinin terapötik hedefleri, intrüzif düşünceleri ve görüntüleri, kaçınma davranışını, patolojik aşırı uyarılmayı, aşırı uyanıklığı, sinirlilik, öfkeyi ve depresyonu azaltmaktır. İlaç tedavileri genellikle aşırı uyarılma ve ruh hali (sinirlilik, öfke, depresyon) semptomlarını azaltmada etkilidir; fakat yeniden deneyimleme, duygusal uyuşma ve davranışsal kaçınma semptomları için biraz daha az etkilidir. Ancak yanıtta bireysel farklılıklar genellikle tedaviye özgü farklılıklardan daha ağır basar.

Travma sonrası stres bozukluğunun (TSSB) farmakolojik tedavisine verilen yanıt kişiden kişiye büyük oranda değişmekle beraber, bu yanıtı tahmin etmekte kullanılan birkaç tane ölçek kullanılmaktadır (34). Uyku bozukluğu gibi TSSB'nin bazı yan semptomlarının tedavisi özellikle zor olabilir ve TSSB tedavisinde yaygın olan çoklu ilaç kullanımını gerektirebilir (35,36).

Selektif Serotonin Geri Alım İnhibitörleri

Selektif serotonin geri alım inhibitörleri (SSRI'lar), travma sonrası stres bozukluğu semptomlarını azaltmada etkilidir. Yedi randomize çalışmanın yer aldığı bir meta-analizde, SSRI'larla tedavi edilen hastaların semptomlarda ve işlevsellikte iyileşme yaşama olasılığı, plasebo alan gruba göre daha yüksek bulunmuştur (37).

Selektif Norepinefrin Geri Alım İnhibitörleri

SSRI'lara kıyasla TSSB için serotonin-norepinefrin geri alım inhibitörlerinin (SNRI'lerin) etkinliğini değerlendiren daha az çalışma olmasına rağmen; iki randomize çalışmada, plaseboya kıyasla TSSB semptomlarını azaltmada venlafaksin etkili bulunmuştur (38,39).

İkinci Nesil Antipsikotikler

Klinik araştırmalarda, ketiapin ve diğer ikinci kuşak antipsikotikler plaseboya kıyasla askeri ve sivil hastalarda TSSB semptomlarını azaltmada etkili bulunmuştur (40–42).

Alfa Adrenerjik Reseptör Blokerleri

TSSB tanısı konulan 240 hastayı kapsayan altı randomize klinik çalışmanın sonuçlarının değerlendirildiği bir meta-analizde, genel TSSB

semptomlarını ve kabusları azaltmada ve uyku kalitesini iyileştirmede prazosinin etkili olduğu bildirilmiştir (43).

2.2. Deney Hayvanlarında TSSB Modelleri

Stres Tekrar Stres

Bu modelde sıçanlar 2 saat immobilizasyon, 20 dakika yüzme ve 15 dakikalık dinlenme periyodundan sonra eter anestezisine maruz bırakılırlar. 7 günlük bir periyodun ardından sıçanlar hatırlatıcı stres olarak geçen tekrar stresine maruz bırakılırlar. Bu model sıçanlarda hipotalamus-hipofiz-adrenal (HPA) aksında TSSB benzeri değişikliklerin oluşturulabildiği ilk modeldir (44).

Tekli Uzatılmış Stres

Tekli uzatılmış stres yöntemi Kemirgenlerde TSSB modeli oluşturmak için en çok kullanılan yöntemlerden biridir. Bu modelde stres tekrar stres modelinden farklı olarak ilk stresten sonra herhangi bir stres uygulanmaz. Sıçanlara 2 saat immobilizasyon, 20 dakika yüzme ve 15 dakikalık dinlenme periyodunun ardından eter anestezisine maruz bırakılırlar. Bir hafta bekleme periyodundan sonra modelin oluşmuş olması beklenir (44).

Saldırgan Hayvan Stresi

Kedi, gelincik, tilki gibi saldırgan hayvanlarla yüzleşmenin, sıçanlarda, uzun süren davranışsal ve endokrin değişiklikleri tetikleyen yüksek korku ve stresi tetiklediği gösterilmiştir (45,46). Bu sebepten, saldırgan hayvanlarla veya bunların kokularıyla (idrar kokusu) karşılaşmak hayvan modellerinde travmayı oluşturmak için etkili yöntemlerdir. Sıçanlar genellikle kısa bir süre (5-10 dakika) saldırgan hayvana veya kokusuna maruz bırakılır (örneğin kirli kedi kumu) (47). Sıçanların 5 dakika boyunca kediye maruz bırakılmasının, yüksek artı labirent testinde stres ile alakalı olarak görülen davranışlarda artışa yol açtığı bildirilmiştir (48).

Ayaktan Elektrik Şoku

Ayaktan elektrik şoku, hayvanlardaki anksiyete, stres ve depresyon modellerinde sıklıkla kullanılan bir yöntemdir. 3 hafta kadar sürebilen ve hatta zamanla daha da artabilen davranışsal ve fizyolojik etkiler ortaya çıkarabilir

(49–53). Genel olarak, hayvanlar metal bir zemini olan şok odasına yerleştirilir ve yoğunluğu ve süresi değişebilen bir dizi elektrik şokuna tabi tutulur. Ayaktan elektrik şoku modelinin, kaçınma, anksiyete benzeri davranışlar, aşırı uyarılma, saldırganlık ve uyku düzenindeki değişiklikler gibi TSSB'nin bazı temel semptomlarını oluşturabildiği bildirilmiştir (50,53,54).

2.3. Deney Hayvanlarında TSSB'nin Değerlendirilmesine Yönelik Analizler

2.3.1. Davranış Deneyleri

2.3.1.1. Açık Alan Testi

Açık alan testi (AAT) kemirgenlerde, lokomotor hareket, anksiyete ve özbakım ve şahlanma gibi stereotipik hareketleri analiz etmek için kullanılır (55). Locomotor hareketteki değişiklikler bozulmuş nörolojik işleyişin ve dolayısıyla anormal beyin fonksiyonlarının göstergesi olabilir. Bu test ayrıca hayvanlarda genel sağlık ve iyilik halinin göstergesi olarak kullanılabilir. Sağlıklı olmayan hayvanlar genel olarak daha az hareket etme ve mesafe kaydetme eğiliminde olurlar. Stresli sıçanlarda bu testte, aktivitede azalma, stereotipik hareketlerde ise artma gözlenir (56). Bu hareketler tekrarlayıcı, değişmeyen ve herhangi bir amacı yokmuş gibi görünen hareketlerdir. Duvarlara yakın duran ve daha çok periferde gezinen sıçanların bu hareketine tigmotaksis denir ve anksiyete benzeri davranış olarak değerlendirilir. Anksiyetesi daha az olan sıçanlar alanın merkez kısmında daha çok zaman geçirmeye eğilim gösterirler (57,58). Stres uygulamasına bağlı olarak AA testinde toplam kat edilen mesafenin ve çizgi üzerinden geçme sayısının azaldığı da bildirilmiştir (59,60).

2.3.1.2. Yüksek Artı Labirent Testi

Yüksek artı labirent (YAL), farmakolojik ajanların, steroid hormonların anksiyolitik etkilerini ölçmek ve anksiyete benzeri davranışların altında hangi beyin bölgelerinin ve mekanizmalarının olduğunu belirlemek için yaygın olarak kullanılan bir davranış testidir. Sıçanlar dört kolun birleşim yerine yüzleri açık kola bakacak şekilde bırakılırlar ve her kola olan giriş sayısı ve o kolda geçirilen zaman belirli bir süre boyunca kaydedilir. Anksiyetenin davranış testlerindeki

en önemli belirteci YAL testinde açık kolda geçen zamanın azalmasıdır. Literatüre bakıldığında birçok çalışmada uygulanan çeşitli stres modellerinde YAL testine açık kolda geçen zaman değerinin azalmış olduğu görülmektedir (61–63). Artmış açık kol aktivitesi (zaman ve/veya giriş sayısı) anksiyetenin tersi davranışı yansıtır (64). Stres ile açık kolda geçen zamanın azalmasına ek olarak toplam aktivitenin de azaldığını bildiren yayınlar da mevcuttur (65).

2.3.2. Biyokimyasal ve İmmünohistokimyasal Analizler

2.3.2.1. BDNF, Pro BDNF ve TRKB

Beyin derive nörotrofik faktör santral sinir sisteminde önemli fonksiyonları olan, iyi bilinen bir büyüme faktörüdür. BDNF'nin nöronal maturasyon, sinaps formasyonu ve nöronal plastisite gibi önemli olaylar rolü vardır (66). BDNF'nin şizofreni, zihinsel yetersizlik, otizm gibi psikiyatrik hastalıklarla ve depresyon gibi duygudurum bozuklukları ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (67).

BDNF nöronal büyüme faktörü (NGF), nörotrofin-3 (NT3), ve nörotrofin-4 (NT4)'ü de içeren nörotrofin ailesinin bir üyesidir. BDNF santral sinir sisteminde yaygın olarak eksprese edilir ve gelişim, morfoloji, sinaptik plastisite ve fonksiyonunda önemli bir yeri vardır. BDNF geninin, her biri farklı BDNF transkriptlerini eksprese eden dokuz promoter bölgesi bulunmaktadır. Bu transkriptlerin hepsi aynı BDNF proteinini kodlamaktadır (68,69). BDNF mRNA'nın transkripsiyonu Ca^{+2} geçirgen glutamat reseptörleri (asıl olarak NMDA) ve voltaj kapılı Ca^{+2} kanalları aracılığı ile Ca^{+2} inflüksüne bağlı nöronal aktivite ile düzenlenir (70,71). BDNF, nöronların ve gliaların hücre gövdelerinde sentezlenir ve buradan terminallere taşınarak oradan salınır (72). BDNF ilk önce pre-pro-BDNF olarak sentezlenir, daha sonra bu BDNF'ye çevrilir, ancak bunun tam olarak nerede gerçekleştiği hala tam olarak belli değildir (73).

Literatür taraması yapıldığında, sıçanlarda ve farelerde TSSB modelleri uygulanan çalışmalarda, beyin hipokampus bölgesindeki BDNF düzeylerinin stres uygulaması ile genellikle azaldığı bildirilmiştir (74–76). Tekli uzatılmış stres modelinin uygulandığı bir çalışmada ise stres uygulaması ile

hipokampustaki BDNF düzeylerinin anlamlı olarak değişmediği, amigdaladaki düzeylerinin ise azaldığı bildirilmiştir (77). Literatür taramasında hayvan TSSB modellerinde pro-BDNF düzeyini araştıran bir çalışmaya rastlanamamıştır. Diğer stres uygulamaları ile pro-BDNF düzeyleri arasındaki ilişkiyi araştıran çalışmalarda ise farklı sonuçlar mevcuttur. Sıçanlarda sosyal izolasyon stresi uygulanan bir çalışmada serum pro-BDNF düzeylerinin azaldığı bildirilmiştir (78). Sıçanlara akustik stres uygulanan bir çalışmada ise serum pro-BDNF düzeylerinin arttığı bildirilmiştir (79). Ağır yaralanmalı kaza geçiren insanlarda yapılan bir çalışmada ise serum pro-BDNF düzeyleri ile depresyon şiddeti arasında ters ilişki bulunmuştur. TSSB ile pro-BDNF düzeyleri arasında ise bir ilişki bildirilmemiştir (80).

BDNF tropomiyozin reseptör kinaz b (TrkB) reseptörüne yüksek afinite ile bağlanır (81). Birçok çalışma BDNF-TrkB'nin sinaptik platisitede önemli bir rolü olduğunu göstermiştir. TrkB reseptörleri pre ve post sinaptik olarak eksprese edilir ve bu şekilde BDNF'nin nörotransmitter salınımını da düzenlediği gösterilmiştir (82). Stress ile birlikte TrkB düzeyleri ile ilgili literatür taramalarında da farklı sonuçlara ulaşılmıştır. Bu çalışmadakine benzer bir stres uygulanan bir çalışmada hipokampusdaki TrkB düzeylerinin azaldığı bildirilmiştir (83). Başka stres yöntemleri uygulanan bazı çalışmalarda ise TrkB düzeylerinin arttığı bildirilmiştir (84,85).

2.3.2.2. Hipotalamo-Pitüiter-Adrenal (HPA) Aks, CRH ve Kortizol

HPA aksı, vücutta dolaşan kortizol düzeyini, belirleyen hipotalamus, hipofiz ve adrenale bağlı hormonal kaskadı ve geri besleme döngüsünü ifade eder. Yoğun stresle ilgili deneyimlerin işlenmesinde, hipokampus, medial prefrontal korteks ve amigdaladan gelen norepinefrin ve dolaylı limbik girdiler, CRH içeren paraventriküler çekirdek nöronları üzerinden etki eder (86). HPA aksının aktivasyonu, hipofizyal portal damarlardan ön hipofize doğru ilerleyen CRH'nin salınmasıyla başlar ve burada CRH tip 1 reseptörlerine (CRF1) bağlanarak sistemik dolaşıma adrenokortikotropin (ACTH) salınımını uyarır. ACTH'ın adrenal korteksdeki zona fasikülatada, melanokortin 2 reseptörlerine

bağlanması, HPA aksının birincil efektör molekülü olan kortizol salınımını uyarır. Kortizol, insülini inhibe ederek kan glikoz düzeyini artırmak, bağışıklık sistemi fonksiyonlarını düzenlemek ve elektrolit dengesini etkilemek dahil olmak üzere stres yanıtını desteklemek için vücutta çeşitli etkilere neden olur (87). HPA aksının önemli bir özelliği kortizol tarafından negatif geri besleme yoluyla inhibe edilmesidir. Sağlıklı deneklerde kortizolün aktivitesi, hem CRH hem de ACTH salınımını azaltan, hipofiz ve hipotalamustaki glukokortikoid reseptörlerine bağlanma yoluyla sınırlanır. Bu nedenle kortizol, hem stres yanıtını sağlayan birincil molekül hem de devam eden HPA aksı aktivitesinin birincil inhibitörüdür.

CRH, HPA aksının bir parçası olarak ACTH salınımını stimüle etme rolüne ek olarak CRF1 ve CRF 2 reseptörlerine bağlanması yoluyla beyindeki çeşitli bölgelere etki eder. CRF reseptörlerinin en yüksek konsantrasyonları hipofizde olmasına rağmen, CRF1 ayrıca amigdala, hipokampus, beyincikte ve kortekste yaygın olarak bulunur. CRF2, CRF1 ile kısmen örtüşen bir kortikal dağılıma sahiptir; ancak beyincikte yoktur ve daha yaygın olarak periferik dokularda bulunur (88,89).

CRF reseptörlerinde etki etmek üzere serbest dolaşan CRH miktarı, hipokampus, amigdala, lateral septum ve karaciğerden eksprese edilen CRH bağlayıcı proteine (CRHBP) bağlanma oranıyla belirlenir (90). Vücuttaki CRH'nin yaklaşık %65-90'ı CRHBP'ye bağlıdır (91). Stresle CRH salınımının artması gibi, CRHBP seviyesi de artar. Böylece CRH'nin HPA stimüle edici etkisi, CRHBP'deki artış ile bir dereceye kadar tamponlanır (92).

Hayvan modellerinde yapılan çalışmalarda, TSSB'nin patofizyolojisinde aşırı CRH aktivitesinin rol oynadığını gösterilmiştir, ancak çelişkili veriler de mevcuttur. CRH'nin kemirgenlere uygulanmasının, uyku bozukluğu, yüksek akustik irkilme tepkisi ve artan koşullu korku tepkileri dahil olmak üzere TSSB ile ilişkili davranışlarda artışa sebep olduğu gösterilmiştir (93). CRF1 knock-out farelerin, vahşi tip farelere göre strese daha az duyarlı olduğu ve daha az kaygı benzeri davranışlar gösterdiği bildirilmiştir (90,94).

Kortizol, insanlarda birincil endojen glukokortikoiddir (GC). Kemirgenlerde, kortizolün GC eşdeğeri kortikosterondur. İnsanlar da

kortikosteron üretir, ancak kortizolden çok daha küçük miktarlarda bulunur ve esas olarak birincil mineralokortikoid hormon olan aldosterona dönüştürülür. Kortizol, en yüksek konsantrasyonları uyandıktan kısa bir süre sonra olan, en düşük konsantrasyonları ise uykunun orta saatlerinde meydana diurnal bir ritim ile salınır. Sağlıklı yetişkinlerde adrenal bezlerden günde yaklaşık 10 mg kortizol üretilse de, stres durumlarında günde 400 mg'a çıkabileceği gösterilmiştir (95,96). Plazmadaki kortizolün yaklaşık %95'i plazma proteinlerine bağlanır; biyolojik aktiviteye sahip olan serbest kortizoldür (97).

Yırtıcı hayvan kokusuna maruz bırakma yoluyla stres uygulanan ve daha sonra davranış deneylerindeki parametrelere göre strese yatkın ve değil şeklinde ikiye ayrılan sıçanların değerlendirildiği çalışmalarda stres sonrasında günün farklı saatlerinde glukokortikoid düzeyi değerlendirilmiştir. Stres duyarlı olan ratların stresten 7-8 gün sonra geç uyanıklık glukokortikoid düzeyleri, strese dayanıklı ve stres uygulanmayan ratlara göre yüksek bulunmuştur (98–100). Streten üç hafta sonra erken uyanıklık glukokortikoid düzeylerinin değerlendirildiği bir çalışmada strese yatkın olan ve olmayan (yani stres uygulanmayan) ratlardaki glukokortikoid düzeyleri, hiç strese maruz kalmayan ratlara göre daha düşük bulunmuştur (101). Bu bulgu insan çalışmalarıyla da uyumludur (102–104).

TSSB'li hastalar arasındaki kortizol konsantrasyonları çalışmaları arasında önemli farklılıklar vardır. Çalışmalar arasında, toplanan numune türlerinde (idrara, kan, tükürük, saç ve beyin omurilik sıvısı) ve numune toplama zamanlaması gibi durumlar bakımından önemli farklılıklar vardır. Ek olarak, cinsiyet, günün saati, alkol veya tütün kullanımı, yaş, diğer eşlik eden psikiyatrik ve tıbbi durumlar ve sosyal çevre dahil olmak üzere diğer bazı klinik özelliklerin HPA aktivitesini etkilediği bilinmektedir (105–107).

2.4. Melatonin

Bir nörohormon olan melatonin (N-asetil-5-metokstriptamin) asıl olarak pineal bezden salgılanır. Kan dolaşımına melatonin salgılanması esas olarak geceleri meydana gelir. Gün içinde ihmal edilebilir düzeyde salgılanır ve gece 02:00 ve 04:00 saatleri arasında plazma melatonin düzeyi doruk seviyelerine

ulaşır (108). Melatonin sirkadiyen ritm ve uyku-uyanıklık düzeninin regülasyonunda önemli bir rol oynar. Ayrıca sedatif, antioksidan, anksiyolitik, antidepresan, antikonvülsan ve analjezik aktiviteleri içeren çeşitli farmakolojik etkilere sahiptir (109).

Melatoninin etkileri G proteini kenetli MT1 ve MT2 reseptörlerinin aktivasyonu ile gerçekleşir (110). MT3 reseptörü ise kinonların elektron transfer reaksiyonlarını önleyerek oksidatif strese karşı koruma görevi olan bir enzimdir. Santral sinir sistemi içinde MT1 ve MT2 reseptörleri suprakiazmatik nükleus, korteks, talamus, serebellar korteks ve hipokampusta yer alır. MT1 reseptörleri ayrıca kaudat putamen, nükleus akumbens, substansia nigra ve ventrotegmental alan gibi diğer hipotalamik çekirdek ve beyin alanlarında bulunur (111,112).

Melatoninin TSSB etiyopatogenezindeki rolü tam olarak belirlenememesine rağmen, insanlarda yapılan bir çalışmada nokturnal melatonin düzeylerinin düşük olmasının TSSB geliştirme riskini artırdığı bildirilmiştir (113). Başka bir çalışmada strese maruz kaldıktan sonraki 48 saat içinde düşük melatonin düzeylerinin bulunması TSSB geliştirme yönünde riskli bulunmuştur (114). Başka yöntemlerle oluşturulan TSSB hayvan modellerinde melatonin uygulamasının, semptomlarda iyileşmeye yol açtığı bildirilmiştir (115–117). Melatoninin TSSB etiyolojisindeki yeri ile ilgili olarak, insan ve hayvan çalışmalarından elde edilen bilgiler, sirkadyen ritm ile ilişkili nöroendokrin, immün, metabolik ve otonomik disregülasyonun, sirkadyen ritmin bozulmasının TSSB patofizyolojisinde yeri olduğuna işaret etmektedir (118). Ayrıca pinealektomi uygulanan ratlarda hipokampusda oksidatif stres belirteçlerinin yükseldiği ve morfolojik değişikliklerin oluştuğu ve melatonin uygulaması ile bu değişikliklerin geri çevrildiği gösterilmiştir (119).

2.4.1. Pinealektomi Modeli

Melatonin kandaki en yüksek düzeyine gece ulaşan, sirkadyen ritmle esas olarak pineal bezden salınan bir hormondur. Sıçanlarda melatoninin eksikliğine bağlı etkiler üzerinde çalışma yapılacağı zaman pineal bezin çıkarılması işlemi uygulanır. Pinealektomi işleminin nasıl yapılacağı Kuszak ve

Rodin tarafından anlatılmıştır (120). Literatürdeki çalışmalara göre pinealektomi işlemi gerçekleştirildikten sonra melatonin eksikliğinin etkilerinin yerleşmesi için iki ay beklendikten sonra ilgili çalışmalar yapılmaktadır. Pinealektomi sonrasında melatonin salınımının amplitüdü %60-100 arasında azalmaktadır (121).

2.5. Ramelteon

Ramelteon şu anda insomnia tedavisi için reçete edilen ve kullanılan melatonin reseptör agonistidir. Ramelteon etkisini MT1 ve MT2 reseptörlerine yüksek afiniteyle bağlanarak gösterir. Melatonin ile kıyaslandığında ramelteon insan MT1 ve MT2 reseptörlerine 3-5 kat daha yüksek afinite ile bağlanır ve 17 kat daha potenttir (122). In vitro beyin çalışmalarına göre, ramelteonun MT3 bağlanma bölgesine olan afinitesi ihmal edilebilir düzeydedir. Bu melatonin bağlanma bölgesi kinon redüktaz 2'nin melatonine hassas bir formu olarak tanımlanmıştır ve uyku uyanıklık döngüsü ile alakası olmadığı düşünülmektedir (123,124). Ramelteon 10 µM'lık derişimde test edildiğinde santral sinir sistemindeki çeşitli reseptörlere ve bağlayıcılara önemli bir bağlanma göstermediği, 10-100 µM'lık derişimde test edildiğinde ise çeşitli enzimlerin aktivitesi üzerinde bir etkisi bulunmadığı bildirilmiştir (122). Ramelteon'un GABA, serotonin, asetilkolin, glutamat, noradrenalin, opioid, histamin ve dopamin reseptörlerine afinitesinin ihmal edilebilir düzeyde olması önemlidir, bu sayede bu reseptörlerin aktivasyonuna dayanan ikincil veya artık bir etkisi yoktur. Ramelteonun yarılanma ömrü 1 ile 2.6 saat arasında değişmektedir, hızlı bir şekilde ilk geçiş eliminasyonuna uğrar, serum pik konsantrasyonuna 1 saatten daha az bir sürede ulaşır ve çoklu uygulamalarda herhangi bir dokuda birikim göstermemiştir (125,126).

Literatürde ramelteonun TSSB'deki olası etkinliğine ilişkin sadece tek bir çalışma grubunun yapmış olduğu 3 adet prelinik çalışma vardır. Bu çalışmalarda, stres-tekrar stres modelinden farklı olarak Fabp3 geninin elimine edilmesiyle TSSB benzeri davranışlar sergileyen fareler kullanılmıştır. Bu çalışmalarda ramelteonun TSSB benzeri davranışları antagonize ettiği gösterilmiştir (127–129).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Deney Grupları

Bu araştırmada, ramelteonun ve melatoninin posttravmatik stres bozukluğu modelindeki etkinliklerini aydınlatmak üzere sıçan posttravmatik stres modeli oluşturulmuştur. Manisa Celal Bayar Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulundan etik kurul onayı alınmıştır (Karar tarih/no: 07/07/2020 / 77.637.435 / 160). Çalışmada, Celal Bayar Üniversitesi Deney Hayvanları Araştırma ve Uygulama Merkezi'nden temin edilen olan yaklaşık 8 haftalık ve 250 g civarında Erkek Wistar sıçanlar kullanılmıştır. Sıçanlar her bir grupta 11 hayvan bulunacak şekilde, 8 ayrı gruba ayrılmıştır.

1. Grup: Kontrol
2. Grup: Stres + Çözücü
3. Grup: Stres + Melatonin (3 mg /kg)
4. Grup: Stres + Ramelteon (3 mg /kg)
5. Grup: Pinealektomi (Px)
6. Grup: Pinealektomi + Çözücü
7. Grup: Pinealektomi + Melatonin (3 mg /kg)
8. Grup: Pinealektomi + Ramelteon (3 mg /kg)

Kontrol grupları hariç tüm gruplara stres uygulanmıştır.

3.2. Pinealektomi İşlemi

Pinealektomi grubu olarak belirlenen deney hayvanları ketamin + ksilazin anestezisi altında karınları üzerine yatırılarak kafa derisi orta hat boyunca bisturi yardımıyla kesilmiştir. Transvers ve sagittal sütürlerin kesişim noktası ortaya çıkarılarak ve bu noktayı içine alan kemik flebi oluşturulmuştur. Kemik flebi kaldırıldıktan sonra dura, süperior sagittal ve transvers sinüslerin kesişim noktasından yarım ay şeklinde kesilmiştir. Kesilen dura ince bir penset yardımıyla kaldırılmıştır. Daha sonra pineal bez tutularak çıkartılmıştır. Kemik flebi yerine konularak kafa derisi 3/0 atravmatik ipek ile sütüre edilmiştir (130).

Pinealektomi işlemi her bir sıçan için çıkarılan dokunun histolojik olarak değerlendirilmesi sonucu doğrulanmıştır.

Bu cerrahi işlem uygulandıktan sonra pinealektomi modelinin hormonal etkilerinin yerleşmesi için 2 ay boyunca hiçbir işlem uygulanmadan standart laboratuvar koşullarında hayvanlar barındırılmışlardır.

3.3. Deney Protokolü

Sıçanlar hayvan üretim merkezinden teslim alındıktan sonra 2 hafta boyunca ters ışık döngüsüne alışmaları için hiçbir işlem yapılmadan bekletilmiştir. 2 hafta sonunda Açık Alan (AA) ve Yüksek Artı Labirent (YAL) testleri uygulanmıştır. Bu ölçümlerden sonra sıçan posttravmatik stres modelini oluşturmak için sırası ile 2 saat boyunca tüpte sıkıştırma, 20 dakika zorlu yüzdürme ve 15 dakika dinlenmelerine müsaade ettikten sonra eter anestezisi uygulanmıştır. Bu streslerden hemen sonra ilaç tedavisine başlanmıştır ve ilaç tedavisi 14 gün boyunca devam etmiştir. 14 günün sonunda AA ve YAL testleri tekrar uygulanmıştır.

3.3.1. Stres-Tekrar Stres Modeli

Bu çalışmada TSSB modeli oluşturmada etkin olduğu bilinen stress-tekrar stress modeli uygulanmıştır. İki hafta süren adaptasyon sürecinden sonra, hayvanlara art arda olacak şekilde, ilk önce 2 saat boyunca immobilize eden sıkıştırma, 20 dakika boyunca 25°C suda zorlu yüzdürme, 15 dakika kurulama ve hayvanın dinlenmesine müsaade etme ve sonra eter anestezisi uygulanmıştır. 1 hafta boyunca hiçbir müdahalede bulunulmayıp, 7. gün hatırlatıcı stres olarak yine 25°C suda zorlu yüzdürme uygulanmıştır. Hatırlatıcı stresten 1 hafta sonra ise AA ve YAL testleri yapılmış ve sonrasında kan ve doku örnekleri alınmıştır (131). Kontrol gruplarına ise hiçbir stres uygulanmamış ve standart ortam koşullarında tutulmuşlardır.

3.4. Davranış Deneyleri

3.4.1. Yüksek Artı Labirent (YAL) Testi

Sıçanlar yerden 60 cm yükseklikteki artı biçimindeki labirent şeklinde ve karşılıklı iki kolu (her biri 42x14.5 cm) 22,5 cm yüksekliğinde duvarlar ile kapalı

olan, diğerk 2 kolu ise açık olan YAL aygıtına yerleştirilmişlerdir. Deney aşamasında her bir sıçan merkezdeki kare biçimindeki alana, yüzleri açık kollardan birine bakacak şekilde bırakılmıştır ve 5 dakika boyunca labirenti araştırmalarına izin verilmiştir. Labirentin üst tarafına kayıt için bir kamera monte edilmiştir. Her bir sıçanın testi bittikten sonra labirent %70 konsantrasyonlu etil alkol ile temizlenmiştir daha sonra distile su ile tekrar silinip sonra kurutmak için kağıt havlu ile silinmiştir (132).

3.4.2. Açık Alan (AA) Testi

Bu testte sıçanlar 100x100x40 cm ebatlarında, bir açık alanın köşesine yerleştirilmişlerdir. Alan, transvers çizgiler ile bilgisayar ortamında 25 eşit kareye bölünmüştür. Her bir sıçan alanda, aynı köşeye ve aynı doğrultuda bırakılmıştır ve 5 dakika süreyle serbest şekilde gezinmesine izin verilmiştir. Her iki arka ayak bir kareye girdiğinde, bir giriş/geçiş olarak kaydedilmiştir. Bu giriş/geçişlerin ve arka ayaklar üzerinde doğrulmaların sayısı lokomotor ve araştırıcı aktivite olarak değerlendirilmiştir. Ayrıca toplam kat edilen mesafe, çaprazlanan sınırların sayısı, merkezde geçirilen süre de kaydedilmiştir. Locomotor aktivenin düzeyinin tespit edilmesinin yanı sıra anksiyete durumunu anlamak için de kullanılan bir testtir. Anksiyeteli hayvanların açık alanın ortasında geçirdikleri süre azalır, duvar kenarlarında daha çok zaman geçirir (133).

3.5. Biyokimyasal Analizler

3.5.1. Kan Örneklerinin Alınması ve Kortizol Düzeyinin

Çalışılması

Deney sürecinin tamamlanmasını takiben sıçanlardan saat 08:00-12:00 arasında anestezi altında kardiyak ponksiyon ile sarı kapaklı jelli tüplere kan numuneleri alınmıştır. Daha sonra bu numuneler oda sıcaklığında 20 dakika boyunca pıhtılaştıktan sonra 4000 RPM'de 10 dakika boyunca santrifüj edilmiştir. Sonra elde edilen serum etiketlenmiş eppendorf tüplerine alınarak çalışılacak güne kadar -80 derecede muhafaza edilmiştir.

Elde edilen serumlardan hastane biyokimya laboratuvarında hizmet alımı yoluyla kortizol düzeyi çalışılmıştır.

Kan örneklerinin alınımından hemen sonra sıçanlar sakrifiye edilerek cerrahi prosedüre uygun olarak beyinler çıkarılmıştır. Beyinlerin yarısı daha sonra çalışılmak üzere formaldehit içeren tüplere konmuştur. Kalan yarısı ise uygun şekilde sıvı azotta dondurulmuştur ve daha sonra hipokampuslarının çıkarılıp çalışılması için -80°C'de saklanmıştır.

3.5.2. Beyin Örneklerinin Alınması, Hipokampusun Çıkarılması ve Protein Düzeylerinin Çalışılması

Hipokampus dokularının analiz edileceği zaman beyinler -80°C'den sırası ile çıkartılıp buz kasetleri üzerinde çalışma için uygun sıcaklığa gelmesi beklenmiştir. Uygun zaman geldiğinde hipokampuslar beyin içinden izole edilip, hassas terazi ile tartılıp, tampon çözelti ile birlikte homojenize edilmiştir. Elde edilen homojenat 2000-3000 RPM'de santrifüj edilmiştir ve elde edilen süpernatant çalışılacak güne kadar -80°C'de muhafaza edilmiştir. Çalışma öncesi süpernatantlar oda sıcaklığına getirilmiştir ve proBDNF, BDNF, CRH, TrkB düzeyleri ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) yöntemi kullanılarak kit protokolüne uygun olarak çalışılmış ve mikroparka okuyucu cihaz ile analiz edilmiştir.

3.6. Histopatolojik Analizler

Rotary mikrotom (RM 2135, Leica) aracılığı ile alınan 5 µm'lik parafin kesitler deparafinizasyon işlemi için 1 gece 60°C'lik etüvde bırakıldıktan sonra, 30'ar dakika iki değişim ksilene tabi tutuldu. Ardından rehidratasyon işlemi için %95'ten %60'a azalan alkol serilerinden geçirilen kesitler 5 dakika akarsu altında yıkandı. Kesitler 2 dakika hematoksilin ile boyamanın ardından, fazla boyanın dokudan uzaklaştırılması için 5 dakika akar suda yıkanan kesitler 30 saniye eozin ile boyandı. Aynı şekilde 5 dakika akar su altında yıkama yapıldıktan sonra sırasıyla %80 ve %95'lik alkol serilerinden geçirilip havada kurutulan kesitler şeffaflaştırma amacıyla 30'ar dakika iki değişim ksilende tutulduktan sonra entellan ile kapatıldı. Işık mikroskopunda incelenerek gruplar

arasındaki farklılıklar değerlendirildi. Kesitler patolojik hasar yönünden iki histolog tarafından kör yöntemler +1 ile +5 aralığında değerlendirilerek istatistiksel analizi yapıldı.

3.6.1. İndirekt İmmunohistokimya Boyaması

Alınan kesitler immunohistokimyasal boyama için bir gece 60°C'lik etüvde tutulduktan sonra, 30'ar dakika iki saat değişim ksilen ile şeffaflaştırma işlemi gerçekleştirildi. Ardından %95'ten %60'a azalan derecede alkol serileri ile rehidratasyon sağlanarak distile suda 5 dakika bekletildi. Dakopen ile sınırlandırılan %0,5'lik tripsin solüsyonu içinde oda sıcaklığında 15 dakika tutulan kesitlere, doku endojen peroksidazını inhibe etmek amacıyla 5 dakika %3'lük H₂O₂ uygulandı. 3 defa 5'er dakika fosfat tampon solüsyonu (PBS; Posphate buffer solution) ile yıkanan kesitlere bloklama amacıyla 1 saat bloklama solusyonu ile muamele edildi. Bloklama solusyonu dokudan uzaklaştırıldıktan sonra primer antikorlar anti-proBDNF, anti-BDNF, anti-CRH, anti-TrkB ile bir gece inkübe edildi. Ertesi gün tampon solüsyonu ile 3 defa yıkanan kesitler, anti-mouse biotin-streptavidin hidrojen peroksidaz ikincil antikor ile 30'ar dakika boyandı. Yine üç defa 5'er dakika tampon solüsyonu ile yıkanan kesitler, oluşturulan immunohistokimyasal reaksiyonun görünürlüğünü saptamak amacıyla DAB ile 5 dakika boyandı. Mayer's hematoksilen ile artalan boyaması sağlandıktan sonra distile su ile 10 dakika yıkanan kesitler kapatma medyum ile kapatıldı. İmmunohistokimyasal değerlendirme incelenerek zayıf (+), orta (++) ve şiddetli (+++) olarak değerlendirildi. Boyanan hücre miktarı H-skor yöntemiyle hesaplandı ve veriler istatistiksel olarak analiz edildi.

3.7. İstatistiksel Analiz

Bilgisayar ortamına dijital veri olarak aktarılan kayıt verileri SPSS for Windows 13.0 istatistik programında analiz edilmiştir. Gruplar arası karşılaştırmalar için tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve Tukey's B testi; her bir grubun stres öncesi ve sonrası farklılıkları için paired-t testi kullanılmıştır. Veriler ortalama $\pm$ standart hata (SH) olarak verilmiştir. $p < 0,05$ olduğunda istatistiksel olarak anlamlı farklılık kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. Davranış Deneyleri

4.1.1. Yüksek Artı Labirent

Yüksek artı labirent testinde, normal ya da pinealektomi yapılmış sıçanlarda stres-tekrar stres uygulanmasına bağlı gruplara ait veriler one-way anova kullanılarak değerlendirilmiş ve Tablo 4.1’de gösterilmiştir.

Tablo 4.1. Sıçanlarda posttravmatik stres modelinde yüksek artı labirent testinde ölçülen parametrelerin gruplar arasında karşılaştırılması (one-way anova). Mel: melatonin 3 mg/kg, Ram: ramelteon 3 mg/kg, Px: Pinealektomi. n=9-11 her bir grup için

Gruplar	Kat Edilen Mesafe(m)	Mobil Zaman (s)	İmmobil Zaman (s)	Şahlanma Sayısı	Açık Kolda Geçirilen Zaman(s)
Kontrol	3.8±0.6	52.9±8.2	247.1±8.2	6.9±2.0	17.8±5.5
Stres	4.0±1.2	62.9±16.0	237.1±16.0	7.0±2.1	23.4±7.5
Stres + Mel	3.1±0.8	47.9±11.7	252.1±11.7	6.8±2.3	51.3±27.7
Stres + Ram	3.5±0.8	66.7±12.3	206.7±21.2	7.8±2.5	39.3±10.9
Px	1.2±0.3	16.3±3.2	283.7±3.2	2.6±0.7	36.6±12,7
Px + Stres	1.1±0.3	13.0±4.3	287.0±4.3	1.7±0.6	3,1±1.3
Px + Stres+ Mel	1.8±0.3	19.0±4.6	260.3±19.2	2.5±0.7	31.4±11.4
Px + Stres + Ram	2.2±0.7	28.4±8.4	271.6±8.4	3.4±0.4	65.9±21.7

Deney gruplarının ortalamaları one-way anova ile karşılaştırıldığında, pinealektomi uygulanmamış grupta, stres-tekrar stres uygulaması anlamlı bir anksiyete artışına neden olmamıştır. Melatonin ve ramelteon gruplarında da

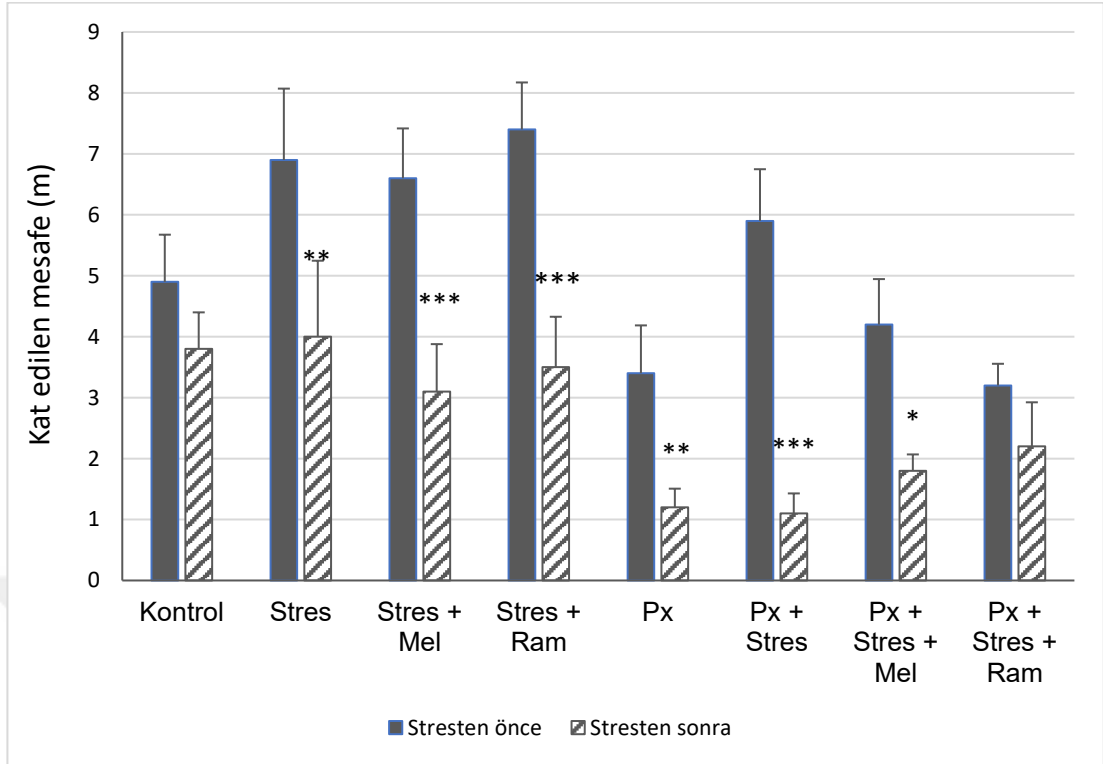
kontrol ve stres gruplarına göre davranış parametrelerinde anlamlı bir değişiklik gösterilememiştir (Tablo 4.1).

Pinealektomi işlemi uygulanan sıçanlarda kat edilen mesafenin, kontrol sıçanlara göre düşme eğiliminde olduğu gösterilmiştir. Pinealektomi işlemi uygulanan gruplardaki stres uygulamasının bu mesafe üzerine fazladan bir etkisi gözlenmemiştir. Melatonin ve ramelteon tedavisi uygulanan pinealektomili gruplarda bu mesafenin artma eğiliminde olduğu gösterilmiştir (Tablo 4.1).

Mobil olarak geçen süre de benzer şekilde, pinealektomi uygulanan sıçanlarda kontrol grubuna göre azalma eğilimi göstermektedir. Pinealektomi işlemi uygulanan gruplardaki stres uygulamasının süre üzerine fazladan bir etkisi gözlenmemiştir. Melatonin ve ramelteon tedavisi uygulanan pinealektomili gruplarda mobil sürenin artma eğiliminde olduğu gösterilmiştir (Tablo 4.1).

Açık kolda geçirilen süre değerlendirildiğinde, pinealektomiye bağlı bir etki gözlenmezken; pinealektomili grupta stres uygulaması bu süreyi azaltmış, melatonin ve ramelteon uygulaması ise bu azalmayı ortadan kaldırmıştır. Ancak bu farklılıklar, istatistiksel olarak anlamlılık düzeyine ulaşmamıştır (Tablo 4.1).

Yüksek artı labirent testinde, normal ya da pinealektomi yapılmış sıçanlarda stres-tekrar stres uygulanmasına bağlı gruplara ait veriler paired t-test kullanılarak değerlendirilmiş ve Şekil 4.1-4.6'da gösterilmiştir.



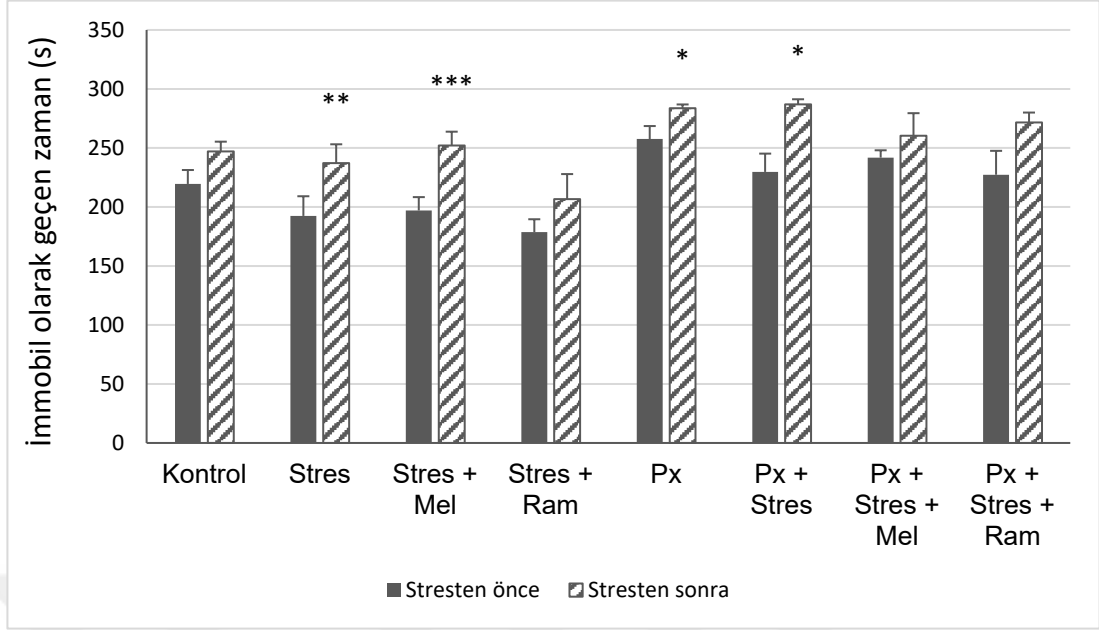
Şekil 4.1 Sıçanlarda posttravmatik stres modelinde yüksek artı labirent testinde her bir grupta aynı sıçanın deney öncesi (0. gün) ve deney sonrası (14. gün) kat edilen mesafe değerlerinin karşılaştırılması. Koyu renkli sütun deney öncesi, çizgili sütun ise deney sonrası ölçümleri göstermektedir. Mel: melatonin 3 mg/kg, Ram: ramelteon 3 mg/kg, Px: Pinealektomi. İstatistiksel farklılıklar, her bir grubun deney öncesi ve sonrası farklılıkları (paired-t testi) olarak hesaplanmıştır. (*; $p < 0,05$, **; $p < 0,01$, ***; $p < 0,001$)

YAL testinde kat edilen mesafe, pinealektomi uygulanmamış grupta, paired t-test kullanılarak karşılaştırıldığında, strese bağlı olarak kat edilen mesafenin azaldığı; ancak melatonin ve ramelteon uygulamasının da bunu geri çeviremediği gözlenmiştir. Pinealektomi uygulanan grupta da stres sonrasında kat edilen mesafe anlamlı olarak azalmış; ramelteon tedavisi ise bu etkiyi geri çevirmiştir (Şekil 4.1).



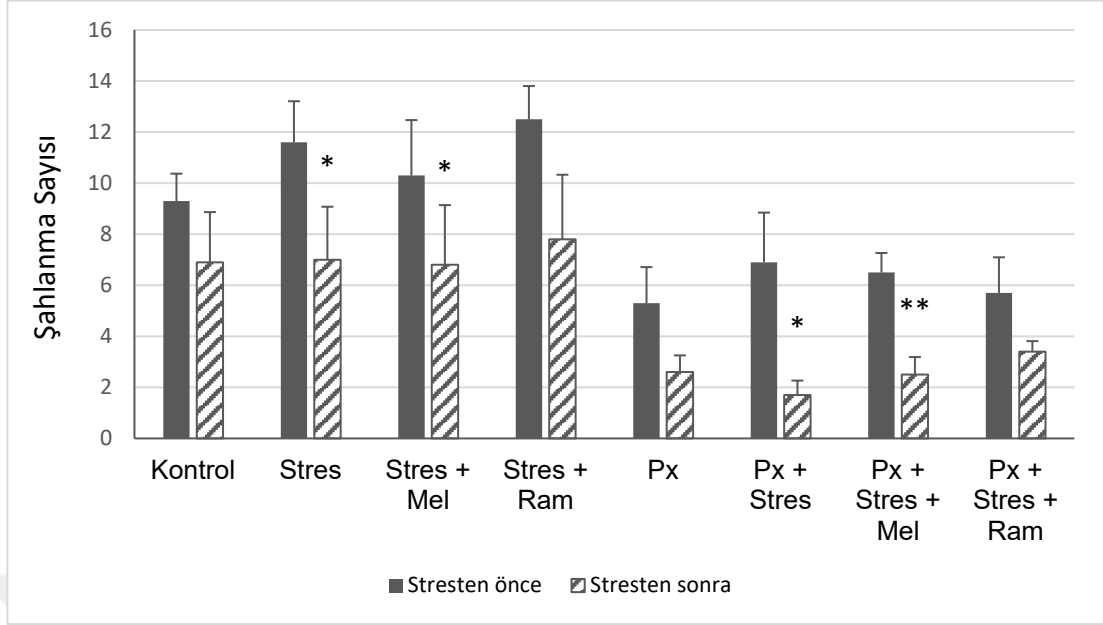
Şekil 4.2 Sıçanlarda posttravmatik stres modelinde yüksek artı labirent testinde her bir grupta aynı sıçanın deney öncesi (0. gün) ve deney sonrası (14. gün) mobil olarak geçen zaman değerlerinin karşılaştırılması. Koyu renkli sütun deney öncesi, çizgili sütun ise deney sonrası ölçümleri göstermektedir. Mel: melatonin 3 mg/kg, Ram: ramelteon 3 mg/kg, Px: Pinealektomi. İstatistiksel farklılıklar, her bir grubun deney öncesi ve sonrası farklılıkları (paired-t testi) olarak hesaplanmıştır. (*; $p<0,05$, **; $p<0,01$, ***; $p<0,001$)

YAL testinde mobil olarak geçen zaman, pinealektomi uygulanmamış grupta, paired t-test kullanılarak karşılaştırıldığında, strese bağlı olarak kat edilen mesafenin azaldığı; ancak melatonin ve ramelteon uygulamasının da bunu geri çeviremediği gözlenmiştir. Pinealektomi uygulanan grupta da stres sonrasında mobil olarak geçen zaman anlamlı olarak azalmış; melatonin ve ramelteon tedavisi ise bu etkiyi geri çevirememiştir (Şekil 4.2).



Şekil 4.3 Sıçanlarda posttravmatik stres modelinde yüksek artı labirent testinde her bir grupta aynı sıçanın deney öncesi (0. gün) ve deney sonrası (14. gün) immobil olarak geçen zaman değerlerinin karşılaştırılması. Koyu renkli sütun deney öncesi, çizgili sütun ise deney sonrası ölçümleri göstermektedir. Mel: melatonin 3 mg/kg, Ram: ramelteon 3 mg/kg, Px: Pinealektomi. İstatistiksel farklılıklar, her bir grubun deney öncesi ve sonrası farklılıkları (paired-t testi) olarak hesaplanmıştır. (*; $p < 0,05$, **; $p < 0,01$, ***; $p < 0,001$)

YAL testinde immobil olarak geçen zaman, pinealektomi uygulanmamış grupta, paired t-test kullanılarak karşılaştırıldığında, strese bağlı olarak immobil olarak geçen zamanın arttığı; ramelteon uygulamasının ise bunu geri çevirdiği gözlenmiştir. Pinealektomi uygulanan grupta da stres sonrasında immobil olarak geçen zaman anlamlı olarak artmış; melatonin ve ramelteon uygulaması ise bu etkiyi geri çevirmiştir (Şekil 4.3).



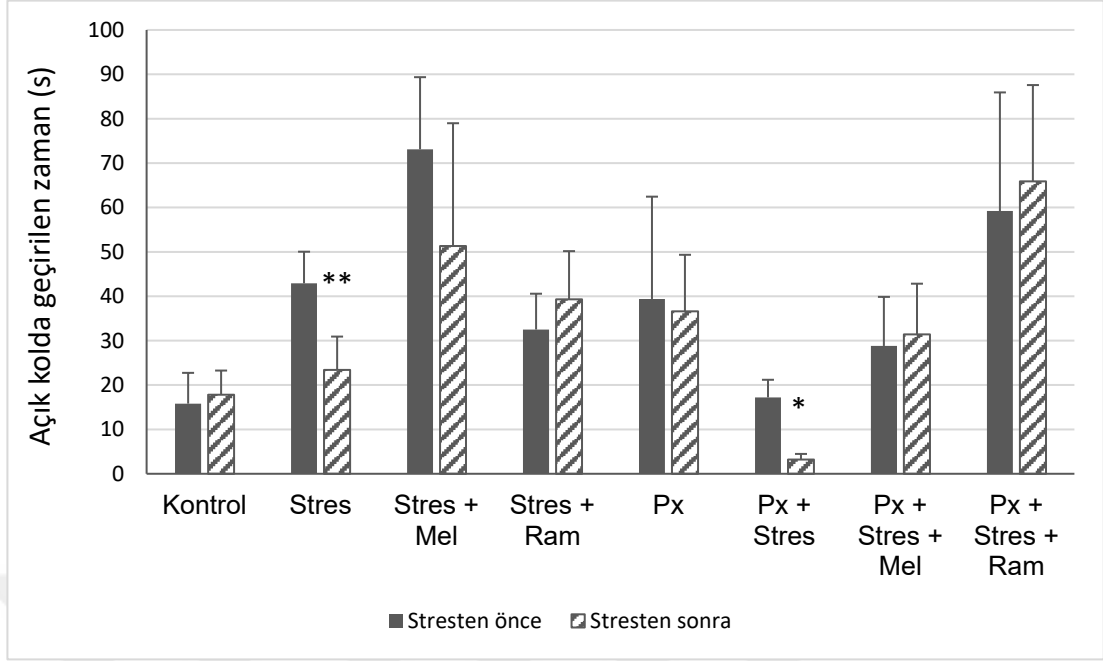
Şekil 4.4 Sıçanlarda posttravmatik stres modelinde yüksek artı labirent testinde her bir grupta aynı sıçanın deney öncesi (0. gün) ve deney sonrası (14. gün) şahlanma sayısı değerlerinin karşılaştırılması. Koyu renkli sütun deney öncesi, çizgili sütun ise deney sonrası ölçümleri göstermektedir. Mel: melatonin 3 mg/kg, Ram: ramelteon 3 mg/kg, Px: Pinealektomi. İstatistiksel farklılıklar, her bir grubun deney öncesi ve sonrası farklılıkları (paired-t testi) olarak hesaplanmıştır. (*; $p < 0,05$, **; $p < 0,01$, ***; $p < 0,001$)

YAL testinde şahlanma sayısı, pinealektomi uygulanmamış grupta, paired t-test kullanılarak karşılaştırıldığında, strese bağlı olarak şahlanma sayısının azaldığı; ramelteon uygulamasının ise bunu geri çevirdiği gözlenmiştir. Pinealektomi uygulanan grupta da benzer şekilde; strese bağlı olarak şahlanma sayısı azalmış; ramelteon uygulaması ise bunu geri çevirmiştir (Şekil 4.4).



Şekil 4.5 Sıçanlarda posttravmatik stres modelinde yüksek artı labirent testinde her bir grupta aynı sıçanın deney öncesi (0. gün) ve deney sonrası (14. gün) kapalı kolda geçirilen zaman değerlerinin karşılaştırılması. Koyu renkli sütun deney öncesi, çizgili sütun ise deney sonrası ölçümleri göstermektedir. Mel: melatonin 3 mg/kg, Ram: ramelteon 3 mg/kg, Px: Pinealektomi. İstatistiksel farklılıklar, her bir grubun deney öncesi ve sonrası farklılıkları (paired-t testi) olarak hesaplanmıştır. (*; $p < 0,05$, **; $p < 0,01$, ***; $p < 0,001$)

YAL testinde kapalı kolda geçirilen zaman değerleri, paired t-test kullanılarak karşılaştırıldığında, hem pinealektomi uygulanan hem de uygulanmamış gruplardaki değerler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunamamıştır (Şekil 4.5).



Şekil 4.6 Sıçanlarda posttravmatik stres modelinde yüksek artı labirent testinde her bir grupta aynı sıçanın deney öncesi (0. gün) ve deney sonrası (14. gün) açık kolda geçirilen zaman değerlerinin karşılaştırılması. Koyu renkli sütun deney öncesi, çizgili sütun ise deney sonrası ölçümleri göstermektedir. Mel: melatonin 3 mg/kg, Ram: ramelteon 3 mg/kg, Px: Pinealektomi. İstatistiksel farklılıklar, her bir grubun deney öncesi ve sonrası farklılıkları (paired-t testi) olarak hesaplanmıştır. (*; $p < 0,05$, **; $p < 0,01$, ***; $p < 0,001$)

YAL testinde açık kolda geçirilen zaman, pinealektomi uygulanmamış grupta, paired t-test kullanılarak karşılaştırıldığında, strese bağlı olarak açık kolda geçirilen sürenin azaldığı; melatonin ve ramelteon uygulamalarının ise bunu geri çevirdiği gözlenmiştir. Pinealektomi uygulanan grupta da benzer şekilde; açık kolda geçirilen zaman azalmış; melatonin ve ramelteon uygulamaları ise bunu geri çevirmiştir (Şekil 4.6).

4.1.2. Açık Alan Testi

Açık alan testinde, normal ya da pinealektomi yapılmış sıçanlarda stres-tekrar stres uygulanmasına bağlı gruplara ait veriler one-way anova kullanılarak değerlendirilmiş ve Tablo 4.2’de gösterilmiştir.

Tablo 4.2. Sıçanlarda posttravmatik stres modelinde açık alan testinde ölçülen parametrelerin gruplar arasında karşılaştırılması (one-way anova). Mel: melatonin 3 mg/kg, Ram: ramelteon 3 mg/kg, Px: Pinealektomi. n=9-11 her bir grup için

GRUPLAR	MESAFE (m)	MOBİL ZAMAN(s)	İMMOBİL ZAMAN(s)	ÇİZGİ ÜZERİNDEN GEÇİŞ SAYISI	ÖZBAKIM (S)	ŞAHLANMA SAYISI
Kontrol	5.4±1.2	59.6±10.6	240.4±10.6	33.6±8.3	9.4±4.7	4.4±1.3
Stres	5.3±1.6	53.3±11.3	246.7±11.3	32.4±9.5	9.9±5.0	4.3±1.6
Stres + Mel	5.7±1.8	62.1±17.5	237.9±17.5	36.6±11.3	6.6±3.6	5.6±2.0
Stres + Ram	6.2±1.6	60.4±14.1	239.6±14.1	40.7±10.5	9.6±5.3	6.2±2.3
Px	3.4±1.5	31.3±9.9	268.7±9.9	22.3±9.4	6.3±3.1	3.0±1.1
Px + Stres	3.7±0.9	41.3±7.9	258.7±7.9	23.8±6.6	3.6±2.9	2.4±1.0
Px + Stres + Mel	3.7±0.7	36.5±7.9	240.0±11.9	22.5±4.4	16.0±10.3	4.9±1.6
Px + Stres + Ram	6.6±1.0	57.9±6.8	238.1±7.1	43.4±5.8	8.6±4.7	6.3±1.5

Deney gruplarının ortalamaları one-way anova ile karşılaştırıldığında, pinealektomi uygulanmamış ve uygulanmış gruplarda, stres-tekrar stres uygulaması anlamlı bir anksiyete artışına neden olmamıştır. Melatonin ve ramelteon gruplarında da kontrol ve stres gruplarına göre davranış parametrelerinde anlamlı bir değişiklik gösterilememiştir (Tablo 4.2).

Pinealektomi işlemi uygulanan sıçanlarda kat edilen mesafenin, uygulanmayan kontrol grubuna göre azalma eğiliminde olduğu gösterilmiştir;

ancak istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunamamıştır. Pinealektomi işlemi uygulanan gruplardaki stres uygulamasının bu mesafe üzerine fazladan bir etkisi gözlenmemiştir. Ramelteon uygulamasının ise pinealektomili grupta, kat edilen mesafeyi artırma eğiliminde olduğu gösterilmiştir (Tablo 4.2).

Mobil olarak geçen süre, pinealektomi uygulanan sıçanlarda uygulanmayan kontrol grubuna göre azalma eğilimi göstermektedir; ancak istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunamamıştır. Ramelteon uygulamasının ise pinealektomili grupta, mobil zamanı artırma eğiliminde olduğu gösterilmiştir (Tablo 4.2).

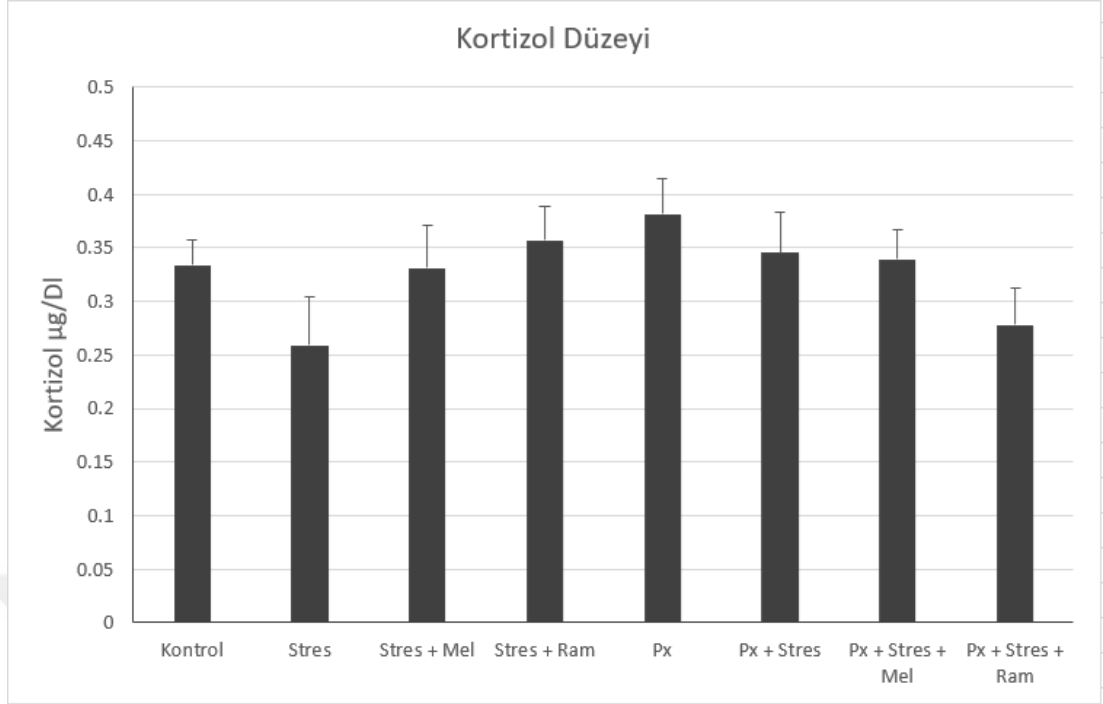
Çizgi üzerinden geçme sayısı, pinealektomi uygulanan sıçanlarda uygulanmayan kontrol grubuna göre azalma eğilimi göstermektedir. Ramelteon uygulamasının ise, pinealektomili grupta, çizgi üzerinden geçme sayısını artırma eğiliminde olduğu gösterilmiştir (Tablo 4.2).

AAT'de paired-t test ile yapılan analizlerde anlamlı bir sonuç veya eğilim gösterilemediği için tablo ve grafikler eklenmemiştir.

4.2. Biyokimyasal Bulgular

4.2.1. Kan Kortizol Düzeyleri

Normal ya da pinealektomi yapılmış sıçanlarda stres-tekrar stres uygulanmasına bağlı gruplara ait kan kortizol düzeyleri one-way anova kullanılarak değerlendirilmiş ve Şekil 4.7'de gösterilmiştir.

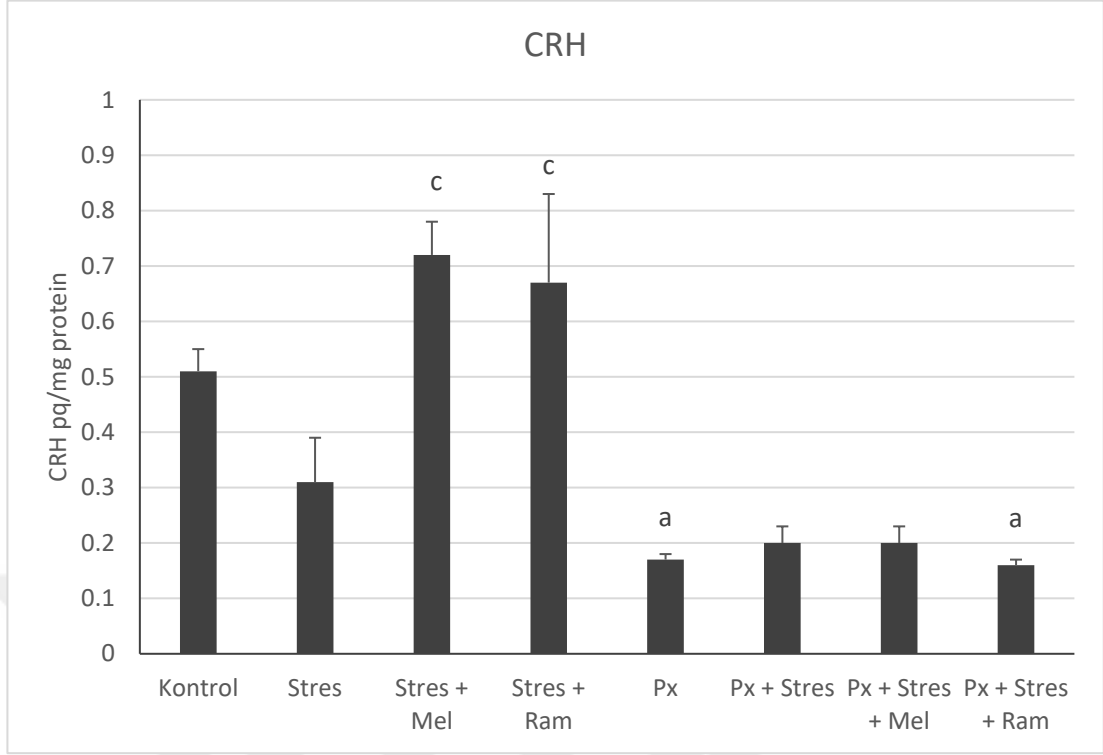


Şekil 4.7. Sıçanlarda posttravmatik stres modelinde deney sonunda (14. gün) elde edilen kan kortizol düzeylerinin gruplar arasında karşılaştırılması. Mel: melatonin 3 mg/kg, Ram: ramelteon 3 mg/kg, Px: Pinealektomi. n=9-11 her bir grup için

Kan kortizol düzeyleri bakımından gruplar arası anlamlı bir farklılık bulunamamıştır.

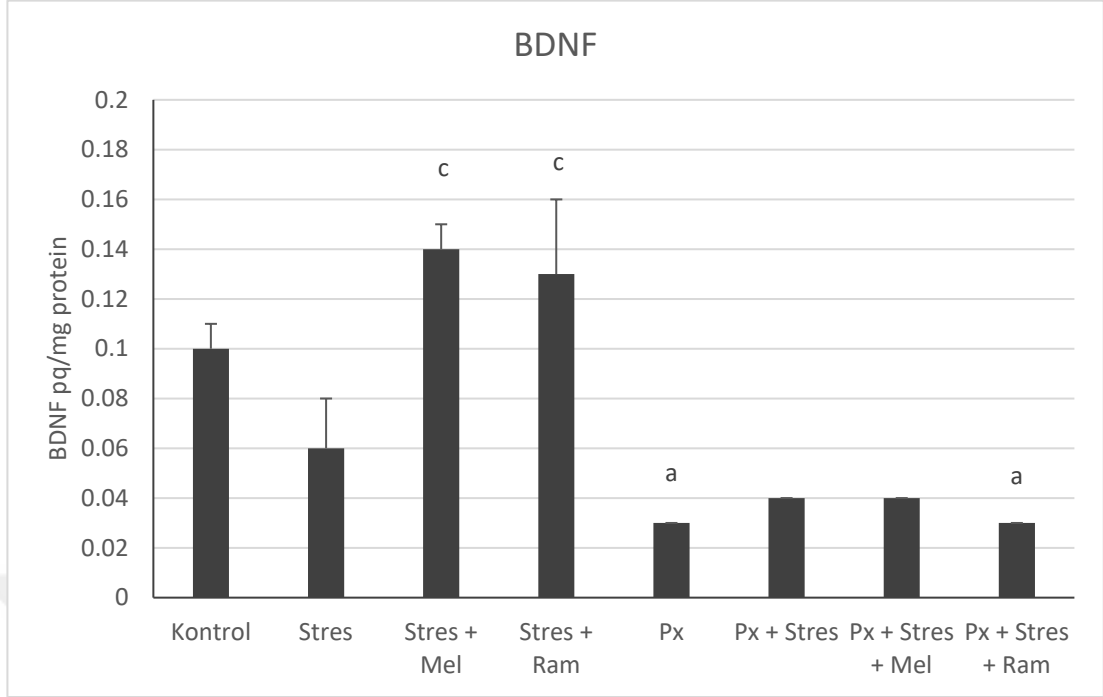
4.2.2. ELISA Protein Düzeyleri

Beyin hipokampus bölgesinde, normal ya da pinealektomi yapılmış sıçanlarda stres-tekrar stres uygulanmasına bağlı gruplara ait protein düzeyleri one-way anova kullanılarak değerlendirilmiş ve Şekil 4.8-4.11’de gösterilmiştir.



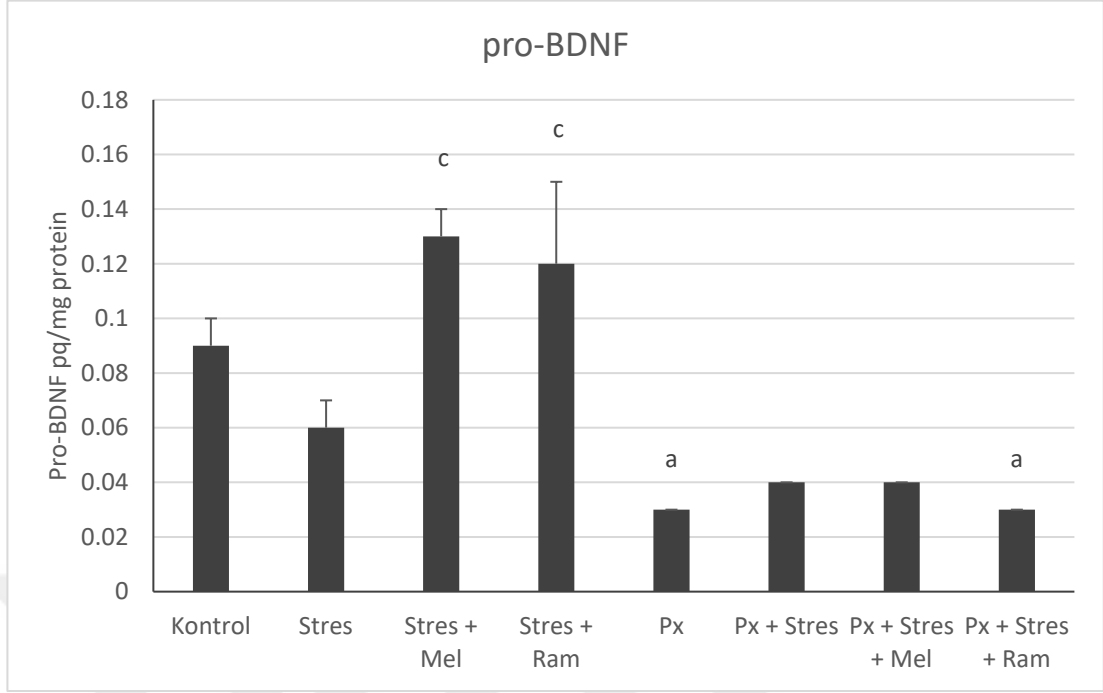
Şekil 4.8 Sıçanlarda posttravmatik stres modelinde deney sonunda ELISA yöntemiyle çalışılan CRH'nin hipokampus bölgesindeki düzeylerinin gruplar arasında karşılaştırılması. Mel: melatonin 3 mg/kg, Ram: ramelteon 3 mg/kg, Px: Pinealektomi. a: Kontrolden anlamlı olarak farklı, b: Px vs Px+stres anlamlı farklılık, c: Tedavinin (melatonin ya da ramelteon) etkisi (tedaviye bağlı anlamlı farklılık), ($p < 0,05$), $n = 9-11$ her bir grup için

Beyin hipokampus bölgesindeki CRH protein düzeylerinde, stres-tekrar strese bağlı olarak azalma görülmüş olmakla beraber, istatistiksel olarak anlamlılık gösterilememiştir. Stres uygulanan sıçanlarda melatonin ve ramelteon uygulamaları ise, CRH düzeylerinde anlamlı bir artışa neden olmuştur. Pinealektomi yapılmış sıçanlarda ise, CRH düzeyleri kontrole göre anlamlı olarak düşük bulunmuştur. Pinealektomi uygulanmış sıçanlarda, gerek stres-tekrar stres gerekse melatonin ve ramelteon uygulamalarının herhangi bir etkisi gözlenmemiştir (Şekil 4.8).



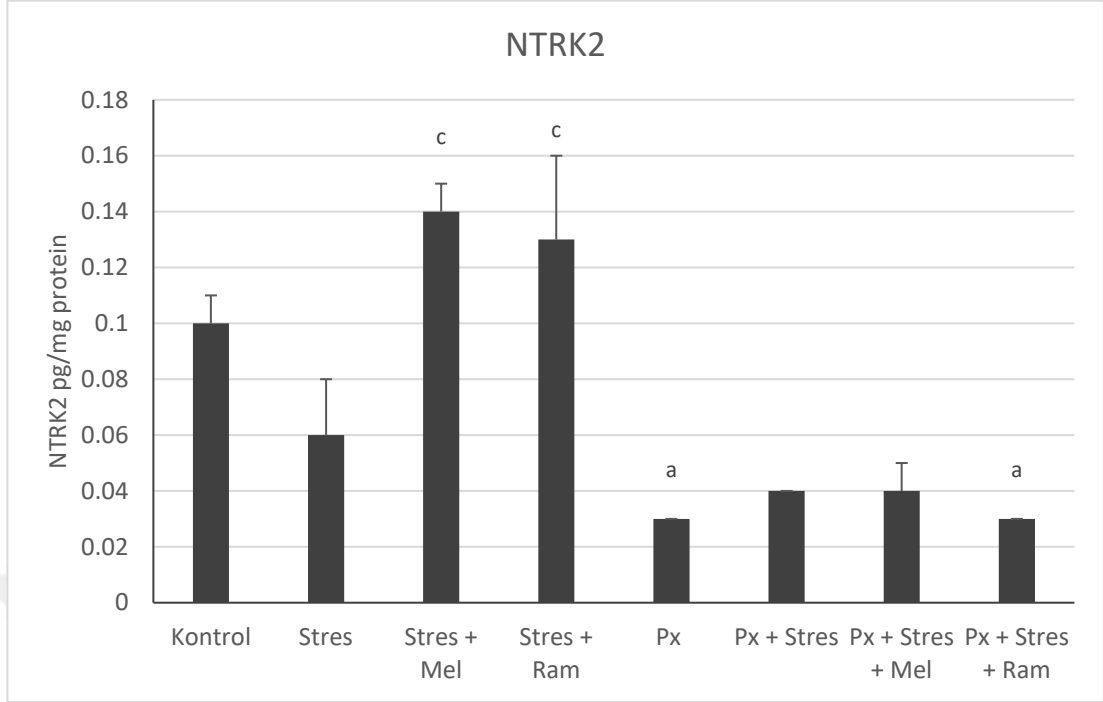
Şekil 4.9 Sıçanlarda posttravmatik stres modelinde deney sonunda ELISA yöntemiyle çalışılan BDNF'nin hipokampus bölgesindeki düzeylerinin gruplar arasında karşılaştırılması. Mel: melatonin 3 mg/kg, Ram: ramelteon 3 mg/kg, Px: Pinealektomi. a: Kontrolden anlamlı olarak farklı, b: Px vs Px+stres anlamlı farklılık, c: Tedavinin (melatonin ya da ramelteon) etkisi (tedaviye bağlı anlamlı farklılık), ($p < 0,05$), $n = 9-11$ her bir grup için

Beyin hipokampus bölgesindeki BDNF protein düzeylerinde, stres-tekrar strese bağlı olarak azalma görülmüş olmakla beraber, istatistiksel olarak anlamlılık gösterilememiştir. Stres uygulanan sıçanlarda melatonin ve ramelteon uygulamaları ise, BDNF düzeylerinde anlamlı bir artışa neden olmuştur. Pinealektomi yapılmış sıçanlarda ise, BDNF düzeyleri kontrole göre anlamlı olarak düşük bulunmuştur. Pinealektomi uygulanmış sıçanlarda, gerek stres-tekrar stres gerekse melatonin ve ramelteon uygulamalarının herhangi bir etkisi gözlenmemiştir (Şekil 4.9).



Şekil 4.10 Sıçanlarda posttravmatik stres modelinde deney sonunda ELISA yöntemiyle çalışılan pro-BDNF'nin hipokampus bölgesindeki düzeylerinin gruplar arasında karşılaştırılması. Mel: melatonin 3 mg/kg, Ram: ramelteon 3 mg/kg, Px: Pinealektomi. a: Kontrolde anlamlı olarak farklı, b: Px vs Px+stres anlamlı farklılık, c: Tedavinin (melatonin ya da ramelteon) etkisi (tedaviye bağlı anlamlı farklılık), ($p < 0,05$), $n=9-11$ her bir grup için

Beyin hipokampus bölgesindeki pro-BDNF protein düzeylerinde, stres-tekrar strese bağlı olarak azalma görülmüş olmakla beraber, istatistiksel olarak anlamlılık gösterilememiştir. Stres uygulanan sıçanlarda melatonin ve ramelteon uygulamaları ise, pro-BDNF düzeylerinde anlamlı bir artışa neden olmuştur. Pinealektomi yapılmış sıçanlarda ise, pro-BDNF düzeyleri kontrole göre anlamlı olarak düşük bulunmuştur. Pinealektomi uygulanmış sıçanlarda, gerek stres-tekrar stres gerekse melatonin ve ramelteon uygulamalarının herhangi bir etkisi gözlenmemiştir (Şekil 4.10).



Şekil 4.11 Sıçanlarda posttravmatik stres modelinde deney sonunda ELISA yöntemiyle çalışılan NTRK2'nin hipokampus bölgesindeki düzeylerinin gruplar arasında karşılaştırılması. Mel: melatonin 3 mg/kg, Ram: ramelteon 3 mg/kg, Px: Pinealektomi. a: Kontrolden anlamlı olarak farklı, b: Px vs Px+stres anlamlı farklılık, c: Tedavinin (melatonin ya da ramelteon) etkisi (tedaviye bağlı anlamlı farklılık), ($p < 0,05$), $n = 9-11$ her bir grup için

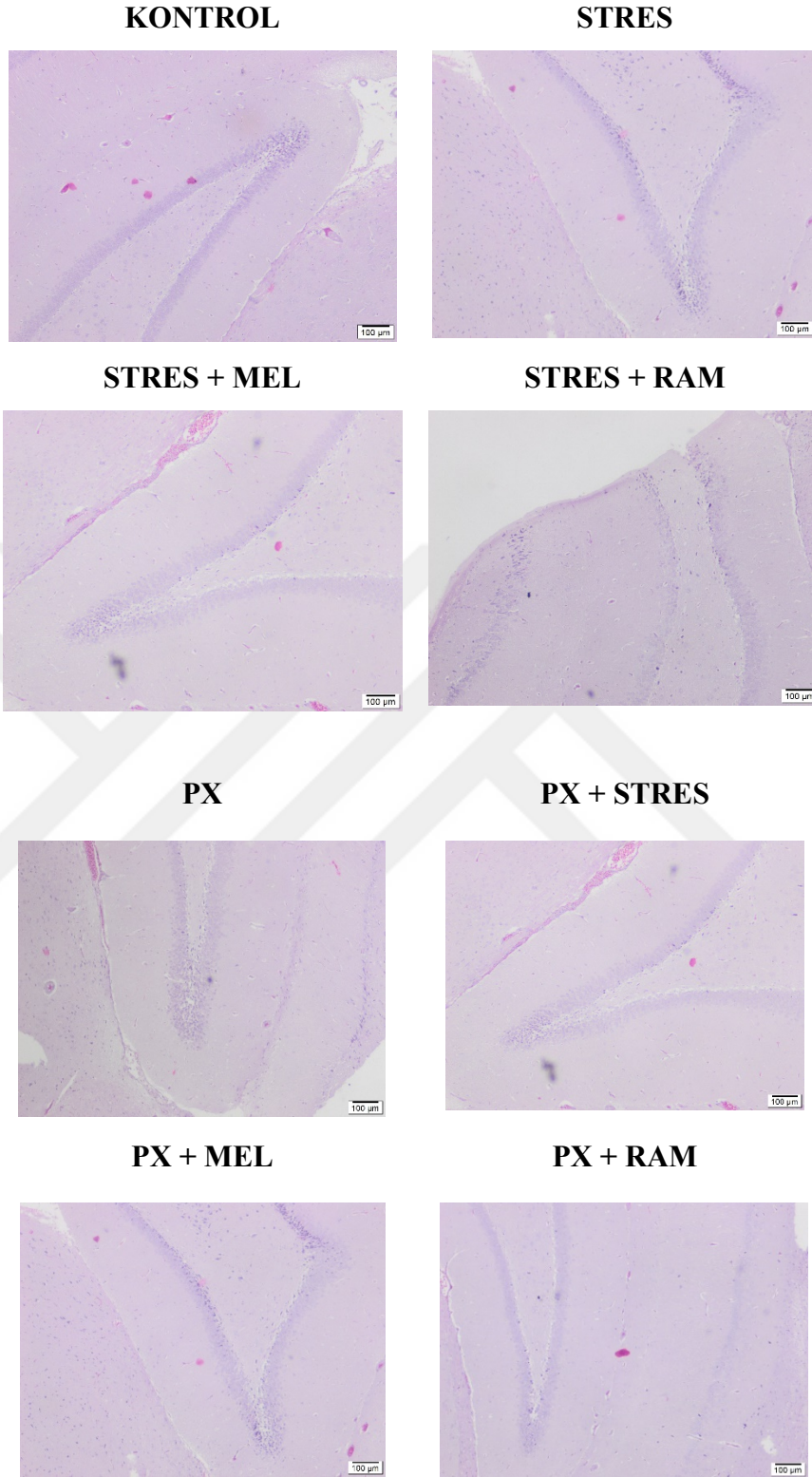
Beyin hipokampus bölgesindeki NTRK2 protein düzeylerinde, stres-tekrar strese bağlı olarak azalma görülmüş olmakla beraber, istatistiksel olarak anlamlılık gösterilememiştir. Stres uygulanan sıçanlarda melatonin ve ramelteon uygulamaları ise, NTRK2 düzeylerinde anlamlı bir artışa neden olmuştur. Pinealektomi yapılmış sıçanlarda ise, NTRK2 düzeyleri kontrole göre anlamlı olarak düşük bulunmuştur. Pinealektomi uygulanmış sıçanlarda, gerek stres-tekrar stres gerekse melatonin ve ramelteon uygulamalarının herhangi bir etkisi gözlenmemiştir (Şekil 4.11).

4.3. Histopatolojik Bulgular

4.3.1 Hematoksilen Eosin Boyama Bulguları

Normal ya da pinealektomi yapılmış sıçanlarda, stres-tekrar stres uygulanmasına bağlı beyin hipokampus bölgesindeki mikroskopik değişiklikler, hematoksilen eosin (HE) boyaması yapılarak değerlendirilmiş ve Resim 4.1’de gösterilmiştir.

Kontrol gruplarında normal histoloji izlenirken, stres ile vakuolar dejenerasyon, piknotik nükleus ve damarsal dejenerasyon bulguları izlendi. Melatonin ve ramelteon uygulamaları ile bu bulguların azaldığı saptandı. Stres ve pinealektomi ile oldukça belirginleşen değişikliklerin melatonin ve ramelteon uygulamaları ile azaldığı gözlemlendi.

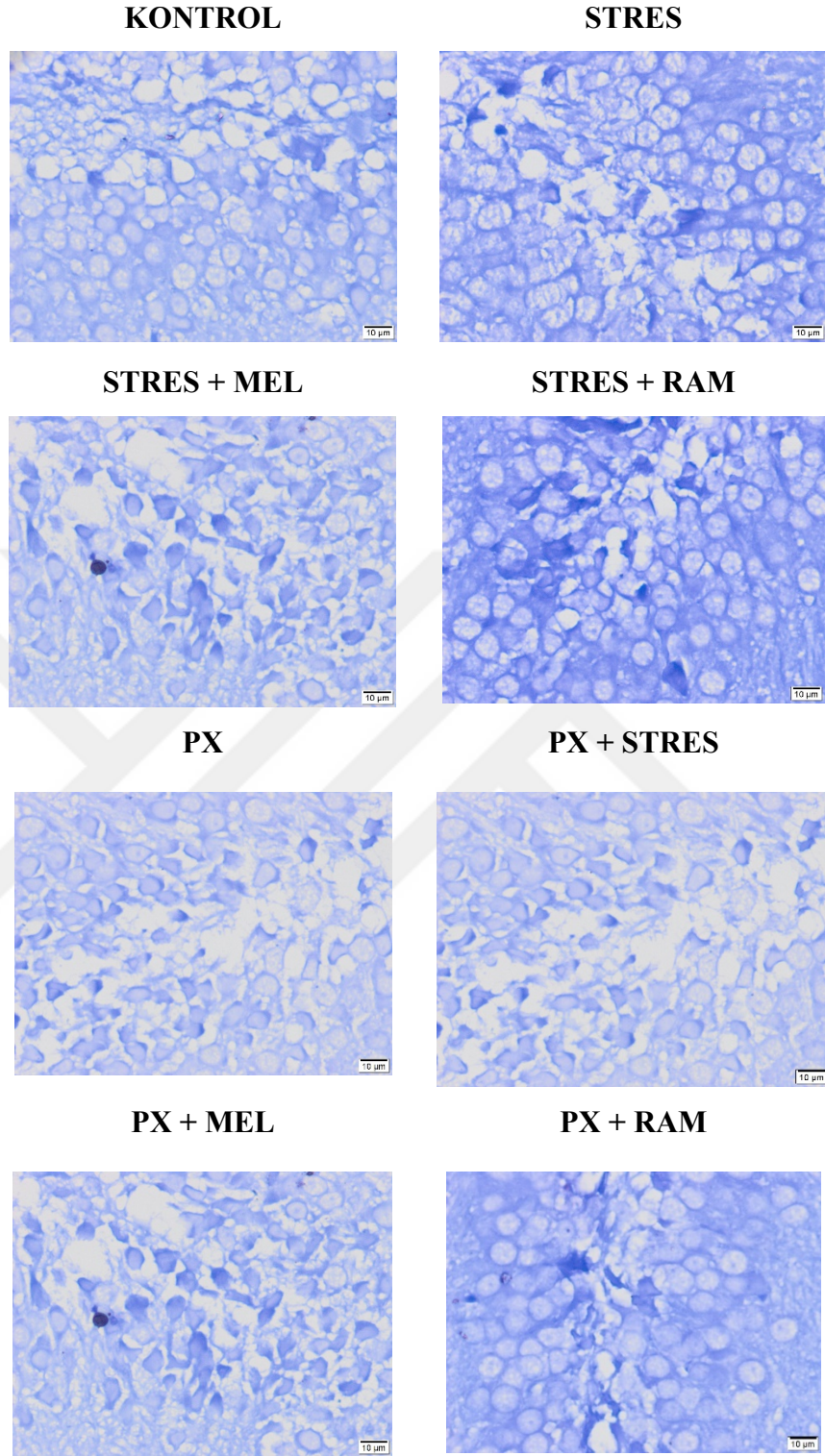


Resim 4.1 Sıçanlarda posttravmatik stres modelinde, deney sonunda beyin hipokampus bölgesinin HE boyaması ile değerlendirilmesi. Mel: melatonin 3 mg/kg, Ram: ramelteon 3 mg/kg, Px: pinealektomi

Normal ya da pinealektomi yapılmış sıçanlarda, stres-tekrar stres uygulanmasına ve melatonin ve ramelteon tedavisine bağılı beyin hipokampus bölgesindeki mikroskobik değişiklikler, Nissle boyaması yapılarak değerlendirilmiş ve Resim 4.2’de gösterilmiştir.

Nissle boyamalarında perikaryonda ve dendritlerde bazofilik granüller izlendi. Kontrol gruplarında normal histoloji izlenirken, stres re-stres ile boyamanın azaldığı, melatonin ve ramelteon uygulamaları ile bu bulguların gerilediğı saptandı. Stres ve Px ile oldukça belirginleşen değişikliklerin melatonin ve ramelteon uygulamaları ile geriye döndürüldüğü gözlemlendi.





Resim 4.2 Sıçanlarda posttravmatik stres modelinde deney sonunda (14. gün) Nissle boyamalarında, stres ve pinealektomi ile oluşan patolojik değişikliklerin melatonin ve ramelteon uygulamaları ile gerilemesi. Mel: melatonin 3 mg/kg, Ram: ramelteon 3 mg/kg, Px: pinealektomi

4.3.2 İmmunohistokimya Bulguları

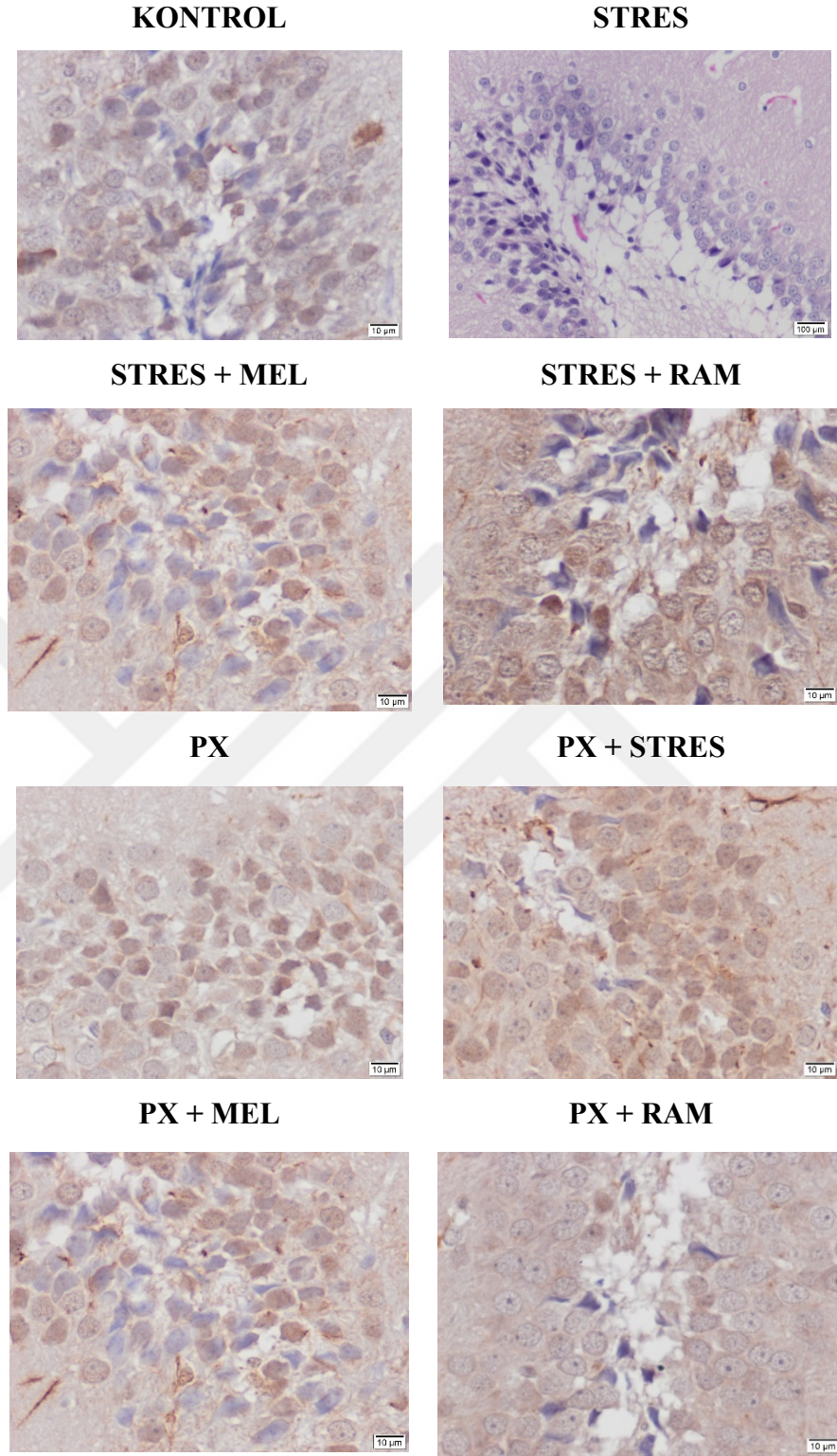
Patolojik değişikliklerin protein ekspresyonları açısından değerlendirilmesinde primer antikolar; anti-proBDNF, anti-BDNF, anti-CRH, anti-NTRK2 ile inkübe edildi ve ekspresyonlarının değerlendirilmesi yapıldı.

4.3.2.1 CRH Sonuçları

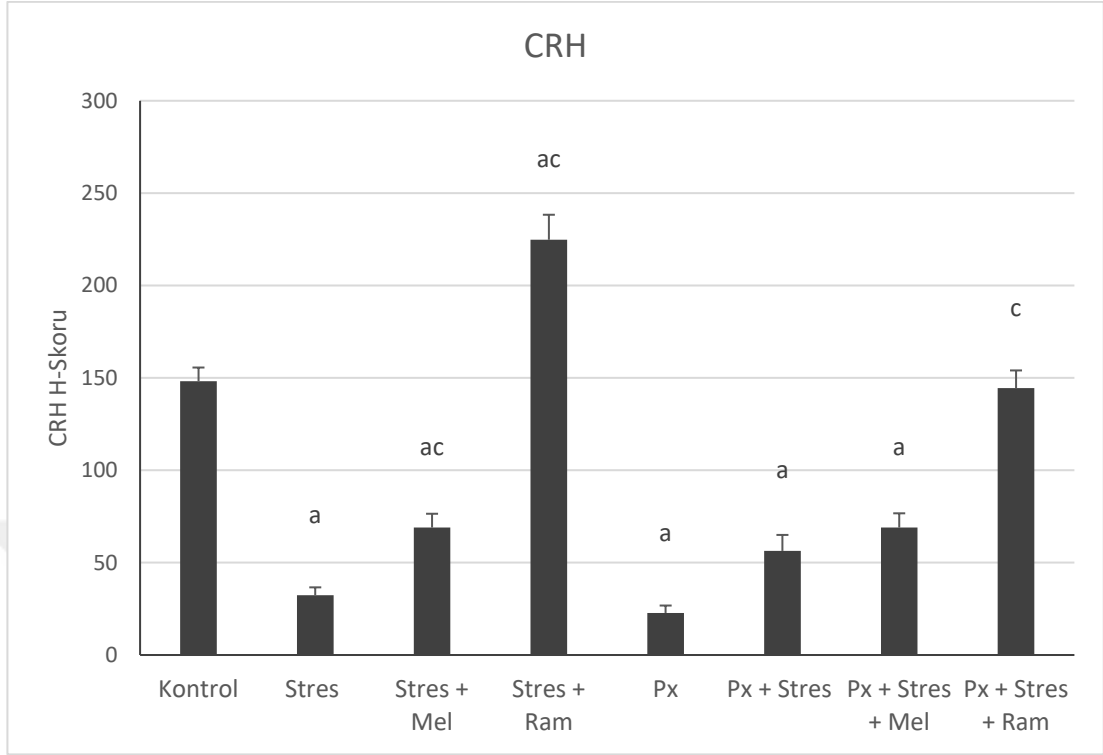
Normal ya da pinealektomi yapılmış sıçanlarda, stres-tekrar stres uygulanmasına bağlı beyin hipokampus bölgesindeki CRH protein düzeyleri immünohistokimya (İHK) boyaması yapılarak değerlendirilmiş ve Resim 4.3'de gösterilmiştir.

CRH İHK boyamalarında, stres ile gerçekleşen azalmanın melatonin ve ramelteon ile geri döndürüldüğü gözlemlendi. Pinealektomi uygulaması ile azalmanın belirginleştiği ve melatonin ve ramelteon uygulamaları ile bu azalmanın geriletildiği saptandı (Resim 4.3).

Normal ya da pinealektomi yapılmış sıçanlarda, stres-tekrar stres uygulanmasına bağlı beyin hipokampus bölgesindeki CRH protein düzeyleri immünohistokimya (İHK) boyaması ardından h-skor analizi yapılarak değerlendirilmiş ve Şekil 4.12'de gösterilmiştir.



Resim 4.3 Sıçanlarda posttravmatik stres modelinde deney sonunda gerçekleştirilen İHK boyamalarında hipokampusta CRH proteininin gösterilmesi. Mel: melatonin 3 mg/kg, Ram: ramelteon 3 mg/kg, Px: pinealektomi



Şekil 4.12 Sıçanlarda posttravmatik stres modelinde, deney sonunda gerçekleştirilen İHK boyamalarında, hipokampustaki CRH protein düzeylerinin h-skor analizi ve gruplar arasında karşılaştırılması. Mel: melatonin 3 mg/kg, Ram: ramelteon 3 mg/kg, Px: pinealektomi. a: Kontrolde anlamlı olarak farklı, b: Px vs Px+stres anlamlı farklılık, c: Tedavinin (melatonin ya da ramelteon) etkisi (tedaviye bağlı anlamlı farklılık), ($p < 0,05$), $n=9-11$ her bir grup için

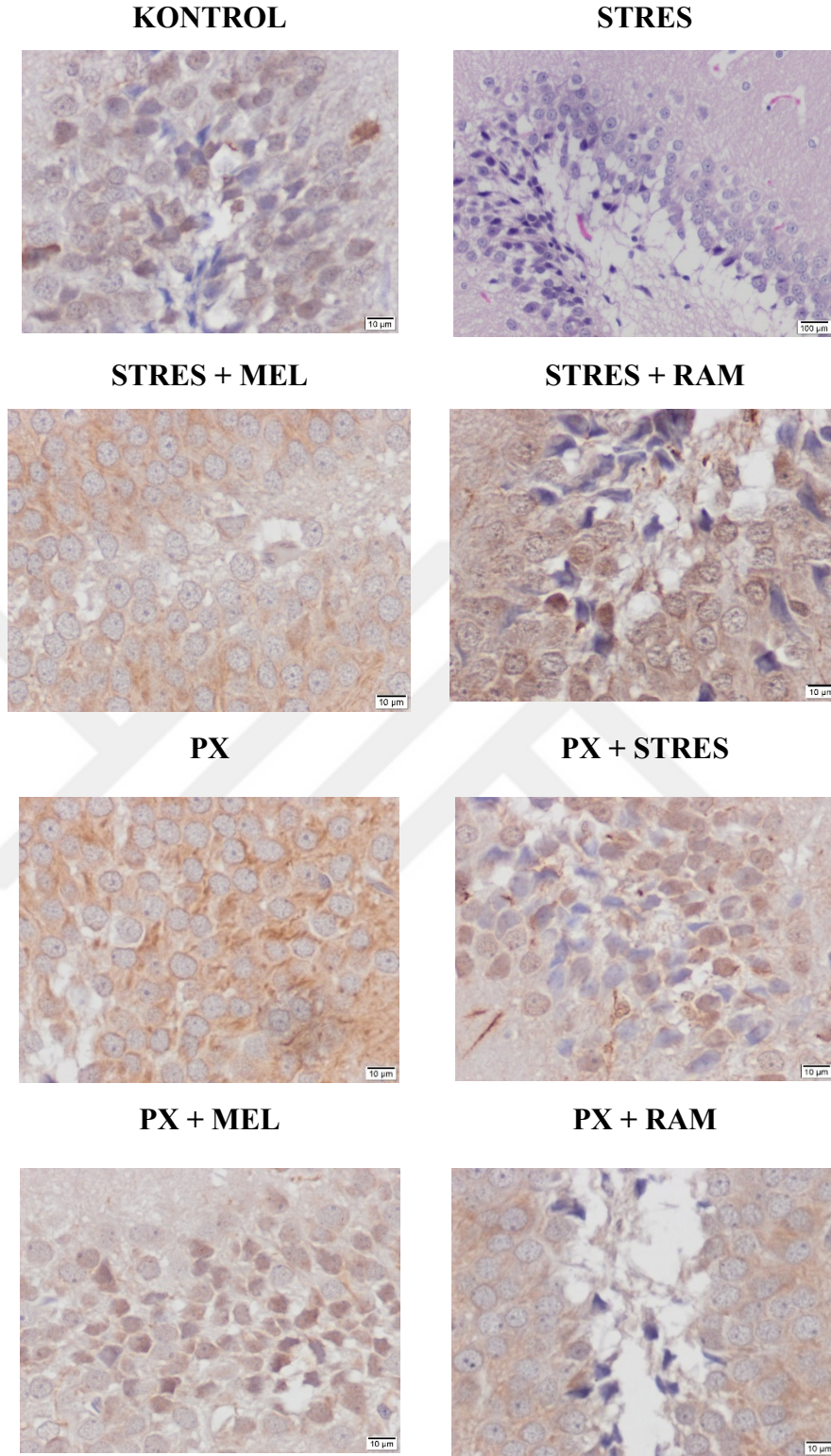
Beyin hipokampus bölgesinde yapılan CRH İHK boyamalarının h-skor analizinde, CRH düzeylerinin stres-tekrar strese bağlı olarak anlamlı olarak azaldığı; melatonin ve ramelteon uygulamaları ile bu azalmanın anlamlı bir şekilde geri çevrildiği gösterilmiştir. En etkili olarak ramelteon uygulaması bulunmuş olup, CRH düzeylerini kontrolden de anlamlı olarak yükseltmiştir. Pinealektomi uygulaması, kontrol grubuna göre CRH düzeyini anlamlı bir şekilde azaltmıştır. Pinealektomili sıçanlarda stres-tekrar stres uygulanmasının ise, CRH düzeyleri üzerine bir etkisi bulunamamıştır. Ramelteon uygulaması, pinealektomi sonucu gelişen CRH düzeylerindeki azalmayı kontrol düzeylerine geri çevirmiştir (Şekil 4.12).

4.3.2.2 BDNF Sonuçları

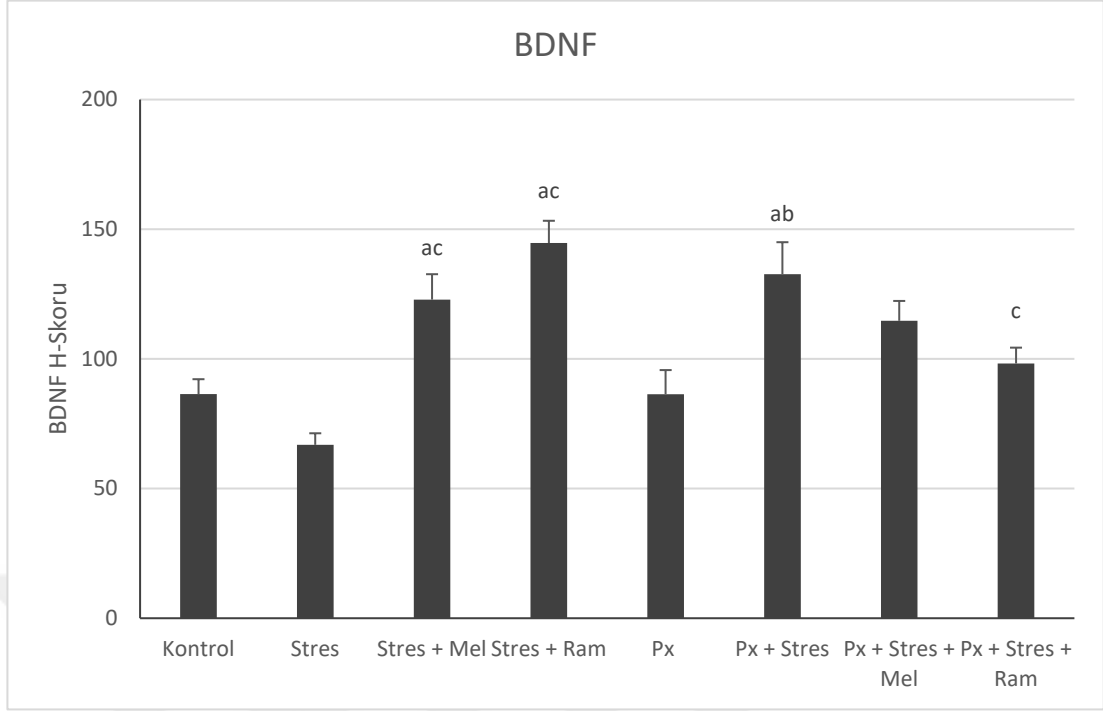
Normal ya da pinealektomi yapılmış sıçanlarda, stres-tekrar stres uygulanmasına bağlı beyin hipokampus bölgesindeki BDNF protein düzeyleri immünohistokimya (İHK) boyaması yapılarak değerlendirilmiş ve Resim 4.5’de gösterilmiştir.

BDNF İHK boyamalarında, stres ile gerçekleşen azalmanın melatonin ve ramelteon ile geri döndürüldüğü gözlemlendi. Pinealektomi uygulamaları ile azalmanın belirginleştiği ve melatonin ve ramelteon uygulamaları ile bu azalmanın geriletildiği saptandı (Resim 4.4).

Normal ya da pinealektomi yapılmış sıçanlarda, stres-tekrar stres uygulanmasına bağlı beyin hipokampus bölgesindeki BDNF protein düzeyleri immünohistokimya (İHK) boyaması ardından h-skor analizi yapılarak değerlendirilmiş ve Şekil 4.13’te gösterilmiştir.



Resim 4.4. Sıçanlarda posttravmatik stres modelinde deney sonunda gerçekleştirilen İHK boyamalarında hipokampusta BDNF proteininin gösterilmesi. Mel: melatonin 3 mg/kg, Ram: ramelteon 3 mg/kg, Px: pinealektomi



Şekil 4.13 Sıçanlarda posttravmatik stres modelinde, deney sonunda gerçekleştirilen İHK boyamalarında, hipokampustaki BDNF protein düzeylerinin h-skor analizi ve gruplar arasında karşılaştırılması. Mel: melatonin 3 mg/kg, Ram: ramelteon 3 mg/kg, Px: pinealektomi. a: Kontrolden anlamlı olarak farklı, b: Px vs Px+stres anlamlı farklılık, c: Tedavinin (melatonin ya da ramelteon) etkisi (tedaviye bağlı anlamlı farklılık), ($p < 0,05$), $n=9-11$ her bir grup için

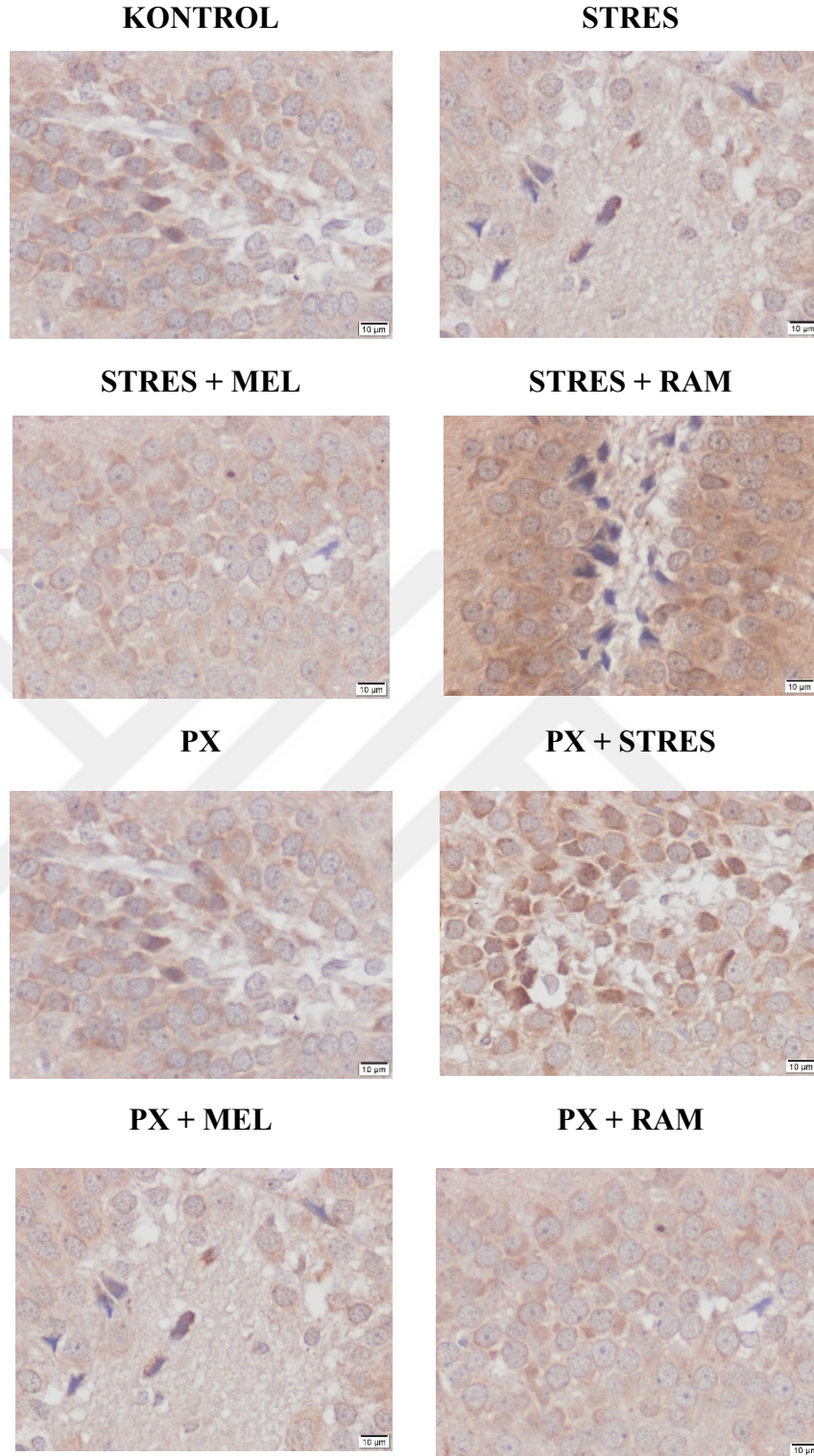
Beyin hipokampus bölgesinde yapılan BDNF İHK boyamalarının h-skor analizinde, BDNF düzeylerinin stres tekrar-strese bağlı olarak azalma eğiliminde olduğu gözlenmiş olup, istatistiksel olarak anlamlılık bulunmamıştır. Melatonin ve ramelteon uygulamaları ile bu azalmanın anlamlı bir şekilde geri çevrildiği gösterilmiştir. Bu yükseliş kontrol seviyesinin de üzerine çıkmıştır. Pinealektomi uygulaması, kontrol grubuna göre BDNF düzeylerini anlamlı olarak değiştirmezken; pinealektomili sıçanlarda stres-tekrar stres uygulanması BDNF düzeylerinde anlamlı bir artışa neden olmuştur. Melatonin ve ramelteon uygulamaları ise bu artışı geri çevirmiştir. Ramelteon uygulanan grupta BDNF düzeyi stres grubuna göre anlamlı olarak düşük bulunmuştur (Şekil 4.13).

4.3.2.3 proBDNF Sonuçları

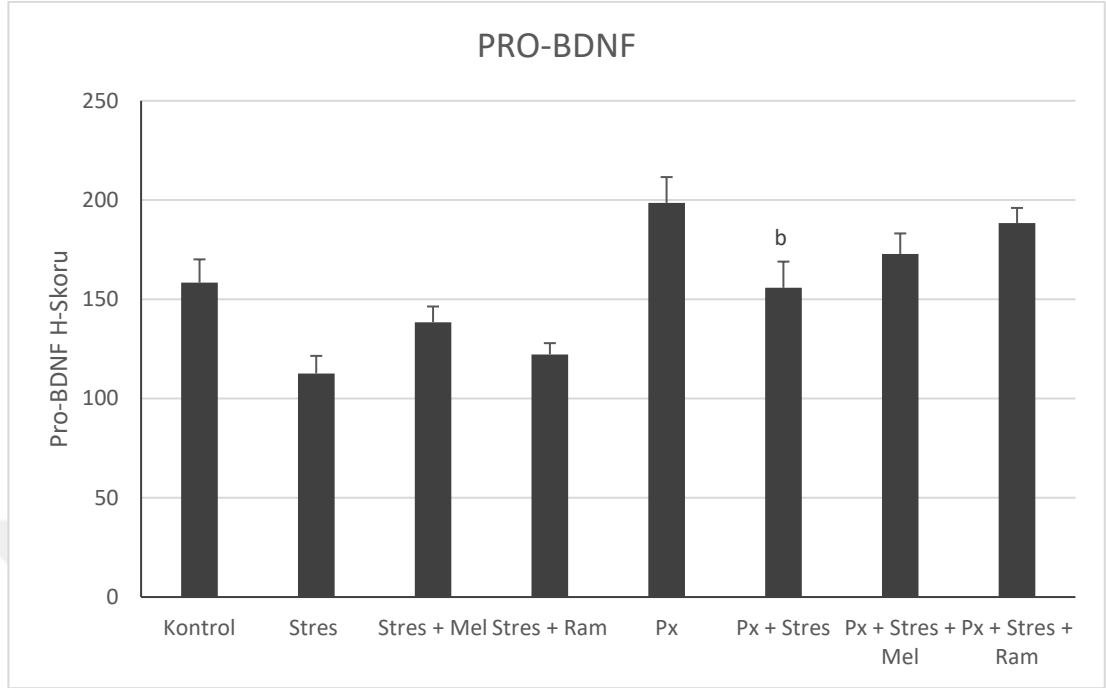
Normal ya da pinealektomi yapılmış sıçanlarda, stres-tekrar stres uygulanmasına bağlı beyin hipokampus bölgesindeki pro-BDNF protein düzeyleri immünohistokimya (İHK) boyaması yapılarak değerlendirilmiş ve Resim 4.4'de gösterilmiştir.

Pro-BDNF İHK boyamalarında, stres ile gerçekleşen azalmanın melatonin ve ramelteon ile geri döndürüldüğü gözlemlendi. Pinealektomi uygulamaları ile azalmanın belirginleştiği ve melatonin ve ramelteon uygulamaları ile bu azalmanın geriletildiği saptandı (Resim 4.5).

Normal ya da pinealektomi yapılmış sıçanlarda, stres-tekrar stres uygulanmasına bağlı beyin hipokampus bölgesindeki pro-BDNF protein düzeyleri immünohistokimya (İHK) boyaması ardından h-skor analizi yapılarak değerlendirilmiş ve Şekil 4.14'te gösterilmiştir.



Resim 4.5 Sıçanlarda posttravmatik stres modelinde deney sonunda gerçekleştirilen İHK boyamalarında hipokampusta pro-BDNF proteininin gösterilmesi. Mel: melatonin 3 mg/kg, Ram: ramelteon 3 mg/kg, Px: pinealektomi



Şekil 4.14 Sıçanlarda posttravmatik stres modelinde, deney sonunda gerçekleştirilen İHK boyamalarında, hipokampustaki pro-BDNF protein düzeylerinin h-skor analizi ve gruplar arasında karşılaştırılması. Mel: melatonin 3 mg/kg, Ram: ramelteon 3 mg/kg, Px: pinealektomi. a: Kontrolden anlamlı olarak farklı, b: Px vs Px+stres anlamlı farklılık, c: Tedavinin (melatonin ya da ramelteon) etkisi (tedaviye bağlı anlamlı farklılık), ($p < 0,05$), $n = 9-11$ her bir grup için

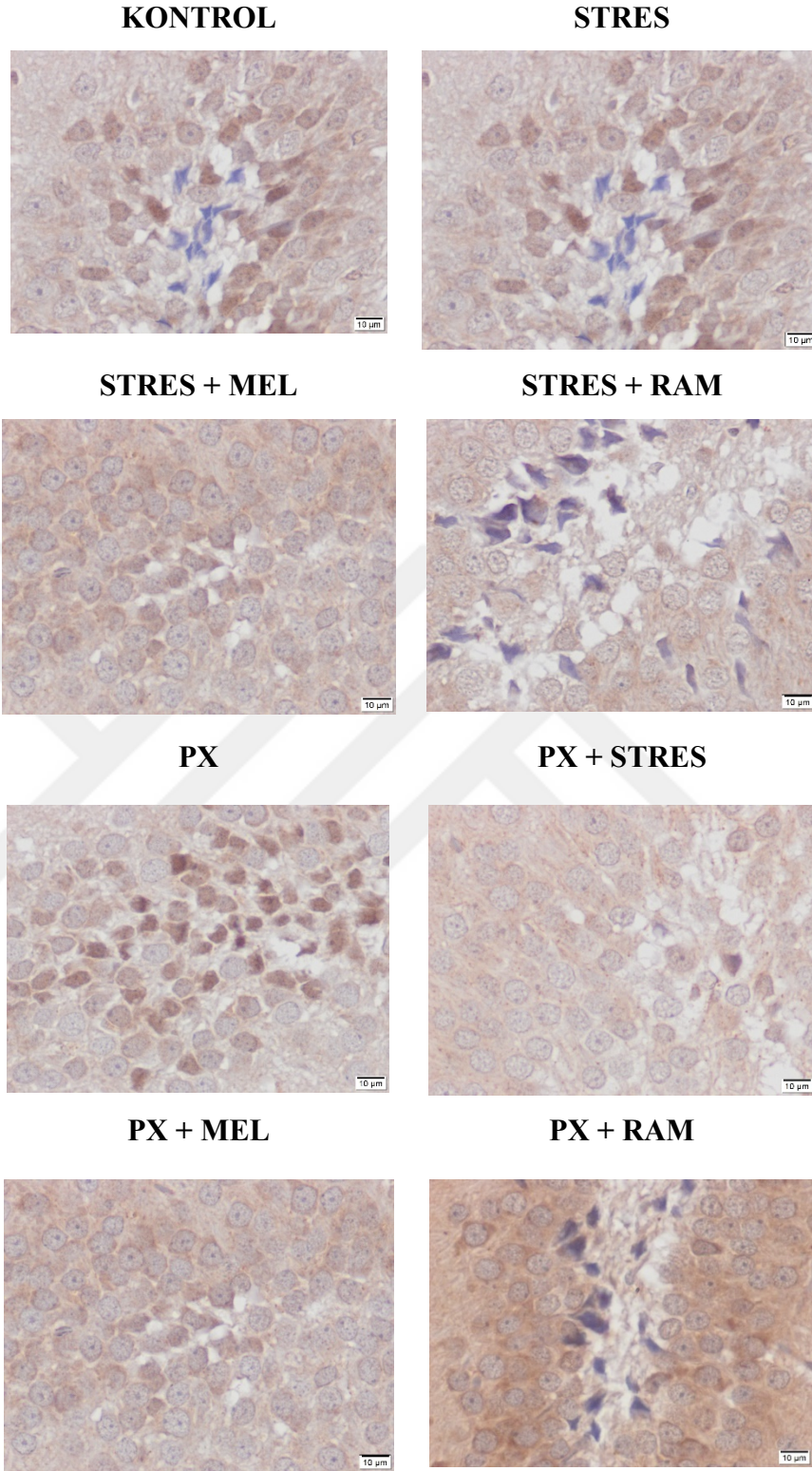
Beyin hipokampus bölgesinde yapılan pro-BDNF İHK boyamalarının h-skor analizinde, pro-BDNF düzeylerinin stres-tekrar strese bağlı olarak azalma eğiliminde olduğu gözlenmiş olup, istatistiksel olarak anlamlılık bulunmamıştır. Melatonin ve ramelteon uygulamalarının ise belirgin bir etkisi gözlenmemiştir. Pinealektomi uygulaması, kontrol grubuna göre pro-BDNF düzeylerini anlamlı olarak değiştirmezken; pinealektomili sıçanlarda stres-tekrar stres uygulanması pro-BDNF düzeylerinde anlamlı bir azalmaya neden olmuştur. Melatonin ve ramelteon uygulamaları ise bu azalmayı geri çevirmiştir (Şekil 4.14).

4.3.2.4 NTRK2 Sonuçları

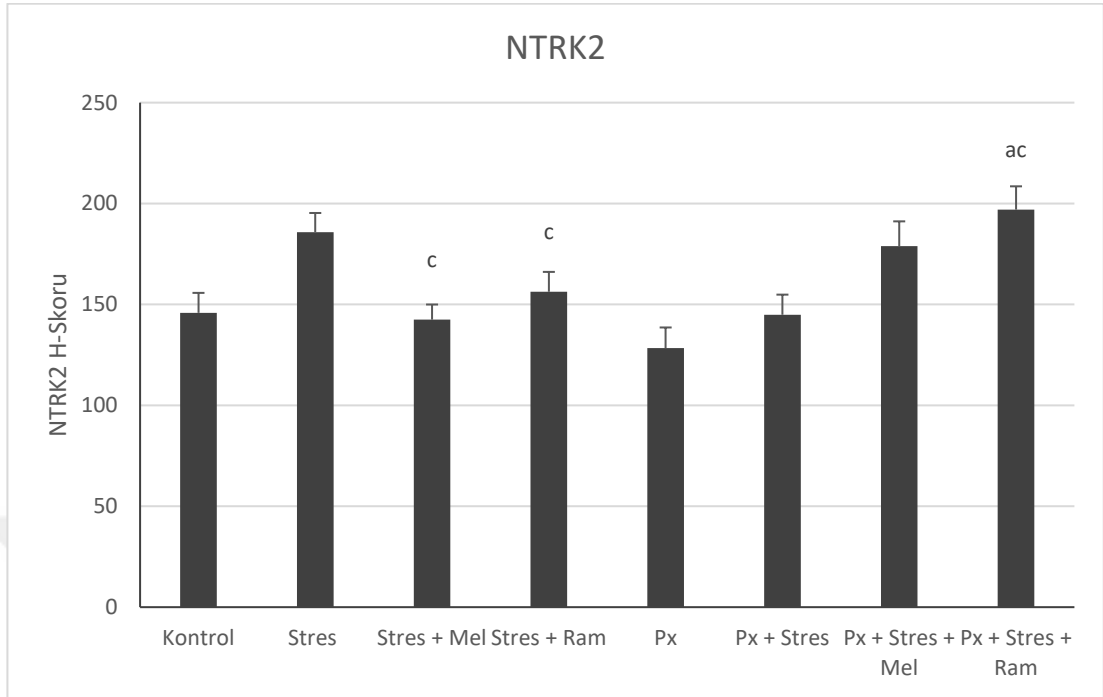
Normal ya da pinealektomi yapılmış sıçanlarda, stres-tekrar stres uygulanmasına bağlı beyin hipokampus bölgesindeki NTRK2 protein düzeyleri immünohistokimya (İHK) boyaması yapılarak değerlendirilmiş ve Resim 4.6'da gösterilmiştir.

NTRK2 İHK boyamalarında, stres ile gerçekleşen azalmanın melatonin ve ramelteon ile geri döndürüldüğü gözlemlendi. Pinealektomi uygulamaları ile azalmanın belirginleştiği ve melatonin ve ramelteon uygulamaları ile bu azalmanın geriletildiği saptandı (Resim 4.6).

Normal ya da pinealektomi yapılmış sıçanlarda, stres-tekrar stres uygulanmasına bağlı beyin hipokampus bölgesindeki NTRK2 protein düzeyleri immünohistokimya (İHK) boyaması ardından h-skor analizi yapılarak değerlendirilmiş ve Şekil 4.15'te gösterilmiştir.



Resim 4.6. Sıçanlarda posttravmatik stres modelinde deney sonunda gerçekleştirilen İHK boyamalarında hipokampusta NTRK2 proteininin gösterilmesi. Mel: melatonin 3 mg/kg, Ram: ramelteon 3 mg/kg, Px: pinealektomi



Şekil 4.15. Sıçanlarda posttravmatik stres modelinde, deney sonunda gerçekleştirilen İHK boyamalarında, hipokampustaki NTRK2 protein düzeylerinin h-skor analizi ve gruplar arasında karşılaştırılması. Mel: melatonin 3 mg/kg, Ram: ramelteon 3 mg/kg, Px: pinealektomi. a: Kontrolden anlamlı olarak farklı, b: Px vs Px+stres anlamlı farklılık, c: Tedavinin (melatonin ya da ramelteon) etkisi (tedaviye bağlı anlamlı farklılık), ($p < 0,05$), $n=9-11$ her bir grup için

Beyin hipokampus bölgesinde yapılan NTRK2 İHK boyamalarının h-skor analizinde, NTRK2 düzeylerinin stres-tekrar strese bağlı olarak artma eğiliminde olduğu gözlenmiş olup, istatistiksel olarak anlamlılık bulunmamıştır. Melatonin ve ramelteon uygulamalarının ise NTRK2 düzeylerini stres grubuna göre anlamlı olarak azalttığı bulunmuştur. Pinealektomi uygulaması, kontrol grubuna göre NTRK2 düzeylerini anlamlı olarak değiştirmezken; pinealektomili sıçanlarda stres tekrar-stres uygulanması NTRK2 düzeylerinde anlamlı bir değişikliğe neden olmamıştır. Ramelteon uygulanan grupta ise NTRK2 düzeyleri kontrol ve pinealektomi uygulanan stres grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur (Şekil 4.15).

5. TARTIŞMA

Bu çalışmanın en önemli bulgusu, sıçanlarda melatonin düzeyini belirgin olarak düşürdüğü bilinen pinealektomi uygulamasının önemli ölçüde stres ve anksiyetede artışa neden olduğunun gösterilmesidir. Bu durum, gerek davranış testleri, gerekse biyokimya ve immünohistokimya bulguları ile desteklenmiştir. Literatürde, pinealektomi yapılarak fizyolojik melatonin düzeyindeki düşüğe bağlı stres ve anksiyete artışına yönelik bir çalışma olmaması bakımından önemli bir bulgudur.

Melatoninin TSSB etiopatogenezindeki rolü tam olarak belirlenememesine rağmen, insanlarda yapılan bir çalışmada nokturnal melatonin düzeylerinin düşük olmasının TSSB geliştirme riskini artırdığı bildirilmiştir (113). Başka bir çalışmada strese maruz kaldıktan sonraki 48 saat içinde düşük melatonin düzeylerinin bulunması, TSSB geliştirme yönünde riskli bulunmuştur (114). Başka yöntemlerle oluşturulan TSSB hayvan modellerinde melatonin uygulamasının, semptomlarda iyileşmeye yol açtığı bildirilmiştir (115–117). Melatoninin TSSB etiolojisindeki yeri ile ilgili olarak, insan ve hayvan çalışmalarından elde edilen bilgiler, sirkadyen ritm ile ilişkili nöroendokrin, immün, metabolik ve otonomik disregülasyonun, sirkadyen ritmin bozulmasının TSSB patofizyolojisinde yeri olabileceğine işaret etmektedir (118). Ayrıca, pinealektomi uygulanan ratlarda hipokampusta oksidatif stres belirteçlerinin yükseldiği, morfolojik değişikliklerin olduğu ve melatonin uygulaması ile bu değişikliklerin geri çevrildiği gösterilmiştir (119). Bu çalışmada, pinealektomi işlemi uygulanan sıçanlarda stres uygulamasının parametrelerde daha fazla bir bozulmaya yol açamamasının sebebi olarak, uygulanan stres modelinin pinealektominin yarattığı stresin üzerine çıkamamış olması gösterilebilir.

Açık alan testi one-way anova kullanılarak değerlendirildiğinde, stres-tekrar stres uygulamasında bağlı olarak anlamlı bir anksiyete artışı gösterilememiştir. Melatonin ve ramelteon gruplarında da kontrol ve stres

gruplarına göre davranış parametrelerinde anlamlı bir değişiklik gösterilememiştir. Buna karşılık, pinealektomi uygulanan sıçanlarda uygulanmayan kontrol grubuna göre, kat edilen mesafe, mobil olarak geçen süre ve çizgi üzerinden geçme sayısı değerlerinde göre azalma eğilimi gösterilmiştir. Ramelteon uygulamasının ise bu değerleri artırma eğiliminde olduğu gösterilmiştir. Bizim çalışmamızdaki stres uygulamalarına benzeyen stresler ile TSSB modeli oluşturulan bir çalışmada, stres uygulamasına bağlı olarak, açık alan testinde kat edilen mesafenin ve ambulator aktivitenin (çizgi üzerinden geçme) azaldığı gösterilmiştir (59,62).

Yüksek artı labirent testinin one-way anova kullanılarak değerlendirilmesinde de stres uygulamasının anlamlı bir anksiyete artışına yol açtığı gösterilememiştir. Ancak pinealektomi uygulanan sıçanlarda kat edilen mesafe ve mobil olarak geçen süre değerleri kontrol grubuna azalma eğilimi göstermiştir. Melatonin ve ramelteon uygulamalarının ise bu değerleri artırdığı gösterilmiştir. Yüksek artı labirent testinde kat edilen mesafe ve total aktivitenin stres uygulaması ile azaldığı yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (65).

Sıçan TSSB modellerinde, stresin modelinin ve tedavinin işe yarayıp yaramadığını göstermek için en çok başvuru parametrelerden biri YAL'deki açık kolda geçirilen zaman değeridir (42,65). Bizim çalışmamızda da YAL'deki açık kolda geçirilen zaman paired-t test ile değerlendirildiğinde pinealektomi yapılan ve yapılmayan gruplarda stres uygulamasının bu süreyi anlamlı bir şekilde azalttığı gösterilmiştir. Bu bakımdan uygulanan modelin pinealektomili ve pinealektomisiz sıçanlarda stres oluşturduğu söylenebilir. Melatonin ve ramelteon uygulamalarının da bu azalmayı anlamlı bir şekilde geri çevirdiği gösterilmiştir. YAL'de açık kolda geçirilen zaman one-way anova kullanılarak değerlendirildiğinde ise, pinealektomiye bağlı bir etki gözlenmezken, pinealektomili grupta stres uygulaması bu süreyi azaltmış, melatonin ve ramelteon uygulaması ise bu azalmayı ortadan kaldırmıştır.

ELISA yöntemi kullanılarak elde edilen, beyin hipokampus dokusundaki CRH, BDNF, pro-BDNF, NTRK2 düzeyleri değerlendirildiğinde, pinealektomi uygulanmayan grupta stres-tekrar stres uygulamasına bağlı olarak bu proteinlerin düzeylerinde azalma görülmüş olmakla beraber, istatistiksel olarak anlamlılık gösterilememiştir. Melatonin ve ramelteon uygulamaları ise, stres grubundaki değerlerde istatistiksel olarak anlamlı artışa neden olmuş ve kontrol seviyelerine geri getirmiştir. Pinealektomi uygulanmış sıçanlarda ise, bu parametrelerin hepsi stresle uyumlu şekilde anlamlı olarak düşük bulunmuştur. Ancak, pinealektomili sıçanlarda gerek stres-tekrar stres gerekse melatonin ve ramelteon uygulamalarının herhangi bir etkisi gözlenmemiştir.

İmmünohistokimya boyamalarında CRH, BDNF, pro-BDNF ve NTRK2'nin hipokampusdaki düzeylerinin h-skor analizi gruplar arasında karşılaştırılmıştır.

Buna göre CRH h-skorunun stres-tekrar stres uygulamasına bağlı olarak anlamlı olarak azaldığı, melatonin ve ramelteon uygulamaları ile bu azalmanın anlamlı bir şekilde geri çevrildiği gösterilmiştir. En etkili olarak ramelteon uygulaması bulunmuş olup, CRH düzeylerini kontrolden de anlamlı olarak artırmıştır. Pinealektomi uygulaması, kontrol grubuna göre CRH düzeylerini anlamlı bir şekilde azaltmıştır. Stres uygulamasının pinealektomili sıçanlarda bir etkisi bulunamamıştır. Ramelteon uygulaması ise, pinealektomi sonucu gelişen CRH düzeylerindeki azalmayı kontrol düzeylerine geri çevirmiştir. Literatürde bu bulgu ile uyumlu sonuçları olan çalışmalar mevcuttur. Ayaktan elektrik şoku uygulanarak TSSB oluşturulan bir modelde hem erkek hem de dişi sıçanlarda, stres uygulaması sonrasında hipotalamustaki CRH mRNA düzeylerinin azaldığı bildirilmiştir (134). Bizim bulgularımızın aksine literatürde stres uygulamasından sonra CRH düzeylerinin arttığını bildiren çalışmalar da mevcuttur (135,136). Fakat bunlara bakıldığında CRH düzeyi ölçümü stres uygulamasından 7 gün sonra yapılmıştır. Bizim çalışmamızda bu süre daha uzun olup 14 gün sonradır. 7

gün 14 güne göre nispeten daha akut dönem sayılabileceğinden bu farklılık bununla ilgili olabilir.

Beyin hipokampus bölgesinde yapılan BDNF İHK boyamalarının h-skor analizinde, BDNF düzeylerinin stres-tekrar strese bağlı olarak azalma eğiliminde olduğu gözlenmiş olup, istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Melatonin ve ramelteon uygulamaları ile bu azalmanın anlamlı bir şekilde geri çevrildiği gösterilmiştir. Bu değerler kontrol seviyesinin de üzerine çıkmıştır. Pinealektomi uygulaması, kontrol grubuna göre BDNF düzeylerini anlamlı olarak değiştirmezken, pinealektomili sıçanlarda stres-tekrar stres uygulaması BDNF düzeylerinde anlamlı bir artışa sebep olmuştur. Melatonin uygulaması herhangi bir fark yaratmazken, ramelteon uygulanan grupta BDNF düzeyi stres grubuna göre anlamlı olarak düşük bulunmuştur. Bizim çalışmamızla paralel olarak, stres uygulamasına bağlı hipokampal BDNF düzeylerinin azaldığı gösteren birçok çalışma vardır (75,76).

Beyin hipokampus bölgesinde yapılan pro-BDNF İHK boyamalarının h-skor analizinde, pro-BDNF düzeylerinin stres-tekrar strese bağlı olarak azalma eğiliminde olduğu gözlenmiş olup, istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Melatonin ve ramelteon uygulamalarının ise belirgin bir etkisi gözlenmemiştir. Pinealektomi uygulamasının pro-BDNF üzerinde belirgin bir etkisi gözlenmezken, pinealektomili sıçanlarda stres uygulanması anlamlı bir azalmaya yol açmıştır. Melatonin ve ramelteon uygulamaları bunu geri çevirmiştir, fakat anlamlılık bulunamamıştır. Literatürde başka bir TSSB oluşturma yöntemi olan sosyal izolasyon modeli uygulanan farelerde, hipokampusta pro-BDNF düzeylerinin azaldığı gösterilmiştir (78).

Beyin hipokampus bölgesinde yapılan NTRK2 İHK boyamalarının h-skor analizinde, NTRK2 düzeylerinin stres-tekrar strese bağlı olarak artma eğiliminde olduğu gözlenmiş olup, istatistiksel olarak anlamlılık bulunamamıştır. Melatonin ve ramelteon uygulamalarının ise, NTRK2 düzeylerini stres grubuna göre anlamlı olarak azalttığı bulunmuştur.

Pinealektomi uygulaması, kontrol grubuna göre NTRK2 düzeylerini anlamlı olarak değiştirmezen; pinealektomili sıçanlarda stres uygulaması NTRK2 düzeylerinde anlamlı bir değişikliğe neden olmamıştır. Ramelteon uygulanan grupta ise NTRK2 düzeyleri kontrol ve pinealektomi uygulanan stres grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur. Bizim çalışmamıza benzer bir stres modeli uygulanan bir çalışmada stres uygulanan sıçanlarda kontrol gruplarına göre hipokampustaki NTRK2 düzeylerinin dūřuk bulunduğu bildirilmiştir (83). Bunun yanında NTRK2 düzeylerinin arttığını bildiren çalışmalar da mevcuttur (84,85).

Literatürde melatonin ve ramelteonun TSSB'deki etkinliği ile ilgili çalışmalar kısıtlıdır. Uzatılmış tekli stres ile oluşturulan bir TSSB modelinde melatonin uygulamasının kognitif hafızadaki bozulmayı dūzelttięini bildiren bir çalışma mevcuttur (116). Stres ile ilişkili olduğu bilinen Fabp3 geninin knock-out edilmesiyle oluşturulan bir TSSB modelinde de ramelteonun anksiyete davranışlarını geriye çevirdiği ve potansiyel bir tedavi ajanı olabileceği bildirilmiştir (128).

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Sonuç olarak, bu çalışmada, sıçan TSSB modelinde strese bağlı anksiyetede artışın, melatonin ve ramelteon tarafından kısmen önlenebileceği gösterilmiştir. Diğer önemli bir bulgu ise, melatoninin fizyolojik konsantrasyonlarındaki azalmanın tek başına anksiyeteye yol açabileceği ve melatonin ve ramelteonun kısmen yararlı olabileceği şeklindedir.

TSSB toplumlarda sık görülen, hayat kalitesini bozan ve bazen de hayatı tehdit eden önemli bir psikiyatrik rahatsızlıktır. Günümüzde tedavisi için onaylanmış ilaçlar var olmakla birlikte, tedaviye yanıtta kişiye özgü farklar çok fazla olmakla birlikte, çoklu ilaç kullanımı da gerekebilmekte ve ilaç tedavisi bazen yetersiz kalabilmektedir.

Melatonerjik sistemin TSSB etiyolojisinde yeri olabileceğini bildiren çalışmalar mevcuttur. Şiddetli bir travmaya maruz kalma sonrasında düşük melatonin seviyelerinin bulunması TSSB için risk faktörü olarak bulunmuştur. Ayrıca, sıçanlarda oluşturulan stres modellerinde melatonin stres etkilerini geri çevirmede başarılı olmuştur. Melatonin agonisti ramelteon için ise hayvan çalışmaları çok kısıtlıdır, insan çalışmasına ise rastlanamamıştır.

Melatonerjik sistem üzerinden etki eden tedavi ajanlarının geliştirilmesi, TSSB'nin farmakolojik tedavisinde yeni ve önemli bir seçenek olabilir. Farklı stres yöntemleri ile oluşturulan TSSB hayvan modellerinde de bu sistemin etkilerini değerlendirmek, farklı bakış açıları kazanmak için önem arz etmektedir. Bu çalışmanın bulguları da göz önüne alındığında, melatonerjik sistemin TSSB etiyolojisindeki yerinin daha iyi araştırılması, ramelteon gibi umut vaadeden tedavi ajanlarının önünün açılması için oldukça önemlidir.

7. ÖZET

Sıçan Posttravmatik Stres Modelinde Melatonin ve Ramelteonun Etkinliğinin Değerlendirilmesi

Travma sonrası stres bozukluğu (TSSB) önemli bir psikiyatrik rahatsızlık olup, travmatik olayların yaşanması ya da tanık olunması sonrasında gelişebilen ve görülme sıklığı oldukça yaygın bir rahatsızlıktır. Uyku bozukluğu gibi TSSB'nin bazı yan semptomlarının tedavisi özellikle zor olabilir ve TSSB tedavisinde yaygın olan çoklu ilaç kullanımını gerektirebilir.

Pineal bezden salgılanan bir hormon olan melatoninin TSSB etiyolojisindeki rolüne ve melatonin ve uyku bozuklukları için onaylanmış melatonin reseptör agonisti ramelteonun tedavideki olası etkinliğine yönelik oldukça kısıtlı sayıda çalışma bulunmaktadır.

Bu araştırmada, pinealektomi uygulanmış ve uygulanmamış sıçanlarda, oluşturulan TSSB modelinde melatonin ve ramelteonun etkinliğinin araştırılması amaçlanmıştır. Buna yönelik olarak, TSSB modeli oluşturulduktan sonra, davranış deneylerinin sonuçları değerlendirilmiş ve beyin dokusunda TSSB ile ilişkili olduğu düşünülen beyin türevli nörotrofik faktör (BDNF), pro-beyin türevli nörotrofik faktör (pro-BDNF), kortikotropin salıcı hormon (CRH) ve tropomiyozin reseptör kinaz (TrkB) düzeyleri immünohistokimya ve Elisa yöntemleri ile analiz edilmiştir.

Sıçanlarda melatonin düzeyini belirgin olarak düşürdüğü bilinen pinealektomi uygulaması, gerek davranış testleri, gerekse biyokimya ve immünohistokimya bulguları birlikte değerlendirildiğinde, stres ve anksiyetede belirgin bir artışa neden olmuştur. Bu bulgumuz, literatürde pinealektomi sonucu fizyolojik melatonin düzeyindeki düşüşe bağlı stres ve anksiyete artışına yönelik bir çalışma olmaması bakımından önemlidir. Yine tüm parametreler birlikte değerlendirildiğinde, pinealektomi uygulanmış sıçanlarda strese bağlı daha fazla bir anksiyete artışı, yüksek artı labirent (YAL) testinde açık kolda geçirilen zaman dışında, birçok parametre için tespit edilememiş ve melatonin ve ramelteonun yararlı etkileri de kısıtlı bulunmuştur.

Pinealektomi uygulanmamış sıçanlarda ise, YAL testinde strese bağlı anksiyetede artış gözlenmiş olup; melatonin ve özellikle ramelteon bu etkiyi geri çevirmede kısmen başarılı bulunmuştur. Hipokampusta yapılan biyokimyasal analizlerde, strese bağlı anksiyetede bir artış eğilimi saptanmış; melatonin ve ramelteon bu etkiyi geri çevirmiştir. İmmünohistokimya analizlerinde ise, bazı parametrelerde benzer şekilde strese bağlı anksiyetede bir artış eğilimi gözlenmiş olup; melatonin ve ramelteon bu etkiyi geri çevirmiştir.

Sonuç olarak, bu çalışmada, sıçan TSSB modelinde strese bağlı anksiyetede artışın, melatonin ve ramelteon tarafından kısmen önlenileceği gösterilmiştir. Diğer önemli bir bulgu ise, melatoninin fizyolojik konsantrasyonlarındaki azalmanın tek başına anksiyeteye yol açabileceği ve melatonin ve ramelteonun kısmen yararlı olabileceği şeklindedir.

Anahtar Kelimeler: Travma sonrası stres bozukluğu, sıçan, pinealektomi, melatonin, ramelteon

8. SUMMARY

Evaluation of the Effects of Melatonin and Ramelteon in a Rat Posttraumatic Stress Model

Post-traumatic stress disorder (PTSD) is an important psychiatric disorder, and it is a common disorder that can develop after experiencing or witnessing traumatic events. Some of the side symptoms of PTSD, such as sleep disturbance, can be particularly difficult to treat and may require the use of multiple medications common in the treatment of PTSD.

There are a very limited number of studies on the role of melatonin, a hormone secreted from the pineal gland, in the etiology of PTSD and the possible efficacy of melatonin and the approved melatonin receptor agonist ramelteon in the treatment of sleep disorders.

In this study, it was aimed to investigate the efficacy of melatonin and ramelteon in the PTSD model created in pinealectomy and non-pinealectomy rats. For this purpose, after the PTSD model was created, the results of behavioral experiments were evaluated and brain-derived neurotrophic factor (BDNF), pro-brain-derived neurotrophic factor (pro-BDNF), corticotropin-releasing hormone (CRH) and tropomyosin receptor kinase (TrkB) in brain tissue were analyzed by immunohistochemistry and Elisa methods, which are thought to be associated with PTSD.

Pinealectomy, which is known to significantly reduce melatonin levels in rats, caused a significant increase in stress and anxiety when behavioral tests, biochemistry and immunohistochemistry findings were evaluated together. This finding is important in that there is no study in the literature on the increase in stress and anxiety due to the decrease in physiological melatonin levels as a result of pinealectomy. Again, when all parameters were evaluated together, a greater increase in stress-related anxiety in pinealectomized rats could not be detected for many parameters except the time spent in the open arm in the elevated plus maze (EPM) test, and the beneficial effects of melatonin and ramelteon were also limited.

In rats that did not undergo pinealectomy surgery, an increase in stress-related anxiety was observed in the EPM test; melatonin and especially ramelteon have been found to be partially successful in reversing this effect. In the biochemical analyzes performed in the hippocampus, an increasing trend was detected in stress-related anxiety; melatonin and ramelteon reversed this effect. In immunohistochemistry analyses, an increase in stress-related anxiety was observed in some parameters; melatonin and ramelteon reversed this effect.

In conclusion, in this study, it was shown that the increase in stress-related anxiety in the rat PTSD model can be partially prevented by melatonin and ramelteon. Another important finding is that the decrease in physiological concentrations of melatonin may cause anxiety and melatonin and ramelteon may be partially beneficial.

Key words: Post-traumatic stress disorder, rat, pinealectomy, melatonin, ramelteon

9. KAYNAKLAR

1. Resnick HS, Kilpatrick DG, Dansky BS, Saunders BE, et al. Prevalence of civilian trauma and posttraumatic stress disorder in a representative national sample of women. *J Consult Clin Psychol*. 1993;61(6):984–91.
2. Harvey AG, Bryant RA, Rapee RM. Preconscious Processing of Threat in Posttraumatic Stress Disorder I. *Cognit Ther Res*. 1996;20(6):613–23.
3. Uddo M, Vasterling JJ, Brailey K, Sutker PB. Memory and attention in combat-related post-traumatic stress disorder (PTSD). *J Psychopathol Behav Assess* 1993 151. 1993 Mar;15(1):43–52.
4. Breslau N, Kessler RC, Chilcoat HD, Schultz LR, Davis GC, Andreski P. Trauma and posttraumatic stress disorder in the community: the 1996 Detroit Area Survey of Trauma. *Arch Gen Psychiatry*. 1998;55(7):626–32.
5. Tedstone JE, Tarrier N. Posttraumatic stress disorder following medical illness and treatment. *Clin Psychol Rev*. 2003 May 1;23(3):409–48.
6. Kangas M, Henry JL, Bryant RA. Posttraumatic stress disorder following cancer. A conceptual and empirical review. *Clin Psychol Rev*. 2002;22(4):499–524.
7. DIAGNOSTIC AND STATISTICAL MANUAL OF DSM-5™.
8. Pacella ML, Hruska B, Delahanty DL. The physical health consequences of PTSD and PTSD symptoms: A meta-analytic review. *J Anxiety Disord*. 2013 Jan 1;27(1):33–46.
9. Kessler RC, Rose S, Koenen KC, Karam EG, Stang PE, Stein DJ, et al. How well can post-traumatic stress disorder be predicted from pre-trauma risk factors? An exploratory study in the WHO World Mental Health Surveys. *World Psychiatry*. 2014 Oct 1;13(3):265–74.
10. Kessler RC, Berglund P, Demler O, Jin R, Merikangas KR, Walters EE. Lifetime prevalence and age-of-onset distributions of DSM-IV disorders in the National Comorbidity Survey Replication. *Arch Gen Psychiatry*. 2005 Jun;62(6):593–602.

11. Van Ameringen M, Mancini C, Patterson B, Boyle MH. Post-traumatic stress disorder in Canada. *CNS Neurosci Ther*. 2008 Sep;14(3):171–81.
12. Koenen KC, Ratanatharathorn A, Ng L, McLaughlin KA, Bromet EJ, Stein DJ, et al. Posttraumatic stress disorder in the World Mental Health Surveys. *Psychol Med*. 2017 Oct 1;47(13):2260–74.
13. Goldstein RB, Smith SM, Chou SP, Saha TD, Jung J, Zhang H, et al. The epidemiology of DSM-5 posttraumatic stress disorder in the United States: results from the National Epidemiologic Survey on Alcohol and Related Conditions-III. *Soc Psychiatry Psychiatr Epidemiol*. 2016 Aug 1;51(8):1137–48.
14. Kessler RC, Wai TC, Demler O, Walters EE. Prevalence, severity, and comorbidity of 12-month DSM-IV disorders in the National Comorbidity Survey Replication. *Arch Gen Psychiatry*. 2005 Jun;62(6):617–27.
15. Kirkpatrick H, Heller G. Post-traumatic stress disorder: theory and treatment update. *Int J Psychiatry Med*. 2014 Jan 1;47(4):337–46.
16. Stein DJ, Seedat S, Iversen A, Wessely S. Post-traumatic stress disorder: medicine and politics. *Lancet (London, England)*. 2007 Jan 13;369(9556):139–44.
17. Kroll J. Posttraumatic Symptoms and the Complexity of Responses to Trauma. *JAMA*. 2003 Aug 6;290(5):667–70.
18. Sareen J, Erickson J, Medved MI, Asmundson GJG, Enns MW, Stein M, et al. Risk factors for post-injury mental health problems. *Depress Anxiety*. 2013 Apr;30(4):321–7.
19. Vieweg WVR, Julius DA, Fernandez A, Beatty-Brooks M, Hettema JM, Pandurangi AK. Posttraumatic stress disorder: clinical features, pathophysiology, and treatment. *Am J Med*. 2006 May;119(5):383–90.
20. Liebschutz J, Saitz R, Brower V, Keane TM, Lloyd-Travaglini C, Averbuch T, et al. PTSD in urban primary care: high prevalence and low physician recognition. *J Gen Intern Med*. 2007 Jun;22(6):719–26.
21. Bisson JI. Post-traumatic stress disorder. *Occup Med (Lond)*. 2007 Sep;57(6):399–403.

22. Brewin CR, Andrews B, Valentine JD. Meta-analysis of risk factors for posttraumatic stress disorder in trauma-exposed adults. *J Consult Clin Psychol.* 2000;68(5):748–66.
23. Bremner JD, Randall P, Scott TM, Bronen RA, Seibyl JP, Southwick SM, et al. MRI-based measurement of hippocampal volume in patients with combat-related posttraumatic stress disorder. *Am J Psychiatry.* 1995;152(7):973–81.
24. Karl A, Schaefer M, Malta LS, Dörfel D, Rohleder N, Werner A. A meta-analysis of structural brain abnormalities in PTSD. *Neurosci Biobehav Rev.* 2006;30(7):1004–31.
25. Geraciotti J, Baker DG, Ekhtor NN, West SA, Hill KK, Bruce AB, et al. CSF norepinephrine concentrations in posttraumatic stress disorder. *Am J Psychiatry.* 2001;158(8):1227–30.
26. Van Der Kolk BA. The psychobiology of posttraumatic stress disorder. *J Clin Psychiatry.* 1997;58 Suppl 9(SUPPL. 9):16–24.
27. Kilpatrick DG, Koenen KC, Ruggiero KJ, Acierno R, Galea S, Resnick HS, et al. The serotonin transporter genotype and social support and moderation of posttraumatic stress disorder and depression in hurricane-exposed adults. *Am J Psychiatry.* 2007 Nov;164(11):1693–9.
28. Tian Y, Liu H, Guse L, Wong TKS, Li J, Bai Y, et al. Association of Genetic Factors and Gene-Environment Interactions With Risk of Developing Posttraumatic Stress Disorder in a Case-Control Study. *Biol Res Nurs.* 2015 Jul 19;17(4):364–72.
29. Duncan LE, Cooper BN, Shen H. Robust Findings From 25 Years of PTSD Genetics Research. *Curr Psychiatry Rep.* 2018 Dec 1;20(12).
30. Gelernter J, Sun N, Polimanti R, Pietrzak R, Levey DF, Bryois J, et al. Genome-wide association study of post-traumatic stress disorder reexperiencing symptoms in >165,000 US veterans. *Nat Neurosci.* 2019 Sep 1;22(9):1394–401.
31. Binder EB, Bradley RG, Liu W, Epstein MP, Deveau TC, Mercer KB, et al. Association of FKBP5 polymorphisms and childhood abuse with risk of posttraumatic stress disorder symptoms in adults. *JAMA.* 2008 Mar

- 19;299(11):1291–305.
32. Breslau N, Chilcoat HD, Kessler RC, Davis GC. Previous exposure to trauma and PTSD effects of subsequent trauma: results from the Detroit Area Survey of Trauma. *Am J Psychiatry*. 1999;156(6):902–7.
 33. Schnyder U, Moergeli H, Klaghofer R, Buddeberg C. Incidence and prediction of posttraumatic stress disorder symptoms in severely injured accident victims. *Am J Psychiatry*. 2001;158(4):594–9.
 34. Ravindran LN, Stein MB. Pharmacotherapy of PTSD: premises, principles, and priorities. *Brain Res*. 2009 Oct 1;1293:24–39.
 35. Mohamed S, Rosenheck RA. Pharmacotherapy of PTSD in the U.S. Department of Veterans Affairs: diagnostic- and symptom-guided drug selection. *J Clin Psychiatry*. 2008;69(6):959–65.
 36. Harpaz-Rotem I, Rosenheck RA, Mohamed S, Desai RA. Pharmacologic treatment of posttraumatic stress disorder among privately insured Americans. *Psychiatr Serv*. 2008;59(10):1184–90.
 37. Stein DJ, Ipser JC, Seedat S, Sager C, Amos T. Pharmacotherapy for post traumatic stress disorder (PTSD). *Cochrane Database Syst Rev*. 2006 Jan 25;(1).
 38. Davidson J, Baldwin D, Stein DJ, Kuper E, Benattia I, Ahmed S, et al. Treatment of posttraumatic stress disorder with venlafaxine extended release: a 6-month randomized controlled trial. *Arch Gen Psychiatry*. 2006;63(10):1158–65.
 39. Davidson J, Rothbaum BO, Tucker P, Asnis G, Benattia I, Musgnung JJ. Venlafaxine extended release in posttraumatic stress disorder: a sertraline- and placebo-controlled study. *J Clin Psychopharmacol*. 2006 Jun;26(3):259–67.
 40. Villarreal G, Hamner MB, Cañive JM, Robert S, Calais LA, Durklaski V, et al. Efficacy of Quetiapine Monotherapy in Posttraumatic Stress Disorder: A Randomized, Placebo-Controlled Trial. *Am J Psychiatry*. 2016 Dec 1;173(12):1205–12.
 41. Carey P, Suliman S, Ganesan K, Seedat S, Stein DJ. Olanzapine monotherapy in posttraumatic stress disorder: efficacy in a

- randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Hum Psychopharmacol*. 2012 Jul;27(4):386–91.
42. Padala PR, Madison J, Monnahan M, Marcil W, Price P, Ramaswamy S, et al. Risperidone monotherapy for post-traumatic stress disorder related to sexual assault and domestic abuse in women. *Int Clin Psychopharmacol*. 2006;21(5):275–80.
 43. Khachatryan D, Groll D, Booij L, Sepehry AA, Schütz CG. Prazosin for treating sleep disturbances in adults with posttraumatic stress disorder: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Gen Hosp Psychiatry*. 2016 Mar 1;39:46–52.
 44. Liberzon I, Krstov M, Young EA. Stress-restress: effects on ACTH and fast feedback. *Psychoneuroendocrinology*. 1997 Aug;22(6):443–53.
 45. Masini C V., Sauer S, White J, Day HEW, Campeau S. Non-associative defensive responses of rats to ferret odor. *Physiol Behav*. 2006 Jan 30;87(1):72–81.
 46. Blanchard RJ, Nikulina JN, Sakai RR, McKittrick C, McEwen B, Blanchard DC. Behavioral and endocrine change following chronic predatory stress. *Physiol Behav*. 1998 Feb 15;63(4):561–9.
 47. Cohen H, Zohar J, Matar MA, Zeev K, Loewenthal U, Richter-Levin G. Setting apart the affected: the use of behavioral criteria in animal models of post traumatic stress disorder. *Neuropsychopharmacology*. 2004 Nov;29(11):1962–70.
 48. Adamec RE, Shallow T. Lasting effects on rodent anxiety of a single exposure to a cat. *Physiol Behav*. 1993;54(1):101–9.
 49. Van Dijken HH, Van Der Heyden JAM, Mos J, Tilders FJH. Inescapable footshocks induce progressive and long-lasting behavioural changes in male rats. *Physiol Behav*. 1992;51(4):787–94.
 50. Louvart H, Maccari S, Ducrocq F, Thomas P, Darnaudéry M. Long-term behavioural alterations in female rats after a single intense footshock followed by situational reminders. *Psychoneuroendocrinology*. 2005 May;30(4):316–24.
 51. Louvart H, Maccari S, Lesage J, Léonhardt M, Dickes-Coopman A,

- Darnaudéry M. Effects of a single footshock followed by situational reminders on HPA axis and behaviour in the aversive context in male and female rats. *Psychoneuroendocrinology*. 2006 Jan;31(1):92–9.
52. Maier SF. Exposure to the stressor environment prevents the temporal dissipation of behavioral depression/learned helplessness. *Biol Psychiatry*. 2001 May 1;49(9):763–73.
 53. Pynoos RS, Ritzmann RF, Steinberg AM, Goenjian A, Prisecaru I. A behavioral animal model of posttraumatic stress disorder featuring repeated exposure to situational reminders. *Biol Psychiatry*. 1996 Jan 15;39(2):129–34.
 54. Pawlyk AC, Jha SK, Brennan FX, Morrison AR, Ross RJ. A rodent model of sleep disturbances in posttraumatic stress disorder: the role of context after fear conditioning. *Biol Psychiatry*. 2005 Feb 1;57(3):268–77.
 55. Prut L, Belzung C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. *Eur J Pharmacol*. 2003 Feb 28;463(1–3):3–33.
 56. Dunn AJ, Berridge CW, Lai YI, Yachabach TL. CRF-induced excessive grooming behavior in rats and mice. *Peptides*. 1987;8(5):841–4.
 57. Crawley JN. Exploratory behavior models of anxiety in mice. *Neurosci Biobehav Rev*. 1985;9(1):37–44.
 58. Bale TL, Contarino A, Smith GW, Chan R, Gold LH, Sawchenko PE, et al. Mice deficient for corticotropin-releasing hormone receptor-2 display anxiety-like behaviour and are hypersensitive to stress. *Nat Genet*. 2000 Apr;24(4):410–4.
 59. Burstein O, Shoshan N, Doron R, Akirav I. Cannabinoids prevent depressive-like symptoms and alterations in BDNF expression in a rat model of PTSD. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2018 Jun 8;84(Pt A):129–39.
 60. Lee B, Lee H. Systemic Administration of Curcumin Affect Anxiety-Related Behaviors in a Rat Model of Posttraumatic Stress Disorder via Activation of Serotonergic Systems. *Evid Based Complement Alternat*

Med. 2018 Jun 19;2018.

61. Prajapati SK, Dangi DS, Krishnamurthy S. Repeated caffeine administration aggravates post-traumatic stress disorder-like symptoms in rats. *Physiol Behav.* 2019 Nov 1;211.
62. Alzoubi KH, Al Subeh ZY, Khabour OF. Evaluating the protective effect of etazolate on memory impairment, anxiety- and depression-like behaviors induced by post traumatic stress disorder. *Brain Res Bull.* 2017 Oct 1;135:185–92.
63. Patki G, Li L, Allam F, Solanki N, Dao AT, Alkadhi K, et al. Moderate treadmill exercise rescues anxiety and depression-like behavior as well as memory impairment in a rat model of posttraumatic stress disorder. *Physiol Behav.* 2014 May 10;130:47–53.
64. Walf AA, Frye CA. The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents. *Nat Protoc* 2007 22. 2007 Mar 1;2(2):322–8.
65. Hoffman JR, Ostfeld I, Kaplan Z, Zohar J, Cohen H. Exercise Enhances the Behavioral Responses to Acute Stress in an Animal Model of PTSD. *Med Sci Sports Exerc.* 2015 Oct 19;47(10):2043–52.
66. Park H, Poo MM. Neurotrophin regulation of neural circuit development and function. *Nat Rev Neurosci* 2013 141. 2012 Dec 20;14(1):7–23.
67. Autry AE, Monteggia LM. Brain-Derived Neurotrophic Factor and Neuropsychiatric Disorders. *Pharmacol Rev.* 2012 Apr 1;64(2):238–58.
68. Aid T, Kazantseva A, Piirsoo M, Palm K, Timmusk T. Mouse and rat BDNF gene structure and expression revisited. *J Neurosci Res.* 2007 Feb 15;85(3):525–35.
69. Pruunsild P, Kazantseva A, Aid T, Palm K, Timmusk T. Dissecting the human BDNF locus: Bidirectional transcription, complex splicing, and multiple promoters. *Genomics.* 2007 Sep 1;90(3):397–406.
70. Ghosh A, Carnahan J, Greenberg ME. Requirement for BDNF in Activity-Dependent Survival of Cortical Neurons. *Science* (80-). 1994;263(5153):1618–23.
71. Zafra F, Castren E, Thoenen H, Lindholm D. Interplay between

- glutamate and gamma-aminobutyric acid transmitter systems in the physiological regulation of brain-derived neurotrophic factor and nerve growth factor synthesis in hippocampal neurons. *Proc Natl Acad Sci*. 1991 Nov 15;88(22):10037–41.
72. Leßmann V, Brigadski T. Mechanisms, locations, and kinetics of synaptic BDNF secretion: an update. *Neurosci Res*. 2009;65(1):11–22.
 73. Leal G, Afonso PM, Salazar IL, Duarte CB. Regulation of hippocampal synaptic plasticity by BDNF. *Brain Res*. 2015 Sep 24;1621:82–101.
 74. Chang SH, Yu YH, He A, Ou CY, Shyu BC, Huang ACW. BDNF Protein and BDNF mRNA Expression of the Medial Prefrontal Cortex, Amygdala, and Hippocampus during Situational Reminder in the PTSD Animal Model. *Behav Neurol*. 2021;2021.
 75. Xue F, Xue S shan, Liu L, Sang H fei, Ma Q rui, Tan Q rong, et al. Early intervention with electroacupuncture prevents PTSD-like behaviors in rats through enhancing hippocampal endocannabinoid signaling. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2019 Jul 13;93:171–81.
 76. Kataoka T, Fuchikami M, Nojima S, Nagashima N, Araki M, Omura J, et al. Combined brain-derived neurotrophic factor with extinction training alleviate impaired fear extinction in an animal model of post-traumatic stress disorder. *Genes Brain Behav*. 2019 Sep 1;18(7).
 77. Solanki N, Alkadhi I, Atrooz F, Patki G, Salim S. Grape powder prevents cognitive, behavioral, and biochemical impairments in a rat model of posttraumatic stress disorder. *Nutr Res*. 2015 Jan 1;35(1):65–75.
 78. Ieraci A, Mallei A, Popoli M. Social Isolation Stress Induces Anxious-Depressive-Like Behavior and Alterations of Neuroplasticity-Related Genes in Adult Male Mice. *Neural Plast*. 2016;2016.
 79. Fernandez-Quezada D, García-Zamudio A, Ruvalcaba-Delgadillo Y, Luquín S, García-Estrada J, Huerta FJ. Male rats exhibit higher pro-BDNF, c-Fos and dendritic tree changes after chronic acoustic stress. *Biosci Trends*. 2019;13(6):546–55.

80. Matsuoka Y, Nishi D, Tanima Y, Itakura M, Kojima M, Hamazaki K, et al. Serum pro-BDNF/BDNF as a treatment biomarker for response to docosahexaenoic acid in traumatized people vulnerable to developing psychological distress: a randomized controlled trial. *Transl Psychiatry*. 2015 Jul 7;5(7).
81. Soppet D, Escandon E, Maragos J, Middlemas DS, Raid SW, Blair J, et al. The neurotrophic factors brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 are ligands for the trkB tyrosine kinase receptor. *Cell*. 1991 May 31;65(5):895–903.
82. Madara JC, Levine ES. Presynaptic and postsynaptic NMDA receptors mediate distinct effects of brain-derived neurotrophic factor on synaptic transmission. *J Neurophysiol*. 2008 Dec;100(6):3175–84.
83. Wang J, Gao F, Cui S, Yang S, Gao F, Wang X, et al. Utility of 7,8-dihydroxyflavone in preventing astrocytic and synaptic deficits in the hippocampus elicited by PTSD. *Pharmacol Res*. 2022 Feb 1;176:106079.
84. Takei S, Morinobu S, Yamamoto S, Fuchikami M, Matsumoto T, Yamawaki S. Enhanced hippocampal BDNF/TrkB signaling in response to fear conditioning in an animal model of posttraumatic stress disorder. *J Psychiatr Res*. 2011 Apr 1;45(4):460–8.
85. Nibuya M, Takahashi M, Russell DS, Duman RS. Repeated stress increases catalytic TrkB mRNA in rat hippocampus. *Neurosci Lett*. 1999 May 28;267(2):81–4.
86. Herman JP, McKlveen JM, Ghosal S, Kopp B, Wulsin A, Makinson R, et al. Regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenocortical stress response. *Compr Physiol*. 2016 Apr 1;6(2):603.
87. Myers B, McKlveen JM, Herman JP. Glucocorticoid actions on synapses, circuits, and behavior: Implications for the energetics of stress. *Front Neuroendocrinol*. 2014 Apr 1;35(2):180–96.
88. Mar Sa´nchez M, Sa´nchez S, Young LJ, Plotsky PM, Insel TR. Autoradiographic and In Situ Hybridization Localization of Corticotropin-Releasing Factor 1 and 2 Receptors in Nonhuman

- Primate Brain. *J Comp Neurol.* 1999;408:365–77.
89. Hiroi N, Wong ML, Licinio J, Park C, Young M, Gold PW, et al. Expression of corticotropin releasing hormone receptors type I and type II mRNA in suicide victims and controls. *Mol Psychiatry* 2001 65. 2001 Aug 29;6(5):540–6.
 90. Bale TL, Picetti R, Contarino A, Koob GF, Vale WW, Lee KF. Mice Deficient for Both Corticotropin-Releasing Factor Receptor 1 (CRFR1) and CRFR2 Have an Impaired Stress Response and Display Sexually Dichotomous Anxiety-Like Behavior. *J Neurosci.* 2002 Jan 1;22(1):193–9.
 91. Chan RKW, Vale WW, Sawchenko PE. Paradoxical activational effects of a corticotropin-releasing factor-binding protein “ligand inhibitor” in rat brain. *Neuroscience.* 2000 Oct 27;101(1):115–29.
 92. Stinnett GS, Westphal NJ, Seasholtz AF. Pituitary CRH-binding protein and stress in female mice. *Physiol Behav.* 2015 Oct 15;150:16–23.
 93. Laryea G, Arnett MG, Muglia LJ. Behavioral Studies and Genetic Alterations in Corticotropin-Releasing Hormone (CRH) Neurocircuitry: Insights into Human Psychiatric Disorders. *Behav Sci* 2012, Vol 2, Pages 135-171. 2012 Jun 21;2(2):135–71.
 94. Contarino A, Dellu F, Koob GF, Smith GW, Lee KF, Vale W, et al. Reduced anxiety-like and cognitive performance in mice lacking the corticotropin-releasing factor receptor 1. *Brain Res.* 1999 Jul 17;835(1):1–9.
 95. Lamberts SWJ, Bruining HA, de Jong FH. Corticosteroid Therapy in Severe Illness. <http://dx.doi.org/101056/NEJM199710303371807>. 2009 Aug 20;337(18):1285–92.
 96. Esteban N V., Loughlin T, Yergey AL, Zawadzki JK, Booth JD, Winterer JC, et al. Daily Cortisol Production Rate in Man Determined by Stable Isotope Dilution/Mass Spectrometry. *J Clin Endocrinol Metab.* 1991 Jan 1;72(1):39–45.
 97. Moison C, Assemat F, Daunay A, Tost J, Guieysse-Peugeot AL, Arimondo PB. Synergistic chromatin repression of the tumor

- suppressor gene RARB in human prostate cancers. *Epigenetics*. 2014 Feb 3;9(4):477–82.
98. Brodnik ZD, Black EM, Clark MJ, Kornsey KN, Snyder NW, España RA. Susceptibility to traumatic stress sensitizes the dopaminergic response to cocaine and increases motivation for cocaine. *Neuropharmacology*. 2017 Oct 1;125:295–307.
 99. Cohen H, Maayan R, Touati-Werner D, Kaplan Z, A. Matar M, Loewenthal U, et al. Decreased circulatory levels of neuroactive steroids in behaviourally more extremely affected rats subsequent to exposure to a potentially traumatic experience. *Int J Neuropsychopharmacol*. 2007 Apr;10(2):203–9.
 100. Kozlovsky N, Matar MA, Kaplan Z, Zohar J, Cohen H. A distinct pattern of intracellular glucocorticoid-related responses is associated with extreme behavioral response to stress in an animal model of post-traumatic stress disorder. *Eur Neuropsychopharmacol*. 2009 Nov;19(11):759–71.
 101. Schwendt M, Shallcross J, Hadad NA, Namba MD, Hiller H, Wu L, et al. A novel rat model of comorbid PTSD and addiction reveals intersections between stress susceptibility and enhanced cocaine seeking with a role for mGlu5 receptors. *Transl Psychiatry*. 2018 Dec 1;8(1).
 102. Klaassens ER, Giltay EJ, Cuijpers P, van Veen T, Zitman FG. Adulthood trauma and HPA-axis functioning in healthy subjects and PTSD patients: a meta-analysis. *Psychoneuroendocrinology*. 2012 Mar;37(3):317–31.
 103. Meewisse ML, Reitsma JB, De Vries GJ, Gersons BPR, Olf M. Cortisol and post-traumatic stress disorder in adults: systematic review and meta-analysis. *Br J Psychiatry*. 2007 Nov;191(NOV.):387–92.
 104. Morris MC, Compas BE, Garber J. Relations among posttraumatic stress disorder, comorbid major depression, and HPA function: a systematic review and meta-analysis. *Clin Psychol Rev*. 2012 Jun;32(4):301–15.

105. Belvederi Murri M, Pariante C, Mondelli V, Masotti M, Atti AR, Mellacqua Z, et al. HPA axis and aging in depression: Systematic review and meta-analysis. *Psychoneuroendocrinology*. 2014 Mar 1;41:46–62.
106. Nicolson NA. Measurement of cortisol. *Handb Physiol Res Methods Heal Psychol*. 2008 Jan 1;37–74.
107. Yehuda R, Halligan SL, Grossman R, A. Golier J, Wong C. The cortisol and glucocorticoid receptor response to low dose dexamethasone administration in aging combat veterans and holocaust survivors with and without posttraumatic stress disorder. *Biol Psychiatry*. 2002 Sep 1;52(5):393–403.
108. Pandi-Perumal SR, Trakht I, Srinivasan V, Spence DW, Maestroni GJM, Zisapel N, et al. Physiological effects of melatonin: Role of melatonin receptors and signal transduction pathways. *Prog Neurobiol*. 2008 Jul 1;85(3):335–53.
109. Reiter RJ, Korkmaz A. Clinical aspects of melatonin. *Saudi Med J*. 2008;29(11):1537–47.
110. Reppert SM, Weaver DR, Godson C. Melatonin receptors step into the light: cloning and classification of subtypes. *Trends Pharmacol Sci*. 1996;17(3):100–2.
111. Dubocovich ML, Markowska M. Functional MT1 and MT2 melatonin receptors in mammals. *Endocr* 2005 272. 2005;27(2):101–10.
112. Wu YH, Zhou JN, Balesar R, Unmehopa U, Bao A, Jockers B, et al. Distribution of MT1 melatonin receptor immunoreactivity in the human hypothalamus and pituitary gland: Colocalization of MT1 with vasopressin, oxytocin, and corticotropin-releasing hormone. *J Comp Neurol*. 2006 Dec 20;499(6):897–910.
113. Paul MA, Love RJ, Jetly R, Richardson JD, Lanius RA, Miller JC, et al. Blunted Nocturnal Salivary Melatonin Secretion Profiles in Military-Related Posttraumatic Stress Disorder. *Front psychiatry*. 2019 Dec 6;10.
114. McFarlane AC, Barton CA, Briggs N, Kennaway DJ. The relationship

- between urinary melatonin metabolite excretion and posttraumatic symptoms following traumatic injury. *J Affect Disord*. 2010 Dec 1;127(1–3):365–9.
115. Huang F, Yang Z, Liu X, Li CQ. Melatonin facilitates extinction, but not acquisition or expression, of conditional cued fear in rats. *BMC Neurosci*. 2014 Jul 15;15.
 116. Lee B, Shim I, Lee H, Hahm DH. Melatonin ameliorates cognitive memory by regulation of cAMP-response element-binding protein expression and the anti-inflammatory response in a rat model of post-traumatic stress disorder. *BMC Neurosci*. 2018 Jul 4;19(1).
 117. Cohen H, Zohar J, Carmi L. Effects of agomelatine on behaviour, circadian expression of period 1 and period 2 clock genes and neuroplastic markers in the predator scent stress rat model of PTSD. *World J Biol Psychiatry*. 2020 Apr 20;21(4):255–73.
 118. Agorastos A, Linthorst ACE. Potential pleiotropic beneficial effects of adjuvant melatonergic treatment in posttraumatic stress disorder. *J Pineal Res*. 2016 Aug 1;61(1):3–26.
 119. Kus MA, Sarsilmaz M, Karaca O, Acar T, Gülcen B, Hismiogullari AA, et al. Effects of melatonin hormone on hippocampus in pinealectomized rats: An immunohistochemical and biochemical study. *Neuroendocrinol Lett*. 2013;34(5):418–25.
 120. Kuszak J, Rodin M. A new technique of pinealectomy for adult rats. *Experientia*. 1977 Feb;33(2):283–4.
 121. Vanecek J. Cellular mechanisms of melatonin action. *Physiol Rev*. 1998;78(3):687–721.
 122. Kato K, Hirai K, Nishiyama K, Uchikawa O, Fukatsu K, Ohkawa S, et al. Neurochemical properties of ramelteon (TAK-375), a selective MT1/MT2 receptor agonist. *Neuropharmacology*. 2005 Feb 1;48(2):301–10.
 123. Nosjean O, Ferro M, Cogé F, Beauverger P, Henlin JM, Lefoulon F, et al. Identification of the melatonin-binding site MT3 as the quinone reductase 2. *J Biol Chem*. 2000 Oct 6;275(40):31311–7.

124. Nosjean O, Nicolas JP, Klupsch F, Delagrangé P, Canet E, Boutin JA. Comparative pharmacological studies of melatonin receptors: mt1, mt2 and mt3/qr2. tissue distribution of mt3/qr2. *Biochem Pharmacol*. 2001 Jun 1;61(11):1369–79.
125. Karim A, Tolbert D, Cao C. Disposition kinetics and tolerance of escalating single doses of ramelteon, a high-affinity MT1 and MT2 melatonin receptor agonist indicated for treatment of insomnia. *J Clin Pharmacol*. 2006 Feb;46(2):140–8.
126. Theis JG, Sidhu J, Job S, Palmer JE, Ratcliffe JM, Ascher JA, et al. Study of the absorption, metabolism, and excretion of (14C)-ramelteon (TAK-375). *Clin Pharmacol Ther*. 2004 Feb 1;75(2):P22–P22.
127. Fukunaga K, Yabuki Y, Takahata I, Matsuo K. [Neurological mechanism and therapeutic strategy for posttraumatic stress disorders]. *Nihon Yakurigaku Zasshi*. 2018;152(4):194–201.
128. Yabuki Y, Takahata I, Matsuo K, Owada Y, Fukunaga K. Ramelteon Improves Post-traumatic Stress Disorder-Like Behaviors Exhibited by Fatty Acid-Binding Protein 3 Null Mice. *Mol Neurobiol*. 2018 Apr 1;55(4):3577–91.
129. Yabuki Y, Fukunaga K. Clinical Therapeutic Strategy and Neuronal Mechanism Underlying Post-Traumatic Stress Disorder (PTSD). *Int J Mol Sci*. 2019 Aug 1;20(15).
130. Fieckineli P, HP W. *Experimental and Surgical Technique in the Rat*. 2nd ed. Smith Kline Beecham Pharmaceutical UK. Academic Press; 1992. 284 p.
131. S K, D G, KP J. Risperidone ameliorates post-traumatic stress disorder-like symptoms in modified stress re-stress model. *Neuropharmacology*. 2013;75:62–77.
132. RJ R, A D. Anxiety, defence and the elevated plus-maze. *Neurosci Biobehav Rev*. 1997 Nov 7;21(6):801–10.
133. AS S, JW Z, J Z. The anxiolytic-like effects of puerarin on an animal model of PTSD. *Biomed Pharmacother*. 2019 Jul 1;115.
134. Louvart H, Maccari S, Lesage J, Léonhardt M, Dickes-Coopman A,

- Darnaudéry M. Effects of a single footshock followed by situational reminders on HPA axis and behaviour in the aversive context in male and female rats. *Psychoneuroendocrinology*. 2006 Jan 1;31(1):92–9.
135. Wang Z, Zhu K, Chen L, Ou Yang L, Huang Y, Zhao Y. Preventive effects of ginsenoside Rg1 on post-traumatic stress disorder (PTSD)-like behavior in male C57/B6 mice. *Neurosci Lett*. 2015 Sep 25;605:24–8.
136. Qiu Z-K, He J-L, Liu X, Zeng J, Xiao W, Fan Q-H, et al. Anxiolytic-like effects of paeoniflorin in an animal model of post traumatic stress disorder.

