

**BEZMİALEM VAKIF ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**SIÇANLARDA ZORUNLU YÜZME TESTİ İLE OLUŞTURULAN DEPRESYON  
MODELİNDE 2 BOYUTLU ELEKTROFOREZ İLE TANIYA YÖNELİK  
PROTEİNLERİN ARAŞTIRILMASI**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Tuğçe DUMAN**

**Sinir Bilimleri Anabilim Dalı**

**Sinir Bilimleri Programı**

**Tez Danışmanı: Prof. Dr. İsmet KIRPINAR**

**HAZİRAN 2017**

**BEZMİALEM VAKIF ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**SIÇANLARDA ZORUNLU YÜZME TESTİ İLE OLUŞTURULAN DEPRESYON  
MODELİNDE 2 BOYUTLU ELEKTROFOREZ İLE TANIYA YÖNELİK  
PROTEİNLERİN ARAŞTIRILMASI**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Tuğçe DUMAN**

**Sinir Bilimleri Anabilim Dalı**

**Sinir Bilimleri Programı**

**Tez Danışmanı: Prof. Dr. İsmet KIRPINAR**

**HAZİRAN 2017**

Bezmialem Vakıf Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü'nün 150705107 numaralı Yüksek Lisans Öğrencisi Tuğçe DUMAN, ilgili yönetmeliklerin belirlediği gerekli tüm şartları yerine getirdikten sonra hazırladığı "SIÇANLARDA ZORUNLU YÜZME TESTİ İLE OLUŞTURULAN DEPRESYON MODELİNDE 2 BOYUTLU ELEKTROFOREZ İLE TANIYA YÖNELİK PROTEİNLERİN ARAŞTIRILMASI" başlıklı tezini aşağıda imzaları olan jüri önünde başarı ile sunmuştur.

**Tez Danışmanı:** Prof. Dr. İsmet KIRPINAR  
Bezmialem Vakıf Üniversitesi



**Jüri Üyeleri:** Prof. Dr. İsmail MERAL  
Bezmialem Vakıf Üniversitesi



**Jüri Üyeleri:** Yrd. Doç. Dr. İlknur DURSUN  
Kemerburgaz Üniversitesi



**Teslim Tarihi** :08 Mayıs 2017

**Savunma Tarihi** :05 Haziran 2017



## ÖNSÖZ

Bu araştırmanın gerçekleşmesinde, bilgi ve tecrübesiyle beni yönlendiren, araştırmanın her aşamasında bana destek veren değerli görüş ve önerilerini esirgemeyen değerli hocam, tez danışmanım; Prof. Dr. İsmet KIRPINAR'a, araştırma sonuçlarının analizinde bilgi ve tecrübesiyle öneri ve önemli katkılarıyla destek sağlayan değerli hocam Prof. Dr. Murat KASAP'a, tez konumun belirlenmesinde ve geliştirilmesinde her türlü desteği sağlayan ve değerli görüş ve önerilerini esirgemeyen değerli hocam Prof. Dr. Abdürrahim KOÇYİĞİT'e, depresyon modeli oluşturma sürecinde her türlü desteğini ve bilgisini esirgemeyen değerli hocam Yrd. Doç. Dr. Birsen ELİBOL'a, teşekkürlerimi sunuyorum.

Tez yazma sürecinde desteklerini üzerimden hiçbir zaman eksik etmeyen sevgili arkadaşlarım Ersin KARATAŞ'a, Huri BULUT'a, Özlem ÖZTÜRK'e, Nur KURBETLİ'ye, Esra AKBAŞ'a ve Özlem BİLDİK'e teşekkürlerimi sunuyorum.

Beni yetiştirebilmek için türlü fedakarlıklar yapıp hayatım boyunca her zaman yanımda olan, bana destek veren, sevgilerini ve dualarını esirgemeyen ve haklarını hiçbir şekilde ödeyemeyeceğim ANNEME ve BABAMA ve ikizim Tuğba'ya çok teşekkür ederim.

Haziran 2017

Tuğçe Duman  
Psikolog

## BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmamı olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

Tuğçe DUMAN

İmza

## İÇİNDEKİLER

|                                                      | <u>Sayfa</u> |
|------------------------------------------------------|--------------|
| İÇ KAPAK .....                                       | i            |
| ONAY FORMU .....                                     | ii           |
| İTHAF YAZISI .....                                   | iii          |
| ÖNSÖZ .....                                          | iv           |
| BEYAN .....                                          | v            |
| İÇİNDEKİLER .....                                    | vi           |
| KISALTMALAR .....                                    | vii          |
| TABLO LİSTESİ .....                                  | viii         |
| ŞEKİL LİSTESİ .....                                  | ix           |
| ÖZET .....                                           | x            |
| SUMMARY .....                                        | xi           |
| 1. GİRİŞ .....                                       | 1            |
| 2. GENEL BİLGİLER .....                              | 3            |
| 2.1 Depresyon .....                                  | 3            |
| 2.2 Depresyonun Tarihçesi .....                      | 3            |
| 2.3 Depresyonun Epidemiyolojisi .....                | 5            |
| 2.4 Depresyonun Etiyopatogenezi .....                | 6            |
| 2.4.1 Organik/ Biyolojik Çalışmalar .....            | 6            |
| 2.4.2 Genetik .....                                  | 6            |
| 2.4.3 Biyokimyasal etkenler .....                    | 6            |
| 2.4.4 Norepinefrin .....                             | 7            |
| 2.4.5 Serotonin(5-HT) .....                          | 7            |
| 2.4.6 Dopamin .....                                  | 8            |
| 2.4.7 GABA .....                                     | 8            |
| 2.4.8 Glutamat .....                                 | 8            |
| 2.4.9 Nörofizyolojik çalışmalar .....                | 9            |
| 2.4.10 Nöroendokrinolojik çalışmalar .....           | 9            |
| 2.4.11 Hipotalamo-pitüiter-adrenal eksen .....       | 9            |
| 2.4.12 Hipotalamo-pitüiter-tiroid eksen .....        | 10           |
| 2.4.13 Hipotalamo-pitüiter-growth hormon eksen ..... | 10           |
| 2.4.14 Nöroanatomik çalışmalar .....                 | 11           |
| 2.4.15 Nöroplastisite .....                          | 11           |
| 2.1.4 Depresyonla İlgili Psikolojik Kuramlar.....    | 12           |
| 2.1.4.1 Psikanalitik kuram.....                      | 12           |
| 2.1.4.2 Bilişsel kuram .....                         | 13           |
| 2.1.4.3 Davranışçı kuram .....                       | 13           |
| 2.1.5 Depresyonun klinik tanısı .....                | 14           |
| 2.1.6 Depresyonun tedavisi .....                     | 14           |
| 2.2 Deneysel Depresyon Hayvan Modelleri .....        | 15           |

|                                                        |           |
|--------------------------------------------------------|-----------|
| 2.2.1 Rezerpin etkisi.....                             | 15        |
| 2.2.2 Psikostimulan yoksunluğu.....                    | 16        |
| 2.2.3 Öğrenilmiş çaresizlik.....                       | 16        |
| 2.2.4 Kronik hafif stress modeli.....                  | 17        |
| 2.2.5 Sosyal stres .....                               | 17        |
| 2.2.6 Olfaktör bulbektomi .....                        | 17        |
| 2.2.7 Kuyruktan asma testi .....                       | 18        |
| 2.2.8 Zorunlu yüzme testi .....                        | 18        |
| 2.3 Protein Saflaştırma Yöntemleri.....                | 19        |
| 2.3.1 Diyaliz ve ultrafiltrasyon .....                 | 19        |
| 2.3.2 Santrifügasyon yöntemleri .....                  | 20        |
| 2.3.2.1 Densitizional santrifügasyon .....             | 20        |
| 2.3.2.2 Differansiyel santrifügasyon .....             | 21        |
| 2.3.3 Kromotofografik yöntemler .....                  | 21        |
| 2.3.3.1 Jel filtrasyonu .....                          | 22        |
| 2.3.3.2 İyon değiştirici kromatografisi .....          | 22        |
| 2.3.3.3 Affinite kromatografisi .....                  | 23        |
| 2.3.4 Elektroforetik yöntemler .....                   | 24        |
| 2.3.4.1 Elektroforez .....                             | 24        |
| 2.3.4.2 İzoelektrik fokuslama .....                    | 24        |
| <b>3. GEREÇ ve YÖNTEM .....</b>                        | <b>27</b> |
| 3.1 Gereç .....                                        | 27        |
| 3.1.1 Cihazlar .....                                   | 27        |
| 3.1.2 Kimyasal ve sarf malzemeler .....                | 27        |
| 3.1.3 Tampon ve çözeltiler .....                       | 28        |
| 3.2. Yöntem .....                                      | 30        |
| 3.2.1 Zorunlu yüzme testi yöntemi .....                | 30        |
| 3.2.2 Serum örneklerinin toplanması .....              | 31        |
| 3.2.3 2 Boyutlu jel elektroforezi .....                | 32        |
| 3.2.4 Farklı ifade edilmiş proteinleri belirleme ..... | 37        |
| 3.2.5 MALDI-TOF analizi .....                          | 37        |
| <b>4. BULGULAR .....</b>                               | <b>40</b> |
| 4.1 Zorunlu Yüzme Testi Bulguları .....                | 40        |
| 4.2 Toplanan Serum Örnekleri Bulguları .....           | 41        |
| 4.3 2 Boyutlu Jel Elektroforezi Bulguları .....        | 33        |
| 4.4 Farklı İfade Edilmiş Protein Bulguları .....       | 42        |
| 4.5 MALDI-TOF Analiz Bulguları .....                   | 44        |
| <b>5. TARTIŞMA .....</b>                               | <b>50</b> |
| <b>6. SONUÇ ve ÖNERİLER .....</b>                      | <b>56</b> |
| 6.1 Sonuçlar .....                                     | 56        |
| 6.2 Öneriler .....                                     | 58        |
| <b>KAYNAKLAR .....</b>                                 | <b>60</b> |
| <b>EKLER .....</b>                                     | <b>68</b> |
| <b>ÖZGEÇMİŞ .....</b>                                  | <b>70</b> |

## KISALTMALAR

|               |                                                                 |
|---------------|-----------------------------------------------------------------|
| <b>ACP</b>    | : Acid phosphatase                                              |
| <b>ALP</b>    | : Alkalen fosfataz                                              |
| <b>APOA4</b>  | : Apolipoprotein A-IV                                           |
| <b>BCA</b>    | : Bicinchoninic acid assay                                      |
| <b>BH</b>     | : Büyüme Hormonu                                                |
| <b>CK</b>     | : Creatine Kinase                                               |
| <b>CRH</b>    | : Kortikotropin Releasing Hormone                               |
| <b>CHAPS</b>  | : 3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1<br>propanesulfonate. |
| <b>DEKART</b> | : Deneysel ve Klinik Araştırma Merkezi                          |
| <b>GRHR</b>   | : Growth Hormone Releasing Hormone                              |
| <b>Guhci</b>  | : Guanidine Hydrochloride                                       |
| <b>HCl</b>    | : Hydrochloric asit                                             |
| <b>HDL</b>    | : High Density Lipoprotein                                      |
| <b>HVA</b>    | : Homovalinik asit                                              |
| <b>ICD</b>    | : International Classification of Diseases                      |
| <b>IEF</b>    | : Isoelectric focusing                                          |
| <b>IGF-1</b>  | : Insulin like Growth Factor 1                                  |
| <b>IgG</b>    | : Immunoglobulin G                                              |
| <b>IPG</b>    | : Immobilized pH gradient                                       |
| <b>MA</b>     | : Moleküler ağırlık                                             |
| <b>MALDI</b>  | : Matrix assisted laser desorption ionization                   |
| <b>MHPG</b>   | : Metokshidroksi fenil glikol 7                                 |
| <b>NaCl</b>   | : Sodyum Klorür                                                 |
| <b>NCS</b>    | : National Comorbidity Survey                                   |
| <b>NaOH</b>   | : Sodium hydroxide                                              |
| <b>NMR</b>    | : Nükleer manyetik rezonans                                     |

|                        |                                    |
|------------------------|------------------------------------|
| <b>PGI<sub>2</sub></b> | : Prostaglandin                    |
| <b>RBP</b>             | : RNA-binding protein              |
| <b>SDS</b>             | : Sodyum dodesil sülfat            |
| <b>TCA</b>             | : Triklometik asit                 |
| <b>TRH</b>             | : Tirotropin Releasing Hormone     |
| <b>TOF</b>             | : Time of flight mass spectrometry |
| <b>5-HT</b>            | : 5--hidroksitriptamin             |



## TABLO LİSTESİ

|                                                                                           | <u>Sayfa</u> |
|-------------------------------------------------------------------------------------------|--------------|
| <b>Tablo 2.1:</b> Depresyon modellerinin karşılaştırılması .....                          | 18           |
| <b>Tablo 3.1:</b> Cihazların marka ve modelleri .....                                     | 27           |
| <b>Tablo 4.1:</b> Deneklerin ağırlıkları.....                                             | 40           |
| <b>Tablo 4.2:</b> Deneklerin hareketsiz kalma süreleri.....                               | 40           |
| <b>Tablo 4.3:</b> Değişim gösteren proteinlerin biyolojik proses analizi .....            | 45           |
| <b>Tablo 4.4:</b> Değişim gösterilen spotların tam açıklaması ve benzerlik oranları ..... | 48           |

## ŞEKİL LİSTESİ

|                                                                                       | <u>Sayfa</u> |
|---------------------------------------------------------------------------------------|--------------|
| Şekil 2.1 : Protein saflaştırma şablonu .....                                         | 19           |
| Şekil 2.2 : Diyaliz ve membran filtrasyon tekniği .....                               | 20           |
| Şekil 2.3 : Histidin ve Ni-NTA birleşimini .....                                      | 23           |
| Şekil 3.1 : Serum protein içeriğinin genel dağılımı .....                             | 31           |
| Şekil 3.2 : Plazma ve serum .....                                                     | 33           |
| Şekil 3.3 : 2 boyutlu jel elektroforezi tekniği .....                                 | 33           |
| Şekil 3.4 : IPG striplerinin hazırlanması .....                                       | 34           |
| Şekil 3.5 : İzoelektrik odaklama cihazı .....                                         | 36           |
| Şekil 3.6 : IPTG striplere proteinlerin yüklenmesi .....                              | 37           |
| Şekil 3.7 : Güç kaynağı ve elektroforez tankı .....                                   | 38           |
| Şekil 3.8 : Maldi-TOF çalışma şekli.....                                              | 38           |
| Şekil 4.1 : Deneklerin hareketsiz kalma sürelerini karşılaştıran grafik .....         | 41           |
| Şekil 4.2 : Serum örneklerinin jele yüklenmesi .....                                  | 41           |
| Şekil 4.3 : Serumdan proteinlerin ayrışması öncesi ve sonrası jel görünümü .....      | 42           |
| Şekil 4.4 : Jellerin birbirlerine olan benzerliklerini gösteren “scatter” plotu.....  | 43           |
| Şekil 4.5 : Gruplar arasında ifade edilen proteinlerin jel üzerinde görünüm .....     | 43           |
| Şekil 4.6 : Farklı ifade edilen proteinlerin jel üzerinde görünümü .....              | 44           |
| Şekil 4.7 : Gruplar arasında ifade edilen proteinlerin yazılımı ile belirlenmesi .... | 44           |
| Şekil 4.8 : STRING analizi .....                                                      | 48           |
| Şekil 4.9 : Belirlenen proteinlerin değişim grafiği .....                             | 49           |

## **Sıçanlarda Zorunlu Yüzme Testi İle Oluşturulan Depresyon Modelinde 2 Boyutlu Elektroforez İle Tanıya Yönelik Proteinlerin Araştırılması**

### **ÖZET**

Depresyon, dünya nüfusunun yaklaşık %20 gibi büyük bir kısmını etkileyecek kadar yaygın olması yanında; günlük yaşam işlevselliğini bozarak neden olduğu yeti kayıpları, ekonomik sonuçları ve yüksek intihar eğilimi nedeniyle de en önemli psikiyatrik sorunlardan biri olma özelliğini sürdürmektedir. Major depresyon tanısında biyokimyasal tekniklere dayalı bir tanı sistemi henüz geliştirilmemiştir. Bu çalışmanın amacı, sıçanlarda zorunlu yüzme testi ile oluşturulmuş depresyon modeli ile depresyon sırasında değişim gösteren serum örneklerindeki proteinlerin tanımlanmasıdır. Depresyon ve kontrol grubu olarak ayrılan toplam 14 hayvandan alınan serum örnekleri kromatografik yöntemlerle ayrıştırılıp daha sonra 2 boyutlu elektroforez ile karşılaştırılması yapıldı. İki boyutlu elektroforez sonrasında bilgisayar yazılımı ile ifadelerinde farklılık gösteren toplam 9 potansiyel tanı proteini dizisi belirlendi.

Çalışmanın son aşaması olan MALDI-TOF analizi aşamasında, gruplar arasında farklı ifade edildiği belirlenen noktaların dizileri elektriksel alanda aminoasit kalım sürelerini hesaplama yoluyla belirlendi. Aralarında anlamlı farklılık bulunan protein ifadeleri karşılaştırılarak elde edilen 9 farklı noktanın ayrı ayrı ya da birkaçı birlikte kullanılarak potansiyel biyobelirteçler olabilecekleri sonucuna varıldı.

## **Investigation of Diagnostic Proteins by 2D Electrophoresis in Depression Model Induced by Forced Swimming Test in Rats**

### **SUMMARY**

Aside from its pervasiveness, whereby it affects as much as 20% of the world's population, depression continues to be one of the most important psychiatric problems due to the loss of power caused by disrupting daily life functioning, economic consequences, and high suicidal tendency. A diagnostic system based on biochemical techniques for major depression has not yet been developed. In this study, we aimed to identify the proteins in serum samples that change during depression with the major depression model created by forced swimming test in rats. Serum samples taken from 14 animals, as divided by depression and control groups, were separated by chromatographic methods and then compared with 2D electrophoresis. After the two-dimensional electrophoresis, a total of 9 potential diagnostic protein sequences were identified, which differed in their expressions with computer software.

During the last phase of the study of the MALDI-TOF analysis, the sequences of points identified differentially among the groups were determined by calculating the durations of amino acid residues in the electrical field. By comparing protein expressions with significant differences among them, it was concluded that 9 different points could be used together as a potential biomarker.

## 1. GİRİŞ

Günümüzde psikiyatrik problemlerin varlığı hem bireysel hem de toplumsal açıdan dikkat çekecek ölçüde artmıştır. Depresyon, dünya nüfusunun yaklaşık %20'i gibi büyük bir kısmını etkileyecek kadar yaygın olması yanında; günlük yaşam işlevselliğini bozarak neden olduğu yeti kayıpları, ekonomik sonuçları ve yüksek intihar eğilimi nedeniyle de en önemli psikiyatrik sorunlardan biri olma özelliğini sürdürmektedir. [1] Genetik ve metabolik yatkınlık ile stres ve yaşam olayları gibi çevresel faktörlerin birlikte etkin olduğu çok faktörlü bir etiyolojiye sahiptir. Anatomik işaretler yeterli olmasa da birçok işlevsel bulgu beyin devrelerinin etkilendiğini kesinlikle göstermektedir. Depresyon nörobiyolojisinde yapılan çalışmalar ve tedavide kullanılan antidepresan ilaçların etki mekanizmalarının çeşitliliğine rağmen tedaviye yüksek oranda yanıt alınamaması veya oluşan yanıtta gecikmenin görülmesi gibi klinik sorunlar bu alanda yapılacak klinik öncesi çalışmaların öneminin korunmasını sağlamaktadır. [2]

Majör depresyon hastalarında beyni incelemek için moleküler profil teknolojileri kullanılarak yapılmış birçok araştırma vardır. Depresyonda beyinde meydana gelen protein seviyesindeki değişimlerin ve diğer proteinlerle ilişkisinin belirlenmesi sendromun ilerlemesi açısından önemlidir. Proteomikler, yakın zamanlarda beyin hastalıklarının tanıları için uygun belirteçlerin keşfi, hastalık seyrini izleme ve yeni tedavi hedeflerini belirlemek üzere kullanılmaya başlanan yaklaşımlardan biridir. [3] Gen düzenlenmesi ve protein ekspresyonlarının karmaşık doğası ve bunların çevresel ve dışsal faktörlerle etkileşimini insan beyninde incelemenin güçlüğü araştırmaların hayvan modelleri üzerine odaklanmalarına neden olmuştur. [4] Hayvanlarda yürütülen klinik öncesi çalışmalar hem depresyonda nöron işleyişinin farklı boyutları ile ilgili bilgi birikimimizi arttırır hem de tanıya yönelik çalışmaların gelişmesine yönelik katkı sağlar.

İnsan metabolizmasındaki değişimler kandan izole edilen seruma da yansımaktadır. Hastanelerde tanıya yönelik yapılan klinik öncesi çalışmalarda öncelikle biyokimyasal bulgular göz önünde bulundurulmaktadır. Günümüzde, alınan serum

örneklerindeki, belirteçlerle belirlenen değişimler metabolik bir bozukluk ya da hastalığın teşhisinde kullanılmaktadır. Henüz sıçanlarda zorunlu yüzme testi ile oluşturulan depresyon modeli ile yapılmış bir proteomik çalışması bulunmamaktadır. Lee ve ark. (1988) yaptığı bir çalışmada majör depresyon modeli yapılmış sıçanlarda antidepresan ilaçları verilmiş ve verilmemiş hasta sıçanlarda değişen proteinlerin seviyesi gösterilmiştir. [5] Bu çalışmada ileri kromatografik tekniklerle aminoasit miktarlarına bakılmış olsa da 2 boyutlu elektroforez yöntemi ile proteomik konusunda bir bilgi verilmemiştir.

Bu çalışma ile deneysel depresyon modeli geliştirilmiş sıçan serumları kullanılarak depresyonlu ve sağlıklı sıçanların serumları arasındaki protein değişimleri 2 boyutlu elektroforez yöntemi ile belirlenerek diğer proteinlerle olan ilişkileri araştırılacaktır. Böylece bulunabilecek olası biyobelirteçler ile bu proteinlerdeki değişimler gözlenerek depresyonun tanısında yeni biyobelirteçler bulunması yönünde önemli bir adım atılmış olacaktır.

## **2. GENEL BİLGİLER**

### **2.1 Depresyon**

Depresyon sözlük anlamıyla ruhsal ve bedensel çöküntü, çökkünlük ve isteksizlik olarak tanımlanmaktadır. Yaşamın getirdiği stres yaratan birçok duruma gösterilen normal bir tepki olarak, hemen herkesin yaşadığı bir duygudur. Ancak yaşanan olaylarla orantılı olmadığı zaman süreklilik göstermesi durumunda psikiyatrik sendrom olarak depresyondan söz edilir. Depresyonun temelinde kişinin daha önceden isteyerek ve severek yaptığı günlük aktivitelere karşı isteksizlik durumu vardır. Zamanla bu durum kişide, kederli ve üzgün duygudurum değişiklikleri oluşturur. Bu duygudurum değişikliği kişinin günlük yaşantısında her olayın olumsuz tarafını görmesi ve geçmiş yaşantısındaki olayların olumsuz ve kötü taraflarını düşünerek kendini suçlu ve cezalandırılmış hissetmesine neden olur. Kişi aynı şekilde geleceğine karşı da umutsuz duygu ve düşünceleri pekiştirerek, hayatından zevk alamaz hale geldiğini ve yaşamasının anlamsız olduğunu düşünür. Depresyon belirtilerinden kaynaklanan sosyal ilişki sorunları, kişilerin zaman içinde toplumdan uzak ve yalnız yaşamak durumunda kalmalarına neden olabilir.

Depresyon görülme şekli olarak kişiden kişiye göre değişmektedir. Bireyin kişilik özelliklerinden sosyal destek düzeyine, ilişki sorunlarından bireyin psikoseksüel gelişimsel süreçlerine, olumsuz yaşam olaylarından işsizliğe, stresle başa çıkma becerilerinden yaşanan travmatik olaylara varan birçok değişken üzerinde depresyonun etkisinden söz edebiliriz. [6] Bununla birlikte depresyon üzerinde etki eden faktörler daha çok aydınlanır.

### **2.2 Depresyonun Tarihçesi**

Tarih öncesi dönemlerde Niobe depresyonu ağlayan bir taş ile ölümsüzleştirerek sembolize etmiştir. Tarihsel süreç içerisinde Hipokrat (M.Ö. 460-357) uykusuzluk, keder, umutsuzluk, huzursuzluk halindeki görünüm için ‘melankoli (melan=siyah,

chole=safra)' terimi ile depresyonu tanımlayan ilk kişidir. Hipokrat, vücutta dört sıvının emisyonla bağlantılı olduğunu (kan, sarı safra, kara safra, lenf) ve bunlardan kara safra fazlalığının melankoli gelişimine neden olduğunu ileri sürmüştür. [7] Depresyon gibi ruhsal bozuklukların beden sıvılarıyla beynin etkileşiminden kaynaklandığını söylemiştir. [8]

Orta çağda Avrupa'da, akıl hastalıklarının şeytanın bedeni ele geçirmesi sonucu olduğu düşüncesi hakimken, ruhsal bozuklukların tanımlanmasında ve sınıflandırılmasında İslam dünyası önemli gelişme göstermiştir. İbni Sina (M.S. 980-1037) melankoli de farklı duygulanım durumlarını tanımlamış ve farklı depresif görünümünün vücut sıvılarının farklı oranlarda karışımından kaynaklandığını, ruhu beynin bir işlevi gibi gördüğünü ve buradan kaynaklanan herhangi bir bozukluğun hastalığı ortaya çıkardığını söylemiştir. [9] 19. yy. 'da psikiyatrik bozukluklar, klinik ve anatomik yaklaşımla açıklanmaya çalışılmıştır. Melankoli terimi yerine karamsar düşüncelere sahip, genel hareketlerde azalma, ruhsal açıdan bir düşkünlük hali, heyecansal fonksiyonun azlığı anlamına gelen depresyon terimini Delasiauve hastalık tanımlamada kullanan ilk kişilerden birisidir. [10] 20. yy. başlarında Kraepelin depresyonu bir semptom olarak değil, depresif durumlar başlığı altında kategorize etmiştir. Klinik depresyonu, duygudurumda çökme, fiziksel ve zihinsel süreçlerde yavaşlama olarak tanımlamıştır. Psikiyatride ileri yaşlarda kadınlarda menapoz sonrası, erkeklerde genç erişkinlik döneminde başlayan sinirlilik ve ajitasyonların olduğu bir depresyon tipini tanımlamıştır. Ayrıca dualistik bir yaklaşımla depresyonu psikolojik ve biyolojik nedenlere bağlı olarak ortaya çıkanlar olarak sınıflandırmakla beraber, botanik bilimlerdeki sınıflandırma sistemlerinde kullanılmış olan endojen ve eksojen terimlerinin, ruhsal bozukluklarda kullanılmasını önermiştir. Kraepelin, yaptığı sınıflandırmalar ile psikiyatride birleştirici bir rol oynamıştır. [11]

Günümüz psikiyatrisinde tanı koymada önemli bir etkisi olan Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (DSM) ve International Classification of Diseases (ICD) sistemleri duygulanım bozukluklarını tek ya da yineleyici çökkünlük ve iki uçlu olarak ayırmışlardır. Son sınıflama 2013 yılında DSM-5 de yayınlanmıştır. Bu son gözden geçirme ile genel yaklaşımda önemli bir değişiklik yapılmamış, DSM-IV-TR'deki Duygudurum Bozuklukları başlığı altında sınıflanan

depresif bozukluklar, Depresyon Bozuklukları olarak ayrı bir başlık altında yer almıştır. [12]

### 2.3 Depresyonun Epidemiyolojisi

Dünya Sağlık Örgütü raporlarına göre ruhsal bozukluklar arasında toplumda giderek artış gösteren ve yetimine yol açan depresyonun yaygınlığının daha da artacağı, kalp damar hastalıklarından sonra en yaygın görülen ikinci hastalık olacağı öngörülmektedir. [13] Toplumda yaygınlığın giderek artmasının yanı sıra, kronikleşme riskinin ve intihar davranışı sıklığının artması sebebiyle depresyon hastalığı üzerinde gün geçtikçe daha fazla durulmaktadır. [14] Depresyon, bebeklikten yaşlılığa her dönemde ortaya çıkabilmektedir. Ancak orta yaşlarda özellikle 20-44 yaşları arasında daha sıklıkla görülebilen bir hastalıktır. Kadınlarda erkeklere oranla iki kat daha fazla rastlanır. Yaşam boyu gelişme olasılığı %10-25 arası kadınlarda, %5-12 arası erkeklerde değişmektedir. Kişinin ailesinde öyküsünde depresyon geçirmiş diğer aile üyelerinin bulunması hastalık riskini 1,5-3 kat arttırmaktadır. [15]

Depresif bozukluklar arasında en sık görülen depresyon türü majör depresif bozukluktur. Weismann ve ark. (1993) yaptığı çalışmada yaşam boyu majör depresyon yaygınlığı % 4,4 - % 2,7'dir. [16] Kessler ve ark. (1994) çalışmasında yaşam boyu ve yaygınlık oranı %17.1, %10.3'dir. [17] Küey'in (1985) kırsal alanda "Tanı Koydurucu Görüşme Ölçeği" kullanarak yaptığı çalışmada yaygınlık %9.2, yaşam boyu yaygınlık ise %23.6 olarak bulunmuştur. [18] Sağlık Bakanlığı tarafından yapılan, 7479 kişiyi kapsayan, Uluslararası Bileşik Tanı Görüşmesinin kullanıldığı "Türkiye Ruh Sağlığı Profili" araştırmasında, depresif nöbet yaygınlığı %4,0 kadınlarda görülme sıklığı %5,4 iken erkeklerde %2,3 olarak bulunmuştur. Bu çalışmada depresyon görülme riskinin kırsal merkeze kıyasla şehir merkezinde daha yüksek olduğu bildirilmektedir. [19]

Geçmişte yapılan çalışmalara bakıldığında depresyonun sıklıkla 30'lu yaşlarda başladığı, genç yaşlarda görülme sıklığının arttığı üzerineydi. Fakat günümüzde yapılan çalışmalar gösteriyor ki, depresyon daha erken yaşlarda başlayabileceği gibi sıklıkla 20'li yaşlarda başlayıp, orta yaş grubunda yüksek yaygınlık gösterdiği görülmektedir.

## **2.4 Depresyonun Etiyopatogenezi**

Depresyon etiyopatogenezi birçok yönden aydınlatılmaya çalışılmasına rağmen, günümüze dek yapılan çalışmalar etiyopatogenezi tam anlamıyla açıklamakta yetersiz kalmaktadır. Bunun nedenleri arasında depresyonun belirli bir hastalıktan çok bir sendrom olması, farklı alt gurupların var oluşu ve oluşumunda çoğul etkenlerin rol alması olabilir. Depresyon etiyopatogenezinde rol oynayan etkenleri organik/biyolojik çalışmalar ve psikolojik kuramlar başlıkları altında incelemek mümkündür.

### **2.4.1 Organik/Biyolojik Çalışmalar**

Depresyonun etiyolojisinin aydınlatılmasında çeşitli nörobiyolojik mekanizmaların varlığı ileri sürülmektedir. Bunlar arasında genetik, noradrenerjik sistem, serotonerjik sistem, dopaminerjik sistem, GABA, glutamaterjik sistem, nörofizyolojik çalışmalar nöroendokrinolojik faktörler, nöroanatomik bağlantılar ve nöroplastisite örnek olarak verilebilir.

### **2.4.2 Genetik**

Depresyonda genetik etkenlerin önemli olduğu yapılan aile, evlatlık ve ikiz çalışmalarında gösterilmiş olup geçişin nasıl gerçekleştiği hala tam olarak bilinmemektedir. [20] İkizler üzerinde yapılan araştırmalardan elde edilen bulgulara, özdeş ikizlerden birinde depresyon belirlendiğinde, diğer ikizin de aynı bozukluğa uğrama olasılığının %50 ile 100 arasında değiştiği görülmüştür. [21] Evlatlık çalışmalarında; depresyon öyküsü olan evlatlıkların biyolojik ebeveyninde depresyona yakalanma ihtimali veya depresyon öyküsünün olması, depresyon öyküsü olmayan biyolojik ebeveynlerinkinden daha yüksek bulunmuştur. Majör depresyon bozukluğu tanısı alan hastaların birinci derece akrabalarıyla birinci derece akrabaları hastalanma riski genel nüfusa göre iki-üç kat yüksektir.

### **2.4.3 Biyokimyasal etkenler**

Monoamin hipotezi, merkezi sinir sistemindeki bazı biyojenik aminlerin azalmasının veya inaktivasyonunun depresyon gelişiminde etkili olabileceği düşünülen ve biyolojik etiyolojisindeki rolünü açıklamaya çalışan bir hipotezdir. [22] Ancak gerek yapılan araştırmalarda ortaya çıkan çelişkili sonuçlar, gerekse antidepressanların etki

mekanizmalarındaki nörotransmitter miktarındaki artışın ve klinikte görülen cevabın zamanlama olarak uyum göstermemesi yeni hipotezlerin geliştirilmesine neden olmuştur. [23] Günümüze dek yapılan araştırmalar, depresyon gelişiminde nörotransmitter rolünün sadece monoamin hipoteziyle açıklanamayacağını göstermiş, reseptörler ve hatta gen ekspresyonunu düzenleyen moleküler olaylara yönelmiştir.

#### **2.4.4 Norepinefrin**

Norepinefrin, duygudurum, emosyonel durum, kognitif fonksiyonlar ve davranışlar üzerinde önemli bir yere sahiptir. [24] Depresif hastalarda noradrenalin salınımının azalması, deprese duygudurum, ilgi- istek kaybı, ümitsizlik düşünceleri, psikomotor retardasyon, dikkatin azalması depresif semptomlarda artışa neden olur. [25] Yapılan birçok araştırmada depresyon tanısı almış hastaların noradrenerjik fonksiyonlarında değişiklikler gösterilmiştir. Bu değişiklikler için söylenebilecek olan; plazma noradrenalin yoğunluğunda artış, noradrenalin reseptörlerinin fonksiyonlarında artış, beta adrenerjik reseptör yoğunluğunda değişiklikler, beyin omurilik sıvısında (BOS), plazmada ve idrardaki noradrenalin ana metaboliti metokshidroksi fenil glikol (MHPG) konsantrasyonlarında artış olarak gösterilebilir. [26-27] Ancak noradrenalin tek başına depresyonun etiyolojisini aydınlatmada yetersiz kalmaktadır.

#### **2.4.5 Serotonin (5-HT)**

Depresyon etiyopatogenezinde en önemli role sahip olan serotonin üzerinde en çok durulan nörotransmitterlerdendir. Serotonin miktarındaki azalma depresyona zemin hazırlamaktadır. 1970'lerin ortalarından itibaren depresyonda serotonin eksikliği hipotezi önem kazanmış ve selektif serotonin geri alım inhibitörlerinin (SSRI) yaygın şekilde kullanılması tedavinin temelini oluşturmuştur. [28] SSRI'ların etki mekanizması sinaptik aralıkta geri alımın inhibe edilmesine bağlı olarak serotonerjik aşırımın arttırılması esasına dayanır.

Beyinde raphe sistemi içinde inen ve çıkan yolaklar şeklinde bulunan serotonin, duygudurumun, uykunun, iştahın, kan basıncının, beslenme davranışının, kognitif fonksiyonların, nöroendokrin işlevlerin işleyişinden sorumludur. [29]

Depresyon ve ilişkili bozukluklarda önemli serotonin alt tipleri 5-HT<sub>1A-B</sub>, 5-HT<sub>2</sub>'dir. Serotonerjik nöronların soma ve dentritlerinde ve serotonerjik sistemin bitiş

kısımlarında korteks ve subkortikal alanlardaki hedef nöronlarda yer alan 5-HT<sub>1A</sub> reseptörleri postsinaptik otoreseptörlerdir. Bu nedenle, azalmış 5-HT<sub>1A</sub> otoreseptör işlevleri serotonin iletiminde artışa neden olurken; hedef nöronlardaki işlev azalması 5-HT<sub>1A</sub>'nın aracılık ettiği nöral iletilerin etkilerinde azalmaya neden olmaktadır. [30] 5-HT<sub>1B</sub> reseptörlerinin ise impulsif-agresif ve cinsel davranışları düzenlemede, alkol ve kokain alımında bir rolü bulunduğu bilinmektedir. Beyin korteksi ve kaudat çekirdekte en yoğun reseptörleri bulunan 5-HT<sub>2</sub> reseptörü postsinaptik regülatör reseptörü, depresyon tedavisinde dikkate alınan en önemli reseptörlerden birisidir. Serotonin ile uyarılır. Uyarılma ile postsinaptik hücrede iletiler, yani ikinci haberci sistemleri olan fosfatidilinositol'ü harekete geçirir. Bunlarda hücre içinde istenen etkiyi ortaya çıkaracak çevirici faktörlerin üretilmesini sağlar. [31] Antidepresan ilaçlar bu reseptörlerin yoğunluğunu azaltırlar.

#### **2.4.6 Dopamin**

Depresyon mekanizmasının etiopatogenezinin aydınlatılmasında etkili olduğu düşünülen alt yapılardan biri de 'beyin ödül sistemi'dir. Dopamin beyin ödül sistemindeki en etkili nörotransmitterdir. [32] Sistemin işleyişinde meydana gelen bozukluk depresif semptomların ortaya çıkmasına neden olmaktadır. Dopaminerjik işlev bozuklukları motivasyon kaybına neden olup bunun sonucunda anhedoni ortaya çıkmakta ve haz duygusu yetersiz kalmaktadır.

Beyinde tuberoinfundibuler, nigrostriyal, mezokortikal ve mezolimbik yolağın ödüllendirme ile ilişkisi iyi bilinmektedir. Mezolimbik yolak insanlarda duygudurum ve haz davranışında önemlidir. Her ne kadar depresyonun patofizyolojisinde norepinefrin ve serotonin kadar önem kazanmamışsa da dopaminin de rolü olduğu ve diğer biyogenik aminler gibi depresyonda azaldığı belirtilmektedir. Özellikle psikomotor yavaşlığı olan ve özkıyım eğilimli depresif hastaların beyin omurilik sıvısında dopaminin metaboliti olan homovanilik asit (HVA) düzeyleri düşük bulunmasına rağmen çalışmalar arasında tutarsızlıklar mevcuttur. [33]

#### **2.4.7 GABA**

GABA, santral sistemindeki en yaygın inhibitör nörotransmitterdir. Klinik çalışmalarda depresyonlu hastaların serebrospinal sıvılarında GABA konsantrasyonu

düşük bulunmuştur. Postmortem çalışmalarda da depresif hastaların beyinlerinde GABA konsantrasyonun düşük olduğu gözlenmiştir. [34, 35]

#### **2.4.8 Glutamat**

Beyinde ve omurilikte yaygın olarak bulunan glutamat, eksitator bir nörotransmitterdir. Merkezi sinir sisteminin hem fizyolojisinde hem de patofizyolojisinde önemli role sahip olduğu düşünülmektedir.

Altamura ve ark (1995) yaptığı çalışmada bir grup depresyonlu hastaların plazmasında yükselmiş glutamat seviyeleri görülmüş olsa da, sonraki çalışmalarda antidepresan kullanmayan depresyon tanılı hastalar ile kontrol grubu arasında fark bulunamamıştır. [36] Ancak daha sonra yapılan çalışmalarda ortaya çıkan sonuçlar amino-3-hidroksi-5-metilisoksazol-4 propionik asit (AMPA) ve N-metil D-aspartat (NDMA) reseptörlerinin depresyon ve antidepresanlar üzerinde etkili olduğunu göstermiştir. [37, 38, 39]

#### **2.4.9 Nörofizyolojik çalışmalar**

Depresyonlu hastaların nörofizyolojik çalışmalarında birtakım değişiklikler tespit edilmiştir. EEG ve biyoriitm bulgularında; alfa dominansı ve fokal temporal lob anomaliliği, kortizol ve melatonin salgılanmasındaki bozukluğun bedendeki uyku uyanıklık döngüsünü etkileyerek uyku fazında değişikliğe neden olduğu gösterilmiştir. Depresyonlu hastalarda elektrodermal aktivitede azalma tespit edilmiştir. Evoked potansiyel çalışmaları depresyonlu ve sağlıklı hastalar arasında çeşitli uyaranlara kardiyak cevapla, cevap süresinde farklılıklar olduğunu göstermiştir. [40]

#### **2.4.10 Nöroendokrinolojik çalışmalar**

Psikiyatrik bozukluklar ile endokrin sistemler arasında kurulan karşılıklı ilişki sonucunda ortaya çıkan anormallik diğerini etkilemekte ve hastalığın fizyopatolojisini ve prognozunu anlamakta yardımcı olabilmektedir. Nörotransmitterler tarafından kontrol edilen nöroendokrin sistemlerdeki bozukluk depresyon gelişiminde rolü olan nörotransmitter değişikliklerini anlamamızda yardımcı olabilir. Adrenal, tiroid ve büyüme hormonu depresyonla ilişkili olarak ortaya atılmış nöroendokrin anormallikleridir. [41]

#### **2.4.11 Hipotalamo-pitüiter-adrenal eksen**

Hipotalamo-Pitüiter-Adrenal (HPA) ekseninin işlevindeki değişikliklerin duygudurum bozuklukları ile ilişkili olabileceği ve tespit edilmesinin hastalığın seyrini belirlemek için önemli olabileceği öne sürülmüştür. [42] Bu eksen alanında yapılmış çalışmalara bakıldığında kortikotropin salgılatıcı hormona (CRH) karşı adrenokortikotrofik hormon cevabının düştüğü, CRH düzeyinin daha çok arttığı ve sonuçta kortizol miktarında artış gözlemlenmiştir. [43]

#### **2.4.12 Hipotalamo-pitüiter-tiroid eksen**

HPT hipotalamustaki tirotropin salma hormonu salgılayan nöronal hücrelerden başlar ve tiroidal follüküler hücrelerinde son bulur. Tirotropin salgılayan hormon (TRH) üreten nöronların gövdeleri hipotalamusun dorsomedial çekirdeklerinde ve etrafında mevcuttur, bunların nöron uçları ise medial eminensin dış kısmının iç kısmında son bulur. [44]

Son olarak; literatür çalışmaları incelendiğinde TRH karşı verilen tiroid stimulan hormon cevabının düştüğü görülmüştür. Ayrıca kronik depresyonda daha çok küçük dereceli hipotiroidizm oranı yüksektir. [45]

#### **2.4.13 Hipotalamo-pitüiter-growth hormon eksen**

Büyüme hormonu (BH) hipoglisemi, amfetamin, L-dopa ve klonidin gibi hormonların depresyondaki yanıtları düşüktür. Fakat, büyüme hormonu büyük olasılıkla GHRH ile somatostatinden sorumlu olan norepinefrin, serotonin, dopamin, asetilkolin ile  $\mu$ -aminobütirik asid gibi pek çok nörotransmitterin etkisindedir. Diğer yandan IGF-1'in inhibitör etkisi dikkate alınmadığı için sonuçları yorumlamak kolay olmadığı diğer çalışmalarda gösterilmiştir. [46]

BH sekresyonu majör depresyonda 24 saatlik periyotlarda arttığı bilinmektedir. Bu artışın nedeni uyku zamanındaki olumsuz yönde değişiminin yol açtığı uykudaki salgılanmanın da azalmasına rağmen gündüz salgılanmasının yükselmesiyle meydana gelir. BH seviyesindeki yükselme her ne kadar depresyona bağlı hiperkortizolizmle ilgili olsa da hipofiz merkezleriyle ilişkilidir. [47]

#### **2.4.14 Nöroanatomik çalışmalar**

Limbik sistemin önemli bir bölümü olan hipokampus'un, bilişsel işlevlerde bozulmaya neden olduğu ve depresyon oluşumuna zemin hazırladığı yapılan çalışmalar sonucunda gösterilmiştir. [48] Depresyon gelişiminde önemli role sahip bir diğer alan ise prefrontal kortekstir. Özellikle medial prefrontal korteksin duygudurum değişimleriyle ilişkili olduğu bilinmektedir. Bu yerin striatum, globus pallidus ve substantia nigra, mediodorsal talamus ile olan bağlantıları ana döngüyü oluşturmaktadır. Bu alanlarla ilişkili diğer bölgeler de duygudurum düzenlemesine katılmaktadır. Bu bölgelerdeki anormallikler, depresyon gelişimine neden olabilmektedir. Yoğun olarak serotonerjik sinir lifleriyle inerve edilen anterior singulat bölge, talamus ve bazal gangliyon aktivitesinde azalma gözlenen çalışmalarda üzüntü, irritabilite, endişe, bilişsel katılık, olumsuz düşünce örüntüsü gibi belirtilerin yoğunlaştığı ve bunların sıklıkla serotonerjik antidepresanlara yanıt verdiği bildirilmektedir. [49]

#### **2.4.15 Nöroplastisite**

Nöroplastisite birçok önemli işlevin yürütülmesine yardımcı olur. Yetersizliği depresyon gibi psikiyatrik hastalıkların ortaya çıkmasına neden olabilir. Beyinde içten ve dıştan gelen uyarıların algılanmasında, nöron ve bağlantılarının işlevselliğinde ayrıca yapısallığın ortaya çıkmasından sorumludur.

Tedaviye dirençli ağır depresyon vakalarında antidepresan kullanımına rağmen yanıtın gecikmesi veya alınamaması, kimyasal ileticilerin rolünün depresyon etiyolojisini açıklamadaki yeterliliğinin sorgulanmasına neden olmuştur. [7] Antidepresan tedavisinin nöroplastisite ile ilgili sinyal iletim sistemi ve gen ekspresyonu üzerindeki etkileri yapılan çalışmalarla gösterilmiştir. [50] Nöroplastisitenin gerçekleşmesinde rol oynayan sinyal ileti yolları ve genetik transkripsiyon üzerinde etkili olabilecek ilaçların depresyonda iyileşmeyi sağlayabileceği düşünülmektedir. Serotonin yeni nöron ve sinaps oluşumu ve hücre ölümü üzerinde direkt olmayan etkileriyle trofik cevapları desteklediği gösterilmektedir. [51] Antidepresanlar ve atipik antipsikotiklerin limbik sistemde glial hücre çoğalmasını uyardıkları ve lityumun nörotrofik faktörlerinin yeni sinaps oluşumunu arttırdığını bildiren çalışmalar mevcuttur. [52]

#### **2.1.4. Depresyonla ilgili psikolojik kuramlar**

Depresyonla ilgi psikolojik kuramlarda ortak bir görüşü yoktur. Her kuramın depresyonla ilgili farklı görüşü vardır. Depresyonla ilgili psikolojik kuramlar psikanalitik kuram, bilişsel kuram ve davranışsal kuram olmak üzere üç grupta ele alınabilir.

##### **2.1.4.1 Psikanalitik kuram**

Depresyon dinamikleri konusunda en kapsamlı psikanalitik araştırmalar Carl Abraham tarafından yapılmıştır. Psikanalitik kurama göre depresyonda bir sevgi nesnesinin kaybına karşı geliştirilen bir tepki söz konusudur. Yaşamın ilk yıllarından itibaren özellikle oral dönemde saplanma, çözülmemiş çatışmalar, sevilen bir nesneye karşı bağımlılık duyguları, kişilerarası ilişkilerden kaynaklanan düş kırıklıkları, erişkinlik döneminde de gerçek kayıplar ya da kayıp tehditleriyle karşılaşma kişide depresyonu tetikler. Yaşanılan bu durumlar, kişinin benliğinde boşluk, terk edilmişlik duygularıyla, öz değerinin azalmasına neden olur. [53] Gerçek bir kaybı yaşadıklarında da yitirdikleri nesneyi içselleştirirler ve öfkelerini içselleştirdikleri nesneye, dolayısıyla kendilerine yöneltirler. Kişi içe alma ile, kaybedilen nesneyle özdeşim kurar. Bu, kaybın travmasına ve onun ruhsal sonuçlarına karşı bir savunmadır.

Psikanalitik kuramda depresyona giren kişi düşmanca duygularını bastırmayı öğrenmiş kişilerdir. Freud depresyonu, kaybedilen nesnenin içe alınmasıyla, ona duyulan sevginin yanında bilinçdışı nefret, öfke gibi olumsuz duyguların varlığı, nesne ile yapılan özdeşim nedeniyle öfke ve düş kırıklıklarının kendisine yöneltilmesiyle açıklamaktadır. [54] Rado kişinin benlik saygısının aşırı olması sonucu, kendi dışındaki kişilerden beklenen istekleri gerçekleşmediğinde hayal kırıklığı sonucu kayıp nesnenin sevgisini yeniden kazanmak için amaçlı, dürtüsel tavırların ortaya çıkmasıyla depresyonda süperegonun rolüne dikkat çekmiştir. [55] Klein, depresif hastaların kendi hırsları yüzünden sevdikleri içsel objelerinin "kötü" içsel objeler tarafından kendilerine kötülük edileceğini hissetmekte olduğunu ve çatışmanın çözülmemesi durumunda bireyin ileride depresyona yatkın hale gelebileceğini söylemiştir. [56] Bibring' e göre, benliğin, uyumlu ve değerli

olabilmesi, benlik öz saygısının korunabilmesine bağlıdır. Benlik saygısını düşüren herhangi bir narsisistik zedelenme klinik bir depresyonun tetiklenmesidir. [57]

#### **2.1.4.2 Bilişsel kuram**

A.T. Beck depresyonun bilişsel bir bozukluk olduğunu duygudurum bozukluğunun bilişsel bozukluğa sekonder geliştiğini ve tedavisinde en etkin yaklaşımın bilişsel kuram olduğunu kapsamlı tedavi deneyimlerinden yola çıkarak ortaya koymuştur. [58] Bireyler, bir durumu, kendileri için önemli olan ilgi alanlarına karşı bir tehdit olarak algıladıklarında psikolojik sıkıntı yaşarlar. Depresyona yatkın bireyde ilk dönemlerden başlayarak, kendi benliğine, geleceğine ve dış dünyaya karşı olumsuz şemalar bulunmaktadır. Olumsuz şemalar bir yaşam olayı ardından giderek olumsuz yargılara, düşüncelere ve tutumlara neden olur olayları algılamaları ve yorumlamaları oldukça seçici, ben merkezci ve katıdır. Bu da normal bilişsel aktivitenin işleyişinin bozulmasıyla sonuçlanır. Kendine özgü düşünmeyi bırakma, konsantre olma, anımsama ve sonuç çıkarma konusunda azalmış bir beceri vardır. [59, 60]

Depresyondaki kişiler, düşünürken de olumsuz benlik şemalarına katkıda bulunacak tarzda gerçekliğin yanlış anlaşılmasına yol açan ve bilişsel bozukluklar olarak nitelendirilebilecek bazı sistematik hatalar yaparlar. Bu bilişsel hataları ‘keyfi çıkarsama, seçici soyutlama, aşırı genelleme, büyütme ve küçültme, kişiselleştirme, iki değerli düşünme şeklinde sıralayabiliriz. [58]

#### **2.1.4.3 Davranışçı kuram**

Seligman’ın öğrenilmiş çaresizlik görüşünü destekler. Öğrenilmiş çaresizlik kavramı, bir organizmanın davranışlarıyla olumsuz olayları kontrol edemediği bir durumu yaşanılmadıktan sonra olumsuz olayları kontrol edebileceği durumlarda gerekli davranışları yapmakta başarısız kalarak, bundan sonra yapacaklarının bir işe yaramayacağını düşünerek artık hiçbir şey yapmamasıdır. Öğrenilmiş çaresizlik görüşü özellikle reaktif depresyonların açıklanmasında önemlidir. [43]

Davranışçılar pekiştirme davranışının depresyonda önemli bir rol oynadığını öne sürmektedirler. Depresif kişinin üzüntü duygularının, olumlu pekiştirme oranının düşük veya istenmeyen deneyimlerin oranının yüksek olmasından ötürü olduğu iddia

edilmektedir. Ayrıca, depresyona giren kişi olumlu pekiştirme sağlamak veya olumsuz olaylarla etkin bir biçimde basa çıkmak için gerekli olan sosyal beceriden de mahrum olabilmektedir. [61]

### **2.1.5 Depresyonun klinik tanısı**

Aynı iki haftalık dönem boyunca, aşağıdaki belirtilerden beşi (ya da daha çoğu) bulunmuştur ve önceki işlevsellik düzeyinde bir değişiklik olmuştur; bu belirtilerden en az biri ya da çökkün duygudurum ya da ilgisini yitirme ya da zevk almamadır.

1. Çökkün duygudurum, neredeyse her gün, günün büyük bir bölümünde bulunur ve bu durumu ya kişinin kendisi bildirir ya da bu durum başkalarınca gözlenir
2. Bütün ya da neredeyse bütün etkinliklere karşı ilgide belirgin azalma ya da bunlardan zevk almama durumu, neredeyse her gün, günün büyük bir bölümünde bulunur
3. Kilo vermeye çalışmıyorken kilo alma ya da neredeyse her gün, yeme isteğinde azalma ya da artma
4. Neredeyse her gün, uykusuzluk çekme ya da aşırı uyuma
5. Neredeyse her gün, psikodevinsel kışkırtma (ajitasyon) ya da yavaşlama
6. Neredeyse her gün, bitkinlik ya da içsel gücün kalmaması
7. Neredeyse her gün, değersizlik ya da aşırı ya da uygunsuz suçluluk duyguları
8. Neredeyse her gün, düşünmekte ya da odaklanmakta güçlük çekme ya da kararsızlık yaşama
9. Yineleyici ölüm düşünceleri, özel eylem tasarlamaksızın yineleyici kendini öldürme düşünceleri ya da kendini öldürme girişimi ya da kendini öldürmek üzere özel bir eylem tasarlama

Bu belirtiler klinik açıdan belirgin bir sıkıntıya ya da toplumsal, işle ilgili alanlarda ya da önemli diğer işlevsellik alanlarında işlevsellikte düşmeye neden olur. Bu dönem, bir maddenin ya da başka bir sağlık durumunun fizyolojiyle ilgili etkilerine bağlanamaz. [12]

### **2.1.6 Depresyonun tedavisi**

Depresyonun tedavisi için öncelikle hastanın öyküsünün dikkatli bir şekilde alınması gereklidir. Öykü alınırken depresyon belirtileri, yol açtığı işlevsel sorunlar, yakın

dönem yaşam olayları, tetikleyici ve altta yatan etkenler, erken yaşlardaki olumsuz olaylar ve destekleyici aile ortamının olup olmadığı bilinmesi gerekir. Hafif şiddette ki depresyon için psikoterapi majör stresin ortadan kalkmasıyla tek başına yeterli olabilir. Tanı düzeyinde depresyonu olan bir olguda farmakoterapi birincil tedavi yöntemidir. Akut dönem belirtileri düzelen veya tanı düzeyinde olmayan depresif belirtilerde hastaya göre sorun alanları belirlendikten sonra psikoterapi yöntemleri uygulanabilir. Son dönemde bu alanda gerçekleştirilen araştırmalar özellikle bilişsel davranışçı terapi uygulamasının konuşma terapileri içinde en etkili tedavi yöntemi olduğunu gösteriyor. [62]

## **2.2 Deneysel Depresyon Hayvan Modelleri**

İnsanda yürütülmesi güç olan birçok çalışmada kullanılan hayvan modelleri, yeni tedavi araçlarının belirlenmesi açısından önemli bir yere sahiptir. Depresyon nörobiyolojisinde ve kullanılan antidepresanların etki mekanizmaları alanında birçok araştırma yapılmasına rağmen tedaviye yanıtın gecikmesi istenmeyen yan etkilerin oluşumu, tedaviye yüksek oranda yanıtın alınamaması veya gecikmesi deneysel hayvan modellerinin geliştirilmesine ön ayak olmuştur. Yaklaşık otuz beş yıl önce McKinney ve Bunney hayvanlarda depresyonun modelinin karşılaması gereken ölçütleri şu şekilde sıralamıştır;

- İnsanda görülen bozukluğa görünüm ya da tekil belirtiler açısından benzemelidir.
- Nesnel olarak değerlendirilip gözlenebilecek davranışlar olmalıdır.
- İnsanlarda etkili olan müdahalelerle davranışsal değişiklikler geri döndürülebilir olmalıdır.
- Model farklı araştırmacılar tarafından tekrarlanabilmelidir. [63]

### **2.2.1 Rezerpin etkisi**

Deney hayvanları üzerinde geliştirilen rezerpin, tetrabenazin uygulanımıyla monoamin tüketiminin fizyolojik ve davranışsal etkilerinin incelenmesi en eski depresyon modelidir. [64] Monoaminlerin presinaptik depolarını boşaltan rezerpin ve benzeri ilaçlar uygulandığında, pitoz, hipotermi ve katalepsi meydana gelir. Nöroleptiklerin farmakolojik etkinliklerinin ilk bulguları trisiklik antidepresan ve monoamin oksidaz inhibitörlerinin önceden uygulanması durumunda pitoz ve hipotermi görülmemesidir. [65] Rezerpinin etkisinin ve buna bağlı gelişen

katatoninin kişide depresyona yola açtığı ve antidepresan tedavisiyle düzeldiği bulgusu ilk başlarda modele olan bakış açısını güçlendirdiyse de sonraki çalışmalarda desteklenmemiştir. [66]

### **2.2.2 Psikostimulan yoksunluğu**

Kafaiçi kendini uyarım (intracranial self stimulation) depresyon ve şizofrenideki negatif belirtilerde görülen anhedoninin hayvanlarda oluşturulmaya çalışılan modelidir. [67] Bu modelde beynin belirli bölgelerine kısa elektrik uyarıları verilir. Kontrolü hayvanda olan uygulamayla belirli miktarda pekiştirecin verilerek maksimum çabaya ulaşması sağlanarak kırılma noktası belirlenir ve kırılma noktası nesnel olarak ölçülebilir değişken olarak kabul edilir. Pekiştirici gücünün fazla olduğu hayvanın uyarımı tekrarlamak için çaba göstermesinden anlaşılır. Uyarım için gerekli davranışı gösterme sıklığı ve uyarıma ulaşmak için sarf edilecek en yüksek çaba eşiği, uyarının ödül değerini ölçmekte kullanılır. Eşiğin azalması uyarımın haz olarak karşılığında artış anlamına gelirken, eşiğin artması uyarımın haz olarak değerinde azalma, anhedoni olarak yorumlanır. Yoksunlukla hayvanlarda hazla ilgili meydana gelen değişiklikler, antidepresan tedavilerle kaybolmaktadır. [68] Prosedürün karmaşıklığı nedeniyle uygulaması zordur.

### **2.2.3 Öğrenilmiş çaresizlik**

İlk olarak Seligman ve ark. tarafından ilk olarak köpeklerde geliştirilmiş daha sonra fare, sıçan, balık, kedi gibi birçok hayvan türünde denenmiştir. [69] Deneklerin kaçma imkanı olmayan iki bölmeli düzeneğe yerleştirilerek tekrarlayan şekilde şoka maruz bırakılma modeli depresyondaki öğrenilmiş çaresizliğin hayvanlardaki uygulanma şeklidir. İki bölmenin bir tarafında denek şoka maruz bırakılırken diğer bölmede ışık ya da ses uyarısının tekrarlanmasıyla elektrik şokunu sona erdirecek bir pedal bulunmaktadır. Şok üzerinde kontrolü olan grup uyarının tekrarlanan uygulamasıyla pedala basarak kendisine acı veren durumdan kurtulmayı öğrenir. Şok üzerinde kontrolü olmayan grup ise diğer denemelerde şoku engelleyebilecekleri denemelerde, kontrolü olan gruba göre daha pasif kaldıkları görülmüştür. Maruz kaldıkları stres karşısında deneklerin hareketlerinde yavaşlama, yeme ve keyif verici davranışlarında azalma, kilo kaybı, azalmış cinsel davranış gibi değişiklikler görülmüştür. [70, 71]

#### **2.2.4 Kronik hafif stres modeli**

Deneklerde çeşitli ve hafif stress oluşturulmak için bulundukları kafesten alınıp farklı kafese konması, yemek ve sudan mahrum bırakılması, sürekli aydınlık ortamda bekletilmesi, kafesin zeminin ıslak tutulması, gece gündüz döngüsünün bozulması ve kafesin pozisyonun sürekli değiştirilmesi gibi işlemlerin dönüşümlü olarak haftalarca veya aylarca uygulanmasıdır. [72] Denekler doğal şiddette stresörlere maruz bırakıldığı için geçerliliği diğer testlere göre yüksektir. Bu modelin dezavantajı farklı laboratuvarlarda farklı protokollerle uygulanmasına rağmen güvenilirliğinin düşük olmasıdır.

#### **2.2.5 Sosyal stres**

Hayvanlar arasındaki sosyal ilişkinin neden olduğu stres modelidir. Hayvanların sosyal statüsü ile davranışları arasındaki ilişkiyi gösteren bir çalışmada düşük sosyal statüdeki hayvanlar yüksek statüdeki hayvanlara göre süregelen stres belirtileri göstermişlerdir. [73] Bu modelde deneğin tekrarlayan şekilde baskın ve saldırgan başka bir denekle karşı kaşıya bırakılması, bazen fiziksel hasara izin verilmesi, sıklıkla görsel stresin devamlılığının sağlandığı düzeneklerin kullanılması gibi çeşitli müdahaleler yapılmaktadır. Bazen deneklerin kalabalık kafeslerde tutulması, bazen de izole edilmeleri sosyal stres olarak kullanılabilir. Bu modelde nesnel ölçümler yapmak, müdahalelerin tekrarlanması operasyonel olarak tanımlanması açısından mümkün değildir ve zorluk yaratmaktadır [71].

#### **2.2.6 Olfaktör bulbektomi**

Sıçanlarda depresyon gelişimi temel duyu modalitesi olan kokunun yoksunluğunda ortaya çıkabileceği öne sürülmüştür. Sıçan ve farelerin olfaktör bulbuslarının bilateral alınmasıyla çoğu depresyonda görülen davranışsal, nöroanatomi, nörokimyasal, nöroendokrin, nöroimmunolojik değişiklikler görülmesi nedeniyle deneysel depresyon modeli olarak kullanılabileceğini söylemişlerdir. [74, 75] Klasik olarak değerlendirilen davranış, açık alan testinde artmış hareketlilik. Bu değişiklikler akut antidepresan tedavisine yanıt vermez. Ancak yapısal ve etiyolojik geçerliliği tartışmalı olmasına rağmen güvenilirliği ve öngörücü geçerliliği açısından yüksek bir model olduğu düşünülmektedir. [66]

### 2.2.7 Kuyruktan asma testi

Steru ve ark. (1985) tarafından geliştirilen testtir. Deney hayvanlarının kuyruklarından havaya asılarak gerçekleştirilen davranışsal umutsuzluk modelidir. Bu testte hayvanın hareketsiz kalıncaya dek geçirdiği süre ölçülmektedir. [76] Bu modelin sıçanlarda kullanılması önerilmez. Hızlı uygulanabilirliği ve öngörücü geçerliliğinin yüksek olması bu testin ilaç geliştirme çalışmalarında sık kullanılmasını sağlamıştır. [65]

### 2.2.8 Zorunlu yüzme testi

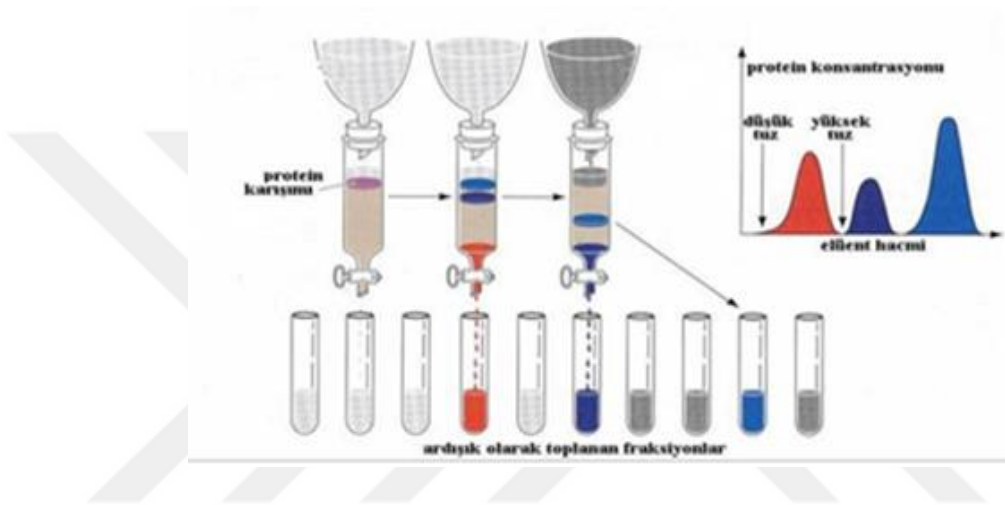
Porsolt ve ark. (1978) tarafından geliştirilmiştir. ‘Porsolt yüzme testi’ veya ‘umutsuzluk- despair’ olarak adlandırılmaktadır. İlk olarak sıçanlarda kullanılmış sonra fareler üzerine adapte edilmiştir. Zorunlu yüzme testi; Morris’in su tankı çalışmasında sıçanların tank içerisindeki platformu bulamayıp hareketsiz kaldıkları gözleminden yola çıkılarak geliştirilmiştir. [77] Kolay uygulanabilirliği, sonuçların laboratuvarlar arasında tutarlılık göstermesi, deney hayvanında gözlenen immobilité halinin, oluşturulan depresif durumun direkt belirtisi olması depresyon modeli geliştirmede kullanılan en yaygın testtir. [78, 79] Depresyon modellerinin detaylı karşılaştırılması ve kullanım oranlarının özelliğine göre sıralanması Tablo 2.1’de gösterilmiştir.

**Tablo 2.1 : Depresyon modellerinin karşılaştırılması [80]**

| Hayvan Modeli         | Güvenirliliği | Öngörücü Geçerliliği | Yapısal Geçerliliği | Uygulama Kolaylığı |
|-----------------------|---------------|----------------------|---------------------|--------------------|
| Rezerpin Etkisi       | Orta          | Orta                 | Düşük               | Yüksek             |
| Psikostimulan         | Düşük         | Orta                 | Orta                | Düşük              |
| Öğrenilmiş Çaresizlik | Orta          | Yüksek               | Orta                | Orta               |
| Kronik Hafif Stres    | Düşük         | Yüksek               | Yüksek              | Düşük              |
| Sosyal Stres          | ?             | ?                    | Yüksek              | Düşük              |
| Olfaktör Bulbektomi   | Yüksek        | Yüksek               | Düşük               | Orta               |
| Kuyruktan Asma Testi  | Yüksek        | Yüksek               | Orta                | Yüksek             |
| Zorunlu Yüzme Testi   | Yüksek        | Yüksek               | Orta                | Yüksek             |

## 2.3 Protein Saflaştırma Yöntemleri

Hücre ya da dokudan istenilen belli bir proteini saflaştırmak zor bir olaydır. Özellikle konsantrasyonu düşük olan proteinlerin diğer binlerce protein arasındaki ayırmak ve saf bir hale getirmek için farklı saflaştırma tekniklerini bir arada kullanmak gerekmektedir. Şekil 2.1’de de gösterildiği gibi proteinler çeşitli kolonlar ve ayıraçlar kullanılarak ayrılmaktadır. Günümüzde birçok protein saf halde elde edilebilmiştir. [81]



Şekil 2.1 : Protein saflaştırma şablonu [82]

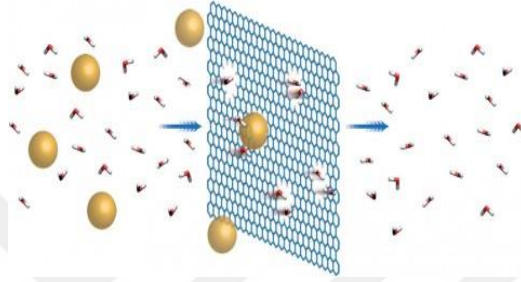
Saflaştırma işlemine başlamadan önce öncelikle proteinin en çok bulunduğu hücre ya da doku grubu seçilmelidir. Daha sonra proteinin karakterine bağlı olarak bulunabildiği tampon ortamı sağlanmalı ve homojenizasyon yapılmalıdır. Bu aşamadan sonra gerekirse birden fazla saflaştırma tekniğiyle protein saf olarak elde edilir. [83-84]

### 2.3.1 Diyaliz ve ultrafiltrasyon

Temel olarak proteinleri daha küçük olan diğer moleküllerden ayırmak için kullanılan bir tekniktir. Sahip olduğu porlar sayesinde geçirgenliği sağlayan bir membran içine konulan protein çözeltisi konsantrasyon farkı ile içerdiği küçük moleküllerin membran dışarı çıkması sağlanır. [85, 86]

Glikoz ve NaCl gibi küçük moleküller membrandan geçerken büyük protein molekülleri diyaliz porlarından geçemediği için içerde kalır. Şekil 2.2’de de

görüldüğü üzere ortam suyunun birkaç kez değiştirilmesi ile küçük moleküllerin protein çözeltisi içerisinde uzaklaştırılması mümkün hale gelmektedir. Ultrafiltrasyon yöntemi de diyaliz tekniğine göre çalışır. Aradaki fark, diyaliz tüpünden küçük moleküllerin çıkması için hidrostatik basınç veya santrifüj gibi transmembran kuvvetlerinin etkisiyle proteinleri molekül büyüklüklerine göre diyalize göre daha hızlı ve daha yüksek verimlilikte ayrılmasını sağlar. Bu basınç sayesinde küçük moleküllerle birlikte bir miktar sıvı kaybedildiği için protein daha konsantre bir şekilde elde edilir. [87, 88]



**Şekil 2.2 : Diyaliz ve membran filtrasyon tekniği [82]**

### **2.3.2 Santrifügasyon yöntemleri**

Santrifügasyon bir solüsyon içerisindeki partiküllerin sahip oldukları büyüklük, form ve dansitelerine, medyumun viskozitesi ve rotorun hızına uygun olarak ayrılması tekniğidir. Süspanse durumda olan partiküller ya birbirlerinden ya da içinde bulundukları çözücüden ayrılırlar. [89]

Her bir komponentin sedimentasyon hızı parçacıkların yoğunluğuna (dansite= $d$ ), sıvının yoğunluğuna ( $d$  sıvı) parçacık formuna, büyüklüğüne ve sıvının viskozitesine bağlı olarak değişir. Partiküllerin sedimentasyon kinetiği kendi dansiteleri ile sıvı medyumun dansitesi arasındaki farkla doğru orantılıdır. Partiküllerin ve medyumun dansitesi birbirine eşit ise sedimentasyon kinetiği 0 dır. Sıvı medyumun dansitesi yüksek ise sedimentasyon kinetiği ters orantılı olarak düşüktür. Santrifüj hızı yükselttilirse partiküllerin sedimentasyon kinetiği artar. [90]

#### **2.3.2.1 Densite zonal santrifügasyon**

Bir protein karışımını santrifügasyon yöntemi ile ayırmak için tüp içerisinde sükröz gibi bileşiklerle bir konsantrasyon gradienti yaratılır. Bunun için plastik tüp içerisinde en yoğunundan en az yoğununa doğru bir sükröz gradienti meydana

getirildikten sonra tüpün en üzerine protein karışımı ilave edilir. Bu Şekilde hazırlanmış olan t p yüksek devirde santrifüj edilecek olursa her bir protein kendi dansitesi ile aynı olan sukroz bölgesine toplanacaktır. T p içerisinde farklı bantlar halinde ayrılmış olan proteinler daha sonra tüpün altı i ne ile delinip toplanarak veya t p dondurulduktan sonra bu bantlar buz halinde kesilerek çözüdürülür ve bu Şekilde proteinler birbirlerinden ayrılmış olur. [91, 92]

### **2.3.2.2 Differansiyel santrifügasyon**

Differansiyel santrifügasyon ile bir karışımında bulunan partiküller boyutlarındaki farklılıklara bağlı olarak ayrılmaktadır. Homojenat relatif santrif gal kuvvet (RCF) arttırıldıkça fraksiyonlarına ayrılmaktadır. [93, 94]

### **2.3.3 Kromatografik yöntemler**

Kromatografi, bir karışımın bileŐenlerini, bunlara seçimsel ilgi gösteren iki ya da daha çok evreden sistemler arasında farklı g   lerine bakarak tanımak, gerektiğinde niceliklerini belirlemek amacıyla yapılan ve ayırma işlemine dayanan analitik yöntemdir.

Kromatografi terimi başlangıçta, örneğin bitkisel pigmentlerde olduğu gibi cisimleri renklerine göre ayırma oluşmuş işleminden kaynaklandı, ama zamanla uygulama alanı oldukça genişledi. Kromatografi günümüzde son derece duyarlı ve etkin bir ayırma yöntemi olarak kabul edilmektedir. Duruma göre iki temel mekanizma uygulanır; [82, 95]

- Bileşikler ya iki sıvı evre arasında paylaşılır (bu durumda dağılım ya da paylaşım kromatografisinden söz edilir)
- Hareket halindeki bileşikler durağan katı bir evre yüzeyine ba lanır (ba lar y zeyssel ve fiziksel bir nitelik ta ıdık ında yüzde tutma kromatografisinden (tersinir ba , bileŐiğin bütünlüğünün korunması), buna karşılık hareketli ve yüzde tutulan bileşikler arasında gerçek kimyasal ba lar olu tu unda iyon değişimi kromatografisinden söz edilir.

Kimyasal ve fiziksel özellikleri birbirine çok yakın olan bileŐiklerden oluşan kar ışımaları damıtma ve ayırmsal kristallendirme ile birbirinden ayırmak zor olabilir.

Bu tür maddeler için çeşitli kromatografi yöntemleri kullanılarak başarılı ayrımlar yapılabilir.

Kromatografi, bir karışımın gözenekli bir ortamda, hareketli bir çözücü etkisiyle, karışım bileşenlerinin farklı hareketleri sonucu birbirinden ayrılması olgusuna dayanır. Hareket eden faza hareketli faz, bahsedilen gözenekli ortama ise adsorban veya sabit faz denir. Kromatografi olayında adsorpsiyon, dağılma ve değiştirme kuvvetleri rol oynar. Bu kuvvetlere göre de farklı kromatografik yöntemler farklı gruplarda toplanırlar.

### **2.3.3.1 Jel filtrasyonu**

Jel filtrasyonu proteinlerin molekül ağırlıklarına göre ayrılmasını sağlar. Bu yöntemde proteinlerin birbirinden ayrılması, sabit fazdaki jelin oluşturduğu porların çapına göre moleküllerin belirli derecede engellenmesine dayanır. Sabit faz olarak kullanılan sefadeks, biojel, agaroz gibi dolgu maddeleri kolona doldurulduktan sonra uygun bir tampon ile yıkanır ve kararlı hale geçirilir daha sonra protein çözeltisi tampon ile birlikte kolonun üzerinden yavaş yavaş ilave edilir.

Yer çekimine göre aşağı doğru hareket eden protein çözeltisi içerisinde bulunan küçük protein molekülleri kolon doğu maddesinin küçük oyuklarına girerken, büyük proteinler bu oyuklara hiç girmeden kolondan ilk çıkan moleküller halinde ayrılırlar. [96-97]

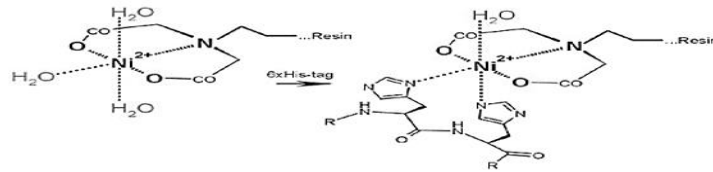
### **2.3.3.2 İyon değiştirici kromatografisi**

Proteinleri asit ve baz özelliklerine göre ayırmak için kullanılan bir yöntemdir. Bu yöntemde kolon içine pH= 7 de pozitif yük taşıyan bir selüloz türevi olan DEAE-selüloz (dietil aminoetil selüloz) konur. Bu bileşiğe negatif yük taşıyan proteinler bağlanırken diğer proteinler kolondan çıkar. Kolonun içerisine konan diğer bir bileşik ise pH= 7 de negatif yük taşıyan CM-selüloz ( karboksimetil selüloz ) dur. Bu bileşiğe de pozitif yük taşıyan proteinler bağlanır. Diğer proteinler ise kolon dolgu maddesine bağlanmadan kolondan çıkar. Daha sonra kullanılan tamponların iyonik kuvveti değiştirilerek kolon materyaline geçici olarak bağlanmış olan bu proteinler kolonun dolgu maddesinden ayrılarak kolondan çıkmaya başlarlar. Fraksiyon toplayıcısı ile küçük miktarlar halinde tüplerde toplanan proteinler asidik ya da bazik

özelliğine göre diğer proteinlerden ayrılmış olur. İyon değiştirici kromatografi aynı zamanda aminoasitlerin ve peptitlerin de birbirinden ayrılmasını sağlar. Bu tip kromatografi özellikle molekül ağırlıkları birbirine çok yakın olan molekülleri ayırmak için kullanılmaktadır. [87, 98]

### 2.3.3.3 Affinite kromatografisi

Çok kompleks bir karışım içinde bulunan bazı proteinler affinite kromatografisi sayesinde tek basamakta oldukça saf halde elde edilirler. Affinite kromatografisi için polisakkarit yapısındaki agaroz taneciklerine kimyasal bir reaksiyon ile bir enzimin koenzimi bağlanır. Üzerine koenzim bağlanmış olan agaroz tanecikleri kolon dolgu maddesi olarak kullanılır. Protein karışımı bu kolona uygulandığı zaman yalnız ilgilendiğimiz enzim proteinleri koenzimin serbest ucuna spesifik olarak bağlanmaktadır. Bu bağlanma kovalent bir bağlanma değildir. Diğer proteinler koenzimin serbest ucuna bağlanma özelliğine sahip olmadıkları için kolondan ayrılırlar. Daha sonra serbest koenzim içeren çözelti kolona ilave edildiğinde, agaroz taneciklerine bağlı koenzime bağlanmış olan enzim molekülleri bu defa rekabetten dolayı çözelti ile birlikte gelen serbest koenzime bağlanarak kolondan çıkar. Böylece koenzime spesifik olarak enzim proteini diğer yüzlerce proteinden affinite kromatografisi ile tek basamakta saflaştırılmış olmaktadır. [99-100]



Şekil 2.3 : Histidin ve Ni-NTA birleşimini [82]

Ni-NTA spin kolon kromatografi tekniği kullanılarak 6-histidinli uç taşıyan rekombinant proteinlerle doğal veya denatüre şartlar altında çalışılabilir. İnklüzyon cisimciklerindeki birçok protein deterjanlar, denatüre edici ajanlar (8M üre, 6M GuHCl gibi), diyaliz, ısı, pH gibi gibi parametreler kullanılarak çözünür hale getirilebilirler. Ni-NTA affinite kromatografi tekniğinde rekombinant proteine bağlı 6-histidin molekülünden ikisi nikel-nitrilotriasetik asit molekülleriyle kaplı katı faza tutunurlar. Histidin moleküllerinin fazlalığı hem afiniteyi artırmakta hemde protein molekülünde olabilecek sayıca daha az olan histidin molekülleriyle yarışarak

kontaminant protein bağlanmasını önlemektedir. [97] Yüksek pH'da bağlanan rekombinant protein, yıkama ve elüsyon adımlarına doğru pH'sı giderek düşürülen tamponlarla veya artan imidazole konsantrasyonuyla, protein matriksi bırakarak elüe olur. Kontaminant proteinlerin bağlanmasını engellemek için gerekirse belirli miktarlarda imidazol tamponlara ilave edilebilir. Şekil 2.3'de histidin ve Ni-NTA birleşimi gösterilmektedir. Histidin analogu olan bu molekül sondaki yıkama adımları ile kolayca uzaklaştırılabilir.

### **2.3.4 Elektroforetik yöntemler**

Elektroforez, elektriksel bir alanda moleküllerin yüklerine, moleküler ağırlıklarına ve büyüklüklerine göre ayırt edildikleri bir tekniktir. Elektroforetik analizin temeli, moleküllerin elektriksel bir alanda jel üzerindeki göçüne dayanır. Bu göç hızı molekülün büyüklüğüne, yapısına, jeldeki kullanılan maddenin konsantrasyonuna, iyonik kuvvete ve uygulanan akıma bağlı olarak değişmektedir. [94, 101]

#### **2.3.4.1 Elektroforez**

Oluşturulan bir elektrik alanında protein parçalarının iyonik kuvvetle ayırma prensibine dayanmaktadır. Temelde bu yöntemde bir hareketli bir de sabit faz vardır. Hareketli olan faz için poliakrilamid, agaroz ya da selüloz gibi dolgu maddeleri kullanılmaktadır. Bu dolgu maddelerinin en önemli özelliği sahip olduğu porlar ile ayırım sağlamalarıdır. [95]

#### **2.3.4.2 İzoelektrik odaklama**

Elektroforetik yöntemlerden elektroforezden farklı olarak bu teknikten önce proteinlerin izoelektrik noktalarına göre ayırımı yapılmasıdır. Bu işlem için yüksek mobiliteye sahip olan sentetik asiterin karışımı olan bileşikler içeren jel kullanılarak proteinlerin pH gradienti içinde hareket etmeleri sağlanır daha sonra elektroforez ile bu proteinler ayrıca moleküler büyüklüklerine göre ayrılırlar. [ 97]

İzoelektrik odaklama, bir pH gradiyetinde yapılan elektroforezdir. Bunun için makromoleküller (+) ve (-) yüklere sahip oldukları müddetçe gradient boyunca izoelektrik noktalarına rastlayan pH'ya kadar göç ederler. İzoelektrik noktada net elektriksel yük sıfırdır. pH gradienti düşük molekül ağırlıklı amfoterik maddelerin (amfolitler) yardımıyla oluşturulur. Eğer elektroforezde kullanılan tampon sistemi

yerine anotta kuvvetli bir asit, katotta da kuvvetli bir baz kullanılır ve aradaki jel ortamına da gerektiği kadar amfolit solusyonu katılırsa amfolitlerin anoda yakın kısmında (+) katoda yakın kısımda (-) net yükleri olur. Bundan dolayı elektrik verildiğinde bunlar anot ve katot tarafına itilerek merkeze doğru hareket ederler. Bu hareketleri sırasında çevresel ortamın pH'sının kendi izoelektrik noktalarına eşit olduğu bölgelerde hareketsiz kalırlar. Bundan dolayı, en asidik amfolitler katoda yakın olacak şekilde izoelektrik noktalarına göre sıralanırlar. Bunun sonucu jel içinde anottan katoda doğru azalan bir pH gradienti oluşur. [102] Numune tatbik edilip yürütüldüğünde protein izoelektrik pH'sına geldiği anda net olarak yüksüzleşir. Hareket etmez ve o noktada odaklanır. [103]

Elektroforezde yürütme aşamasından sonraki işlemler de büyük titizlik gerektirir. Fiksator olarak alkol sıklıkla kullanılır. Serum protein boyamasında amido black (naftol blue black), bromofenol blue, brilliant blue G ve R, nigrosin, ponceau S kullanılabilir. İzoenzim boyamalarında nitrotetrazolyum blue kullanılırken, lipoproteinler için oil red veya sudan black gibi bir lipid boyası kullanılır. İzoelektrik odaklama serum ACP izoenzimlerinin ölçümünde yararlı olmuştur. Bu uygulama serebrospinal sıvıda oligoklonal immunglobulin bantları, CK izoenzimi ve serum ALP saptanmasına dek uzanmıştır. IEF'da kullanılan taşıyıcı amfolitler genellikle yüksek konsantrasyonlarda olduğundan yüksek voltajlı (2000 V'a kadar) bir güç kaynağı gereklidir. İşlem sırasında elektroforetik matriks soğuk tutulmalıdır. Poliakrilamid jel-izoelektrik odaklama (PAGE-IEF) analitik çalışmalarda yaygın olarak kullanılmaktadır. Poliakrilamid jel saydam ve esnek olmalıdır. Elektroendozmozü önleyen materyaller kullanılarak IEF yöntemi AGE ve CAE'e adapte edilebilir. AGEIEF ve CAE-IEF'in avantajları; uygulamanın daha basit oluşu ve por çapı büyük olduğu için MA'a göre seperasyon yapılmamasıdır. [96, 102]

IEF'da kullanılan taşıyıcı amfolitler genellikle yüksek konsantrasyonlarda olduğundan yüksek voltajlı (2000 V'a kadar) bir güç kaynağı gereklidir. İşlem sırasında elektroforetik ortam soğuk tutulmalıdır (jelin yapısı yüksek voltaj uygulandığından sıcaklık ile değişir. [96, 104, 105]

Bu yöntemin uygulaması kabaca şöyledir:

- Amfoterik elektrolitler içeren jelin (agaroz ya da poliakrilamid) hazırlanması,

- Jele elektrik alan uygulandığında elektrolitlerin bir pH eğilimi oluşturacak şekilde jelde hareketi,
- Protein çözeltisinin jele eklenmesi ve jelin tekrar elektrik alana maruz bırakılması,
- Ayrılmış proteinlerin görüntülenmesi için boyanması.



### 3. GEREÇ ve YÖNTEM

#### 3.1 Gereç

##### 3.1.1 Cihazlar

Bu tez kapsamında aşağıda listede verilen cihazlar kullanılmıştır. Cihazların marka ve modelleri Tablo 3.1’de detaylı olarak yazılmıştır.

**Tablo 3.1 : Cihazların marka ve modelleri**

| Cihaz                          | Marka            | Model                          |
|--------------------------------|------------------|--------------------------------|
| Derin Dondurucu                | Arçelik          | 2354 A+D                       |
| Dikey Jel Elektroforez Sistemi | Bio-rad          | Mini Protean Tetracell         |
| Isıtma Tablası                 | IKA              | C-MAG HS 7                     |
| Şırınga Filtreleri             | Santa Cruz       | UltraCruz® Syringe Filter, MCE |
| İnkübatörlü Çalkalayıcı        | Stuart           | SI500                          |
| Otoklav                        | Nüve             | OT 40L/90L                     |
| Jel Görüntüleme Sistemi        | Vilber Lourmat   | Fx 7                           |
| Spektrofotometre               | Shimadzu         | UV-1800                        |
| Yatay Jel Elektroforez Sistemi | Bio-Rad          | The Mini-Sub® cell GT          |
| Otomatik Pipetler              | Axygen           | Axygen Pipets                  |
| MALDI-TOF                      | Bruker microflex | LT MALDI-TOF MS                |
| Hassas Tartı                   | NHB              | NHB                            |
| pH Metre                       | Hanna            | Hanna                          |
| Isıtma Tablası                 | IKA              | C-MAG HS 7                     |
| Santrifüj                      | Hermle           | Z326R                          |

##### 3.1.2. Kimyasal ve sarf malzemeler

Çalışmada deney aşamasında çeşitli kimyasal ve sarf malzemeler kullanıldı. Marka ve isimler aşağıda belirtilmiştir.

|                               |            |
|-------------------------------|------------|
| Protein Ladder                | Thermo     |
| 2-Merkapto Ethanol            | Sigma      |
| β-Merkapto Etanol             | Sigma      |
| APS (Amonyum Peroksidisülfid) | Sigma      |
| Bromofenol Blue               | Santa Cruz |
| BSA (Bovine Serum Albumine)   | Santa Cruz |

|                                 |                |
|---------------------------------|----------------|
| D-Glukoz                        | AppliedBiochem |
| DMSO                            | AppliedBiochem |
| EDTA                            | AppliedBiochem |
| Glisin                          | Santa Cruz     |
| Commasie Brilliant Blue         | Santa Cruz     |
| Isopropanol                     | Sigma          |
| Gliserol                        | Sigma          |
| Commasie Brilliant Blue R-250   | Santa Cruz     |
| Commasie Brilliant Blue G-250   | Santa Cruz     |
| K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> | Merck          |
| KCl                             | Merck          |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> | Merck          |
| Acrylamide                      | Sigma          |
| BisAcrylamide                   | Sigma          |
| NaAc                            | Merck          |
| NaCl                            | Merck          |
| Proteinaz K                     | Life           |
| SDS (Sodium Dotesil Sulfate)    | Sigma          |
| TEMED                           | Sigma          |
| Trisma Base                     | Sigma          |
| Trisma HCl                      | Sigma          |
| H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>  | Sigma          |
| HCl                             | Sigma          |
| Triton X 100                    | Sigma          |
| Tween – 20                      | Sigma          |
| NaOH                            | Merck          |
| Asetik asit                     | Merck          |
| Hitrap depletion                | GE Healthcare  |

### 3.1.3 Tampon ve çözeltiler

- 0.5 M EDTA pH 8 (500 ml için)

93,05 gram Na<sub>2</sub>EDTAH<sub>2</sub>O 400 ml deiyonize su içerisinde 9 gram kadar NaOH eklenir ve daha sonra tamamı çözüldükten sonra çözeltinin pH'sı 8'e gelene kadar yavaşça NaOH eklenir böylelikle EDTA'nın tamamı çözülmüş olur daha sonra toplam hacim 500 ml'ye tamamlanır.

- 5M NaCl (1 Litre için)

292.2 NaCl 1 litre son hacim olacak şekilde deiyonize su içinde çözüldü.

- 10M NaOH (10N NaOH) (500 ml için)

200 gram NaOH tartıldı ve 500 ml deiyonize su içerisinde çözüldü.

- 1M Tris tamponu (1 Litre için)

121.1 gram Trisma base 800 ml deiyonize su içerisinde çözüldü istenilen pH'ya konsantre HCl ile ayarlandı ve deiyonize su ile 1 litreye tamamlandı.

- 1.5M Tris pH 8.8 (1 litre için)

181,65 gram tris baz'ı 800 ml deiyonize içinde çözülür ve daha sonra pH'sı konsantre HCl ile 8.8'e ayarlanır daha sonra deiyonize su ile 1 litreye tamamlanır.

- 0.5 M Tris pH 6.8 (1 litre için)

60,55 gram tris baz 700 ml içinde çözülür daha sonra konsantre HCl kullanılarak pH'sı 6.8'e ayarlanır son hacim olarak 1 litreye tamamlanır.

- 10X Tris Glycine running buffer (4 Litre için)

121,1 gram tris base 3 litre içerisinde çözülür daha sonra üzerine 576 gram glycine eklenir 200 ml % 20'lik SDS eklendikten sonra deiyonize su ile 4 litreye tamamlanır.

- 2X Sample loading buffer (non-reducing) (100 ml için)

5ml 1M Tris pH 7 üzerine 25 ml %20'lik SDS eklenir daha sonra 20 ml gliserol eklendikten sonra 2mg bromophenol blue ile karıştırılıp 100 ml'ye deiyonize su ile tamamlanır.

- 2x Sample loading buffer (reducing) (1 ml için)

950 µl 2x non-reducing sample loading buffer içine 50 µl β-mercaptoethanol eklenip kullanılır.

- Stain/destain solusyonu (4 litre için)

200 ml absolute ethanol için 200 ml glacial acetic acid eklenir ve 4 litreye deiyonize su ile tamamlanır.

- Fiksasyon Solusyonu (1 litre için)

600 ml absolute ethanol içine 75 ml glacial acetic acid eklenip 1 litreye deiyonize su ile tamamlanır.

- Commasie Blue Stock solüsyonu (100 ml için)

250 mg içine Commasie Brilliant Blue G-250 boyası 100 ml fiksasyon solüsyonu içine eklendi.

Protein miktar tayininde Bradford metodu kullanıldı. Bu metod için kullanılan çözeltiler aşağıdaki tabloda verilen şekilde hazırlanmıştır.

|                                |                |
|--------------------------------|----------------|
| Coomassie Brilliant Blue G-250 | 0,1 g          |
| %95 'lik Etanol                | 50 ml          |
| %95'lik Fosforik asit          | 100 ml         |
| Deiyonize su                   | 1 L tamamlandı |

0,1g Coomassie Brilliant Blue G-250 50 ml % 95'lik etanolde çözüldü. Bu çözelti üzerine %95'lik 100 ml Fosforik asit ilave edildikten sonra deiyonize su ile 1 litreye

tamamlandı. 0,45 µm lik filtre ile filtre edildikten sonra ışık almayan bir şişeye konarak +4°C’de saklandı.

Standart: 1 mg/ml BSA (bovine serum albümin) içeren stok standart çözeltisi kullanılarak farklı miktarda stok içeren standartlar hazırlandı.

### **3.2 Yöntem**

#### **3.2.1 Zorunlu yüzme testi yöntemi**

Bu çalışma, Bezmialem Vakıf Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulundan 27.05.2016 tarihinde 2016/ 148 sayılı etik kurul onayı alınarak yapıldı.

Araştırmada, Bezmialem Vakıf Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Üretim ve Deneysel Araştırmalar Laboratuvarında üretilen her bir grup için 7 adet denek olmak üzere toplam 14 adet Wistar Albino türü erkek sıçan kullanıldı. Deneklerin ağırlık ortalamaları iki grubun ağırlık ortalamalarına eşit olacak şekilde ayrıldı.

Deneklere standart laboratuvar koşullarında 12 saat aydınlık 12 saat karanlıkta, 20-22 °C sabit ısıda, %45-%55 nem oranında ve aynı ortamda tutuldu. Su ve yemleri ad libitum olarak sunuldu. Denekler deney sırasında temastan doğacak huzursuzluğu en aza indirmek için testini uygulayacak araştırmacının el temasına alıştırdı. Deneye başlamadan ağırlıkları tek tek ölçüldü. 20 cm çapında 40 cm yüksekliğinde cam silindirin, 25 cm’lik kısmı su ile dolduruldu. Suyun sıcaklığı 22-25 °C arasında tutuldu. Deneyin ilk günü sıçanlar su dolu kabın içine tek tek konuldu ve 15 dakika suda yüzmeye bırakıldı. Her denek suya bırakılmadan önce su değiştirildi ve cam silindirden alındıktan sonra kurulanarak kafeslerine yerleştirildi. 24 saat sonra denekler 1 hafta boyunca 5 dk süresince zorunlu yüzmeye bırakıldı. Total süre boyunca her sıçanın “despair”e (umutsuzluk) giriş (hareketsiz kalıncaya kadar geçen süre) ve “despair”de kalış (belli bir süre içinde ne kadar hareketsiz kaldığı) süresini belirlemek için yüksek çözünürlüklü kamera ile video kaydı yapıldı. Hareketsizlik, yüzme ve tırmanma olmak üzere 3 farklı parametre değerlendirildi. Skorlama yapılırken 5 dakika 5 saniyelik aralıklara bölündü ve her aralıkta baskın olan davranış dikkate alınarak aralığın türü belirlendi.

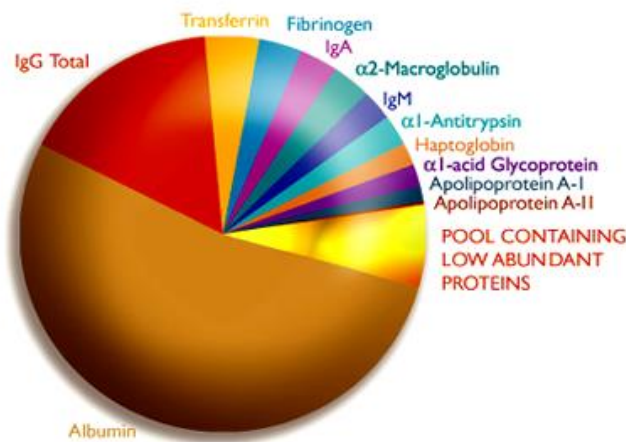
- Hareketsizlik: çırpınmadan suda süzülme ve sadece başını suyun üzerinde tutmasını sağlayacak zorunlu hareketler yaptığı, çabalamanın olmadığı durum olarak tanımlandı.
- Yüzme: aktif yüzme hareketinin olduğu, çabalama ve kaçmak için mücadele ettiği durum olarak tanımlandı.
- Tırmanma: sıçanın ön bacakları ile aktif hareketlerle suyun dışına çıkma ve cam silindirin duvarına tırmanmaya çalışma davranışı olarak yorumlandı.

Kontrol grubuna herhangi bir şey uygulanmadı.

### 3.2.2 Serum örneklerinin toplanması

Örnek toplama işlemi proteomik çalışmalarında çok önemli bir basamağı teşkil etmektedir. Bu nedenle alınacak tüm örneklerin çıkarılmasında aynı yol izlendi, örnekler protein degradasyonuna fırsat vermemek için uygun şekilde isimlendirildikten sonra hemen sıvı azot içerisinde dondurulup, DEKART Proteomiks Laboratuvarına ulaştırılmaları eşit süre içerisinde gerçekleştirilmeye çalışıldı. Bu sayede örneklerin alınması sırasında oluşabilecek farklılıklar ortadan kaldırıldı. Örnekler burada çalışılacağı güne kadar etiketlenip sıvı azot tankında -140°C’de saklandı.

Serum örnekleri kullanılarak yapılan proteomik çalışmalarında yaşanan en büyük deneysel güçlük; serumda yüksek miktarda bulunan serumun kendi proteinleridir.



Şekil 3.1: Serum protein içeriğinin genel dağılımı [82]

Şekil 3.1’de de görüldüğü üzere Albumin, Ig, transferrin, antitripsin ve haptoglobin, sıçan serum proteinlerinin yaklaşık %85’ni oluşturmaktadır ve bu proteinler düşük konsantrasyondaki proteinleri maskeleymektedirler.

Düşük miktardaki proteinleri araştırmak için yeteri miktardaki proteinin kullanılması demek bahsi geçen bu serumun doğal proteinlerinin aşırı fazla yüklenmesi anlamına gelmektedir. Biz yapacağımız deneylerde bu yüksek konsantrasyonda bulunan proteinlerden albumin ve IgG’yi Hitrap depletion (HiTrap® Albumin IgG Depletion GE Healthcare, 28-9466-03, pack of 2 × 1 mL, ABD) kolonu kullanarak uzaklaştırdık. Bu kolon sayesinde serum örneklerinde bulunan bu proteinler %60 oranında uzaklaştırılabilmektedir. Bu sayede düşük konsantrasyonlu proteinler saptanabilir seviyeye çıkmaktadır.

Alınan serum örnekleri ilk önce bu kolonlardan 4 mL/dk akış hızı ile NGC sistemi (BioRad, ABD) kullanılarak geçirilecek, toplanan örneklerden konsantrasyon ölçümleri yapılacaktır. Serum örnekleri buz üzerinde çözüldükten sonra tuzları ve diğer uygun olmayan maddeleri uzaklaştırmak için TCA-Aseton ile çöktürülerek temizlenmiştir. Serumun nasıl görüldüğü Şekil 3.2’de gösterilmiştir. Her bir örneğin hacimce dörtte biri kadar TCA örneklere eklenmiş ve 10 dk 4°C’de bekletilmiştir. Tüpler mikro santrifüjde 14000xg de 5 dk santrifüj edildikten sonra çöken proteinlerden sıvı kısım dikkatli bir şekilde ayrılmıştır. Protein çöktürmeleri 200 µL aseton ile yıkandıktan sonra mikro santrifüjde 14000xg de 5 dk santrifüje edilecek ve sonrasında asetonu uzaklaştırmak için proteinler 5 dakika oda sıcaklığında bırakıldı. Çökelek 250 µL, rehidrasyon tamponu içerisinde çözüldükten sonra protein konsantrasyonu belirlendi (Rehidrasyon tamponu: 8M urea, %0,2(w/v) Bio-Lye 3/10 ampholytes, %2 CHAPS, 50 Mm dithiothreitol (DTT) ve Bromophenol Blue).

Örnekler ikinci bir metot olarak 2DE clean up kitten (BioRad) geçirilerek de temizlendi. Örnekler protein çöktürücü tampon içerisinde -20°C’de 30 dk bekletilerek çöktürüldü, ardından santrifüj sonucunda elde edilen pellet uygun tampon içerisinde çözüldü. Hangi çöktürme metodunun uygun olacağı örnekler ile yapılacak ön denemelere bağlı olarak belirlendi.



**Şekil 3.2 : Plazma ve serum [82]**

Örnekler buz üzerinde çözüldükten sonra diğer uygun olmayan maddeleri uzaklaştırmak için TCA-Aseton ile çöktürülerek temizlendi. Her bir örneğin hacimce dörtte biri kadar TCA örneklere eklenecek ve 10 dk 4°C’de bekletildi. Tüpler mikro santrifüjde 14000xg de 5 dk santrifüj edildikten sonra çöken proteinlerden sıvı kısım dikkatli bir şekilde ayrıldı. Protein çöktürmeleri 200 µL aseton ile yıkandıktan sonra mikro santrifüjde 14000xg de 5 dk santrifüj edildi ve sonrasında asetonu uzaklaştırmak için proteinler 5 dakika oda sıcaklığında bırakıldı.

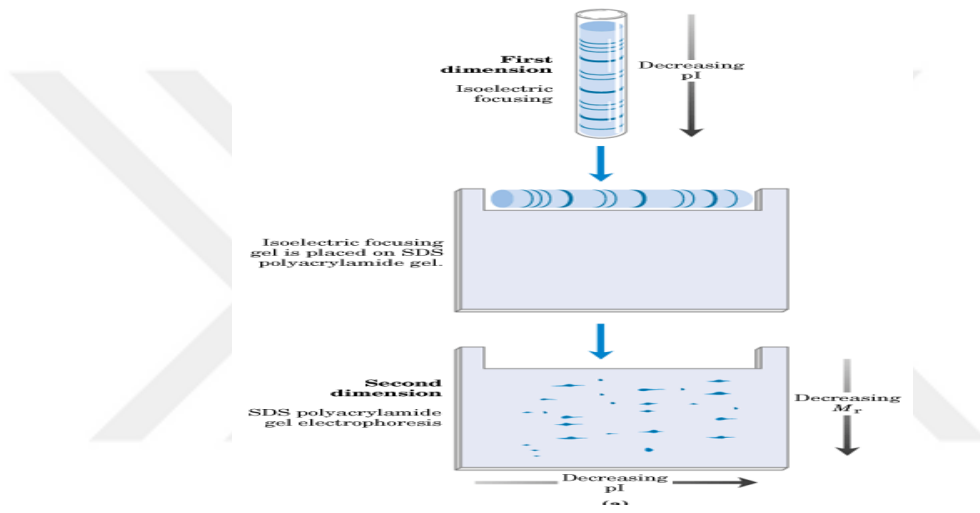
Çökelek 250 µL, rehidrasyon tamponu içerisinde çözüldükten sonra protein konsantrasyonu belirlendi (Rehidrasyon tamponu: 8 M urea, %0,2 (w/v) Bio-Lye 3/10 ampholytes, %2 CHAPS, 50 Mm dithiothreitol (DTT) ve Bromophenol Blue).

Örnekler kullanılmak üzere -80 °C’de saklama öncesi protein konsantrasyonlarının ölçülmesi gerekmektedir. Protein konsantrasyonları hazırlanan standartlar ve gerekli örnek dilüsyonları kullanılarak BCA assay (Multiscan FC, Thermo Scientific) ile belirlendi ve tüpler üzerine konsantrasyonlar yazılarak örnekler hızlı dondurma sonrası -80°C’de saklanacaktır.

### **3.2.3 2 Boyutlu jel elektroforezi**

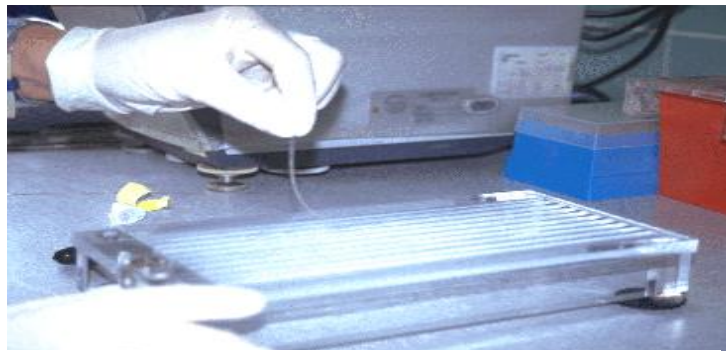
Şekil 3.3’de de görüldüğü üzere 2 boyutlu elektroforez tekniği ilk olarak proteinlerin pH gradienti içinde ayrışmalarını takiben ikinci adımda moleküler ağırlıklarına göre ayrışmaları sonucunda oluşmuş bir tekniktir. Protein örneklerine ilk aşamada IPG stripler üzerine geçebilmeleri için Şekil 3.4’de de görüldüğü üzere striplerle birlikte rehidrasyona tabi tutulacaklardır.

İzoelektrik odaklamada öncül denemeler için 7 cm'lik analizler için ise 11 cm'lik IPG stripleri (7 cm, pH 3-10 ve 11 cm, pH 5-8 IPG ReadyStrip, BioRad). Daha ileri çözünürlük alabilmek için gerektiğinde 17 cm'lik pH 5-8, pH 3-10 NL IPG striplerdekullanılabilecektir, yapılacak ön denemelere bağlı olarak IPG striplerin pH aralıkları örneklerin yoğunlaştığı pH'lar dikkate alınarak genişletilebilir veya daraltılabilir. Bu aşamada 7 cm IPG stripler için 25-50 µg, 11 cm IPG stripler için 100-200 µg ve 17 cm IPG stripler için 200-500 µg protein örneği kullanılacaktır. Cup loading yapıldığında ise örnek yükleme miktarı 17 cm'lik stripler için 1 mg kadar çıkabilmektedir. Gerekli miktardaki protein örneği 2D rehidrasyon buffer (son miktar



**Şekil 3.3:** 2 boyutlu jel elektroforez tekniği [82]

7 cm'lik stripler için 125 µl, 11 cm'lik stripler için ise 200 µl ve 17 cm'lik stripler için ise 300 µl dir.) ile karıştırılıp içerisine stripin pH'sına uygun %1 Amphylote ve %1 TBP eklenecektir. Bu aşamadan sonra protein örnekleri fokuslama trayleri içerisine konulur ve örneklerin üzerlerine uygun IPG stripler dikkatli bir şekilde yerleştirilerek



**Şekil 3.4 :** IPG striplerinin hazırlanması

50  $\mu$ A/IPG Strip akım uygulanacak şekilde PROTEAN IEF (BioRad) içerisinde aktif rehidrasyona tutulacaktır (20°C). Aktif rehidrasyon sırasında 1. saatin sonunda örneğin buharlaşmasını önlemek için IPG striplerin üzerlerine 2-3 ml mineral yağı ilave edilecek ve yaklaşık 16 saat rehidrasyon işlemine devam edilecektir.

Rehidrasyon işleminden sonra IPG striplerin izoelektrik odaklamasına geçilecektir. Rehidrasyon sonunda IPG stripler alınarak üzerlerinde fazla miktarda bulunan yağ kurutma kâğıdı ve su yardımı ile temizlenecek ardından temiz bir fokuslama trayi içerisine konularak üzerlerine yemi mineral yağ eklenecektir. Trayler daha sonra yine PROTEAN IEF (BioRad) içerisine konularak adım adım akımı yükselten üç aşamalı bir program ile 20°C' fokuslanacaktır (7 cm'lik IPG stripler için S1:250V 20 dk Linear, S2: 4000V 2 saat Lineer, S3: 4000volt, 10000 V-saat, Rapid, toplam 5 saat 14000 V-saat. 11 cm'lik IPG stripler için S1:250V 20 dk Linear, S2: 8000V 2,5 saat Lineer, S3: 8000 volt, 20000 V-saat, Rapid, toplam 5.3 saat ~30000 V-saat. 17 cm'lik IPG stripler için S1:250 V 20 dk Linear, S2: 10000 V 2,5 saat Lineer, S3: 10000 volt, 40000 V-saat, Rapid, toplam 7 saat ~50000 V-saat.). Fokuslama sırasında proteinler ait oldukları izoelektrik noktalarına göre IPG strip üzerinde sıralanırlar.

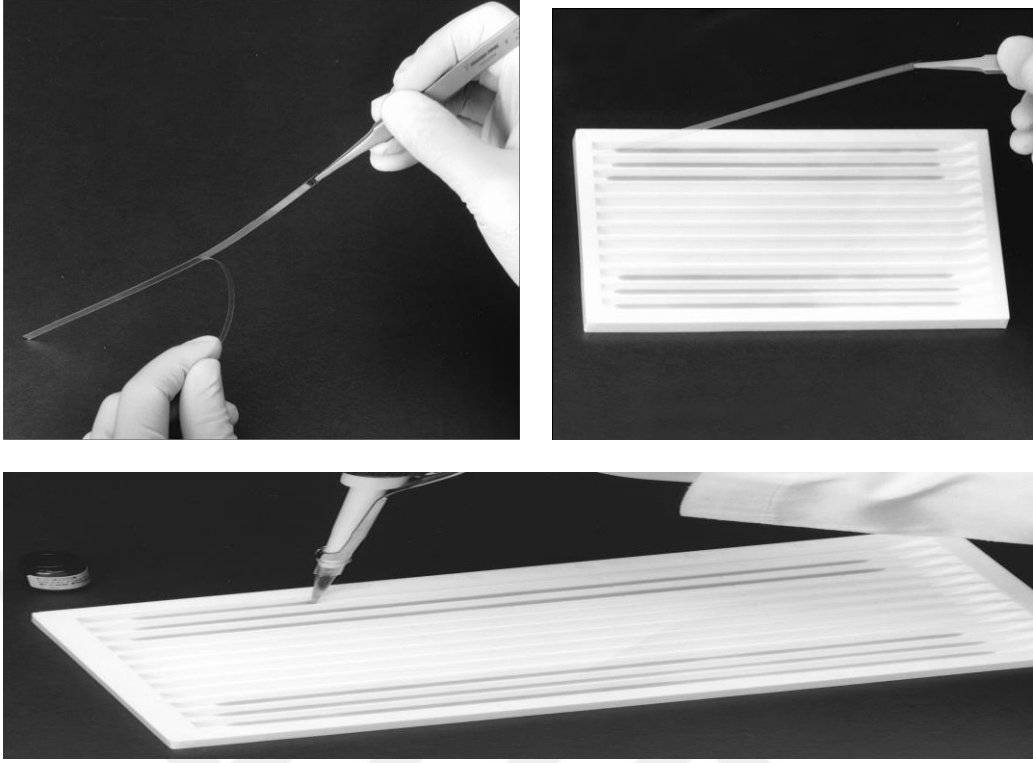
Fokuslama sonrasında stripler tampon I (6 M üre, 0.375 M tris-HCL pH8.8, 2% SDS, 20% gliserol, 2% (w/v) DTT) ve tampon II (6 M üre, 0.375 M tris-HCL pH8.8, 2% SDS, 20% gliserol, 2% (w/v) iodoasetamid) içerisinde 30 dk'lık sürelerle yıkanacaklardır. Stripler bu aşamadan sonra hazırlanan veya precast olarak alınan poliakrilamid jellere (12% veya değişik konsantrasyonlarda) yerleştirilerek elektroforez (7 cm'lik stripler için Mini Protean Tetra Cell (Bio-Rad) kullanılarak 180V'da 55 dakika oda sıcaklığında, 11 cm'lik stripler için Criterion Dodeca Cell (Bio-Rad) kullanılarak 180 V'da 1 saat 16°C'de ve 17 cm'lik stripler için Dodeca Cell (Bio-Rad) kullanılarak 35 mA 30 dk, 48 mA 5 saat 16°C'de) ile moleküler büyüklüklerine (MW) göre ikinci boyutta (2D) ayırma tabii tutulacaklardır (Laemmli, 1970). İkinci boyutta ayırım sırasında kullanılacak jeller için jel jel farklılığını ortadan kaldırmak amacıyla çoklu örnek çalışmalarında 11 cm'lik stripler için Criterion hazır jeller veya 17 cm'lik stripler için DODECA (BioRad Şekil 3.5) jel dökme, jel yürütme ve boyama sistemi kullanılacaktır. Elektroforez sonrasında jeller 40% metanol, 10% asetik asit içerisinde en az bir saat fikse edilecek ardından SyproRuby (BioRad) boyası içerisinde gece boyu boyanacaklardır. Jellerin

görüntülenmesi VersaDoc sistemi (BioRad) ile yapıldıktan sonra jellerin analizleri Quantityone ve PDQuest Advanced programları ile yapılarak istatistiki olarak anlamlı gözlenen regülasyonlara ait protein spotların kesimi Spot-cutter robotu (BioRad) ile yapılacaktır.



**Şekil 3.5 :** İzoelektrik odaklama cihazı

Şekil 3.6’da gösterildiği gibi protein spotlarından peptidlerin elde edilebilmesi için proteinlerin jel içinde peptidlerine ayrılması ve ardından jelden izole edilmeleri gerekmektedir. Bu işlem için spot örnekleri %50 asetonyitril (ACN) %50 25 mM amonyum bikarbonat çözeltisi içerisinde destain edilerek çalkalamalı vorktes üzerinde yıkanır. Yıkama sonunda örnekler 25 mM amonyum bikarbonat içerisinde 10% TCEP olacak şekilde 60°C’de 10 dk disulfid bağlarının kırılması sağlanacak (reducing) edilir. Ardından son konsantrasyonu 100 mM iyodaasetamit (IAA) olan 25 mM amonyum bikarbonat içerisinde oda sıcaklığında karaklıkta 1 saat bekletilerek indirgenmiş olan sistin yan zincirlerinden metillenecektir (Alkylolation). Bu işlem sonunda %100’lük ACN içerisine alınan spotlar, ACN uzaklaştırıldıktan sonra son konsantrasyonu 10ng/μl olan tripsin ile 30°C’de gece boyu kesime alınır.



**Şekil 3.6 : IPTG striplere proteinlerin yüklenmesi**

Örneklerin Zip-Tip’leri uçların önce ACN ve 0.1% triflorik asit ile dengelenmesi ile başlar. Her örnek 25-30 defa pipetlendikten sonra MALDI matriks ile MALDI plate üzerine elüsyonu yapılır.

#### **3.2.4 Farklı ifade edilmiş proteinleri belirleme**

Kontrol ve depresyon gruplarından alınan serum örnekleri jellere aktarılıp Şekil 3.7’deki güç kaynağı ve elektroforez tanki kullanılarak daha yürütüldükten sonra analizler yapıldı. Boyanıp resimleri dijital ortama aktarılan jeller karşılaştırma için MALDI-TOF cihazına gönderildi. Bu aşama için yazılım yardımıyla belirlenen farklı noktalar izole edilip farklı ifade edilmiş olan proteinlerin dizileri belirlendi.

#### **3.2.5 MALDI-TOF analizi**

Zip-tip sonrası MALDI plate yerleştirilen örneklerin AbSciex 5800 MALDI-TOF-TOF (MS/MS) cihazında analizleri yapılacaktır. Şekil 3.8’da şematik olarak olarak gösterilen MALDI-TOF-TOF, bir kütle spektrometresi olup lazer ışığı kullanarak iyonize ettiği peptitleri vakumlu bir tüp içereisinde ayrıştırdıktan sonra kütle/yük

(m/z) oranlarına ve peptitlerin amino asit dizilimlerine göre tanımlamaya yardımcı olur. Cihazdan elde edilen veriler online MASCOT data bankasından PROTEIN PILOT programı kullanılarak hangi proteine ait oldukları belirlenir.

Elde edilen proteinler arasındaki biyolojik ilişkiyi ortaya koymak ve hücresel

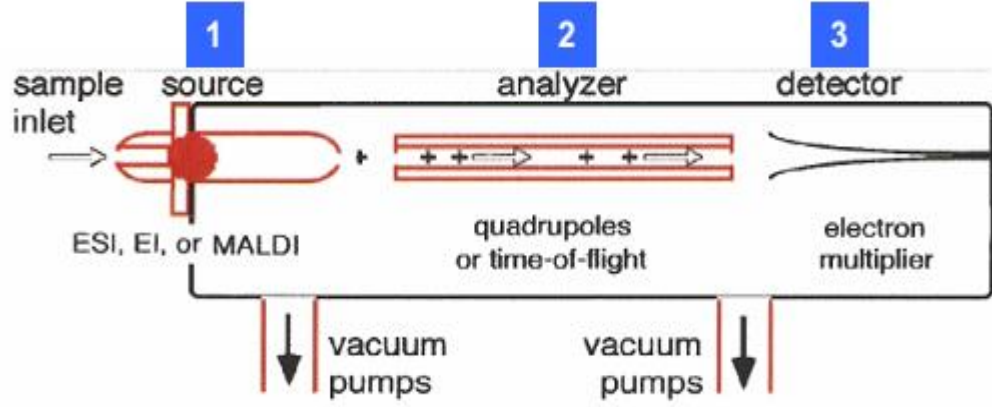


**Şekil 3.7 :** Güç kaynağı ve elektroforez tankı

yolakları belirlemek için ise PANTHER ve STRING programları kullanılacaktır.

MALDI kalibrasyonu eksternal veya internal kalibrant kullanılarak yapılacak, her bir spektrum için ortalama 200 lazer vuruşu kullanılacaktır.

Elde edilen tüm spektralar ( $m/z$ ), arama parametreleri; bir hatalı kesim bölgesi, fiksed modifikasyon olarak carbamidomethyl (cysteine), değişken modifikasyon olarak Met oksidasyonu, peptid yükü +1, monoizotopik kütle değerleri, peptid kütle toleransı  $\pm 50$  ppm, fragment kütle toleransı  $\pm 0.25$  Da olarak belirlenerek MASCOT bilgi bankasında analiz edilecektir.



Şekil 3.8 : Maldi-TOF çalışma şekli

## 4. BULGULAR

### 4.1 Zorunlu Yüzme Testi Bulguları

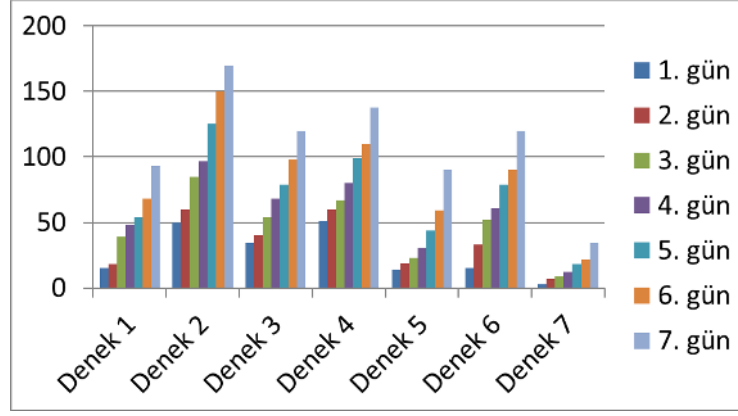
Deneklerin ağırlıklarında değişim görülmüştür. Deney öncesi ve deney sonrası deneklerin ağırlıkları arasındaki fark Tablo 4.1’de gösterilmiştir. 7 gün boyunca 5 dakikalık zorunlu yüzme testine maruz bırakılan deneklerin hareketsiz kalma süreleri Tablo 4.2’de gösterilmiştir. Deneklerin hareketsiz kalma sürelerini karşılaştıran grafik Şekil 4.1’de gösterilmiştir.

**Tablo 4.1 : Deneklerin ağırlıkları**

| Deney Grubu | 1     | 2     | 3     | 4     | 5     | 6     | 7     |
|-------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| İlk gün     | 272gr | 306gr | 250gr | 200gr | 370gr | 256gr | 222gr |
| Son gün     | 269gr | 300gr | 248gr | 197gr | 365gr | 250gr | 217gr |

**Tablo 4.2 : Deneklerin hareketsiz kalma süreleri**

|         | 1.gün    | 2.gün   | 3.gün    | 4.gün    | 5.gün    | 6.gün    | 7.gün     |
|---------|----------|---------|----------|----------|----------|----------|-----------|
| Denek 1 | 15 sn    | 18 sn   | 38.87 sn | 48.40 sn | 54.38 sn | 68.67sn  | 93 sn     |
| Denek 2 | 50 sn    | 60 sn   | 85.98 sn | 97 sn    | 125 sn   | 150 sn   | 170 sn    |
| Denek 3 | 34 sn    | 40 sn   | 54.28 sn | 67.94 sn | 78.54 sn | 98.12 sn | 120 sn    |
| Denek 4 | 51 sn    | 60 sn   | 67.29 sn | 80.02 sn | 99.34 sn | 110 sn   | 138 sn    |
| Denek 5 | 14.73 sn | 19 sn   | 23.17 sn | 30.61 sn | 44 sn    | 59sn     | 90 sn     |
| Denek 6 | 15.49 sn | 33 sn   | 52.25 sn | 60.59 sn | 79.09 sn | 90.40 sn | 120.63 sn |
| Denek 7 | 3.73 sn  | 6.70 sn | 9.11 sn  | 12.10 sn | 18.46 sn | 22.14 sn | 34.08 sn  |

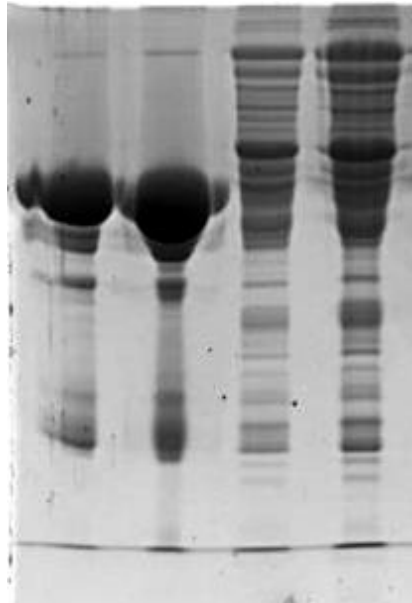


**Şekil 4.1 :** Deneklerin hareketsiz kalma sürelerini karşılaştıran grafik

#### 4.2 Toplanan Serum Örnekleri Bulguları

Denek hayvanlardan alınan kanlar santrifüj işleminden sonra serumlarına ayrıldı ve protein miktarları ölçüldü. Protein miktarları ve büyük moleküllerden ayrılması sonucunda oluşan saflıkları belirlendi.

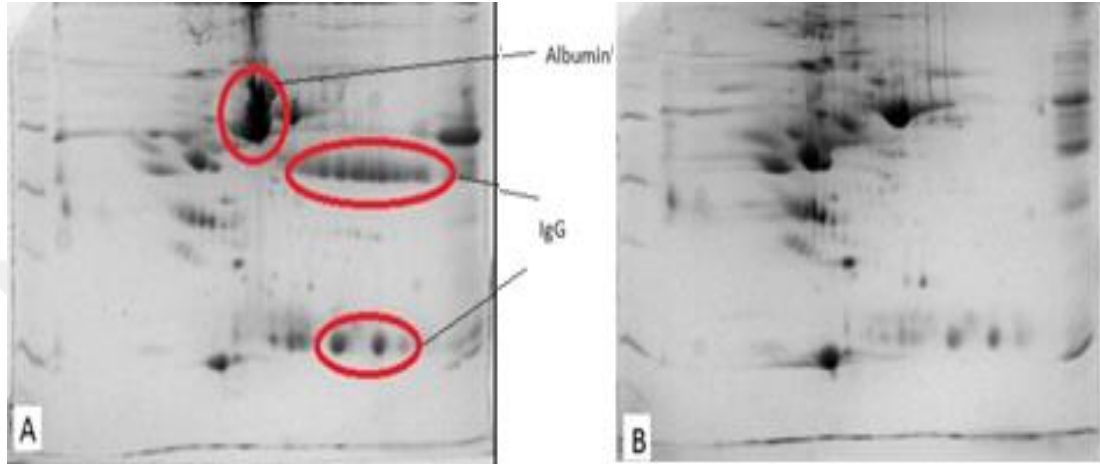
Protein örnekleri serumdan izole edildikten sonra indirgenmez-zenginleştirme kolonundan geçirildi böylece proteinlerin çözünürlükleri daha fazla arttı. Bu aşamada daha büyük olan proteinler ayrıştırılarak daha küçük kDa'a sahip olan proteinler izole edilerek 2 boyutlu elektroforez işleminde daha net ayrışma sağlandı. Serum örneklerinin jele yüklenmesi Şekil 4.2'de gösterilmiştir.



**Şekil 4.2 :** Serum örneklerinin jele yüklenmesi.

#### 4.3 2 Boyutlu Jel Elektroforezi Bulguları

İzole edilen protein örnekleri öncesi ve sonrası durumları olacak şekilde 2 boyutlu elektroforez yapılarak büyük ölçüde bulunan Albumin ve IgG proteinlerinin ayrıştığı görülmektedir. Serum örneklerinden büyük proteinlerin ayrışması öncesi ve sonrası jel görünümü Şekil 4.3’ de gösterilmiştir.

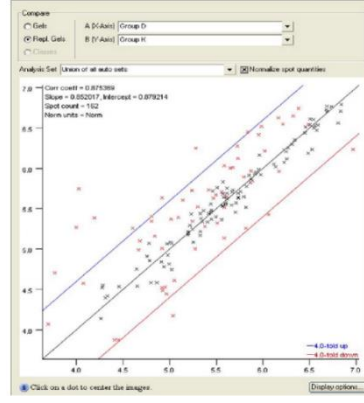


**Şekil 4.3 :** Serum örneklerinden büyük proteinlerin ayrışması öncesi ve sonrası jel görünümü.

Tez kapsamında yapılan çalışmanın büyük kısmını oluşturan 2 boyutlu jel elektroforez sonuçları kapsamında aşağıda kontrol ve depresyon gurubu deneylerinin saflaştırılmış serum örneklerinin karşılaştırılmış görüntüleri bulunmaktadır. Her gurup iki kere yürütülmüş ve sonuçlar bilgisayar yardımıyla çakıştırılıp yine bilgisayar yardımıyla ortalamaları alınmıştır.

#### 4.4 Farklı İfade Edilmiş Protein Bulguları

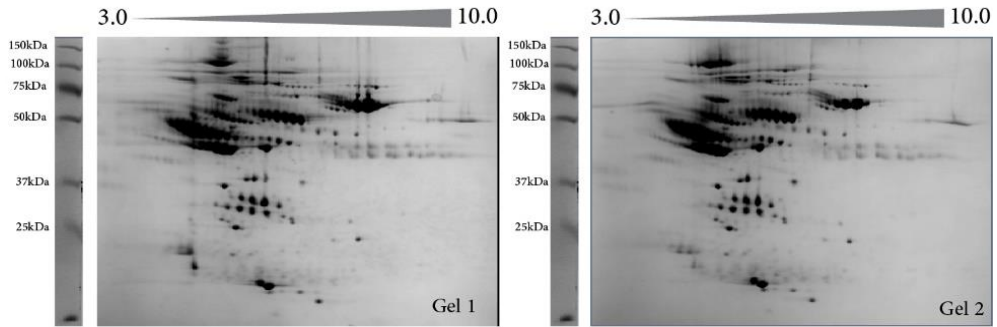
Farklı ifade edilen proteinler jel üzerinde nokta halinde belirirler ve göz ile görünmeleri çok zordur. Özellikle aynı noktaların farklı büyüklükte görünmeleri normal gözle anlaşılmazlar. Bu yüzden jeller yazılım yardımıyla dijital ortama yüksek çözünürlüklü bir kameraya sahip olan VerdaDoc MP4000 sistemi ile çekilerek aktarıldı. İki gurup iki kere tekrar edilerek proteinler jelde spot halinde gözlemlendi. PDQuest Advance analizi kullanılarak yapılan spot analizine ait resimler aşağıda belirtilmiştir. Jellerin birbirlerine olan benzerliklerini gösteren “scatter” plot Şekil 4.4’de gösterilmiştir.



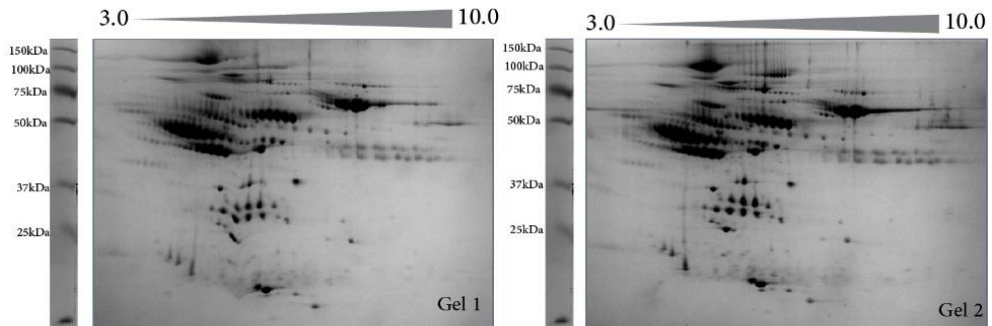
**Şekil 4.4 :** Jellerin birbirlerine olan benzerliklerini gösteren “scatter” plot.

Protein spotları belirlendikten sonra eşleştirildi ve aralarındaki regülasyon oranlarını bulabilmek için analize tabi tutuldu. Elde edilen spot dağılım profillerinin birbirine oldukça benzer olmalarına karşın bilgisayar yazılımı ile farklılıklar ortaya çıkmaktadır. Gruplar arasında ifade edilen proteinlerin jel üzerinde görünümü Şekil 4.5 ve Şekil 4.6’da gösterilmiştir.

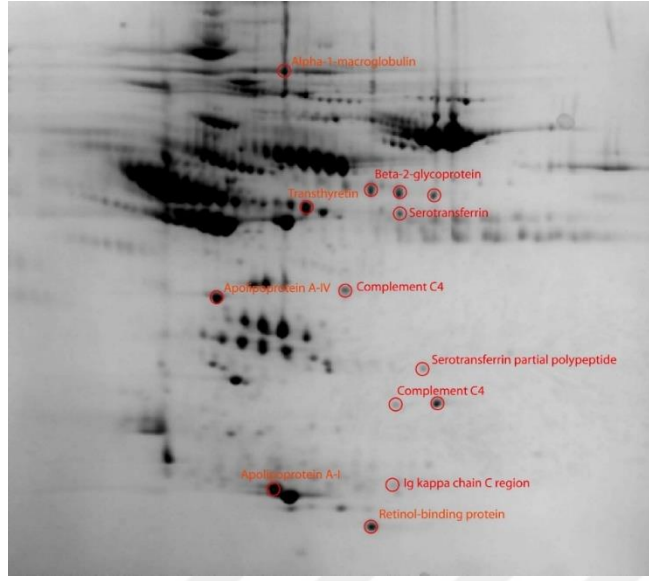
**Group D**



**Group K**



**Şekil 4.5 :** Gruplar arasında ifade edilen proteinlerin jel üzerinde görünümü

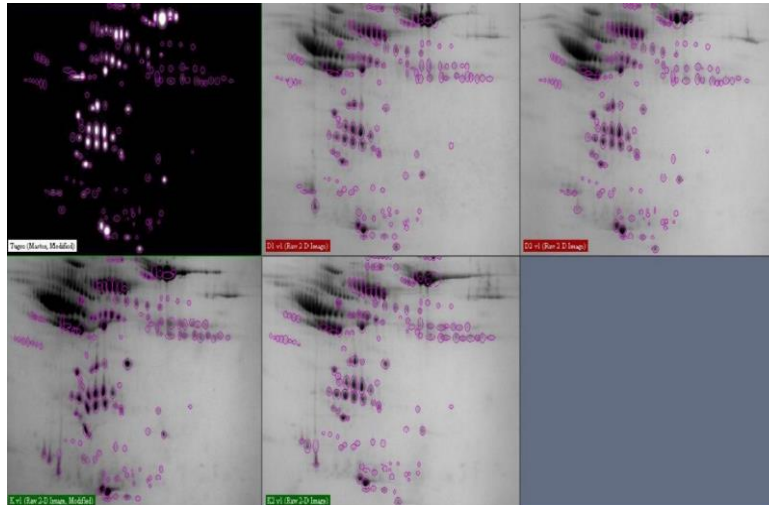


**Şekil 4.6:** Gruplar arasında farklı ifade edilen proteinlerin jel üzerinde görünümü

#### 4.5 MALDI-TOF Analiz Bulguları

Jeller üzerinde bilgisayar yazılımı ile belirlenen noktalar alınarak MALDI-TOF cihazı ile protein dizilemesi yapıldı. Dizilemesi yapılan proteinler jel üzerinde karşılaştırılmasının yapılması aşağıdaki jel görüntüsüyle gösterilmiştir.

Burada edinilen bulgular neticesinde öncelikle değişim gösteren proteinlerin biyolojik proses analizi yapıldı. Bunlar Tablo 4.3’de gösterilmiştir.



**Şekil 4.7:** Gruplar arasında ifade edilen proteinlerin yazılım ile belirlenmesi

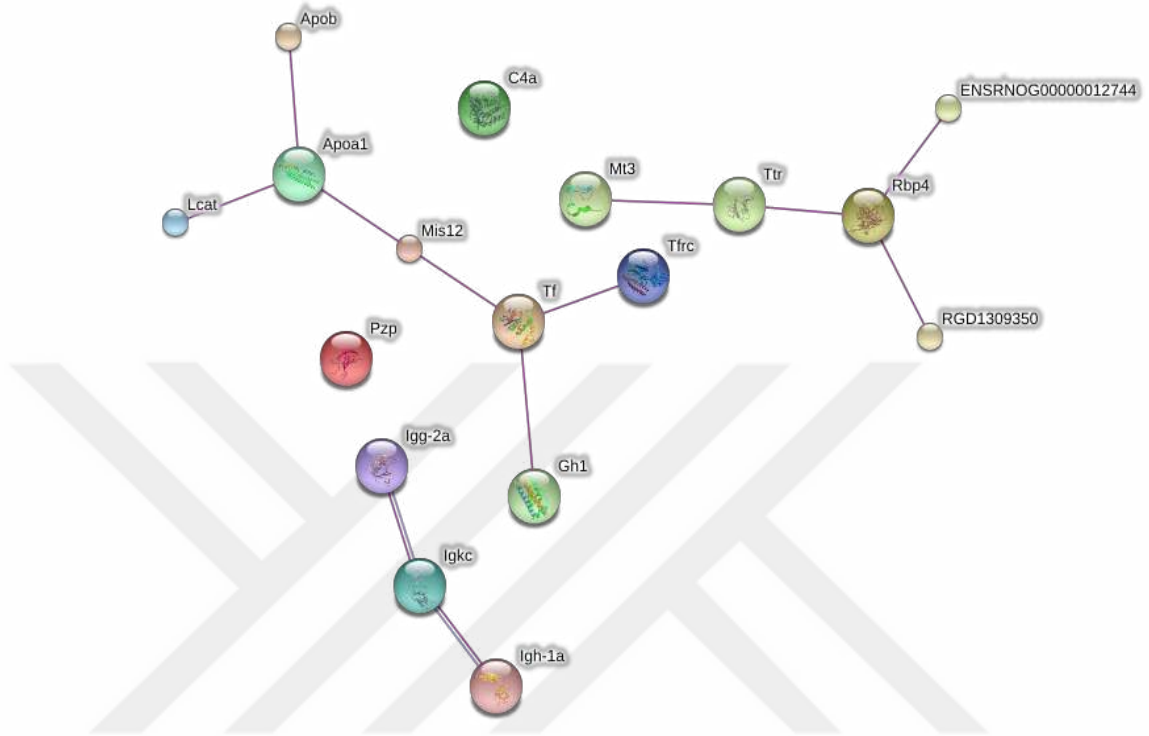
**Tablo 4.3 : Değişim gösteren proteinlerin biyolojik proses analizi**

| #pathway ID | pathway description                               | observed gene count | false discovery rate | matching proteins in your network (labels)        |
|-------------|---------------------------------------------------|---------------------|----------------------|---------------------------------------------------|
| GO.0034369  | plasma lipoprotein particle remodeling            | 4                   | 9.86e-08             | Apoa1, Apob, Apoe, Scarb1                         |
| GO.0033344  | cholesterol efflux                                | 4                   | 1.93e-07             | Apoa1, Apob, Apoe, Scarb1                         |
| GO.0097006  | regulation of plasma lipoprotein particle levels  | 4                   | 7.95e-07             | Apoa1, Apob, Apoe, Scarb1                         |
| GO.0008203  | cholesterol metabolic process                     | 5                   | 1.05e-06             | Apoa1, Apob, Apoe, Lcat, Scarb1                   |
| GO.0006066  | alcohol metabolic process                         | 6                   | 1.55e-06             | Apob, Apoe, Lcat, Rbp4, Scarb1, Ttr               |
| GO.0042632  | cholesterol homeostasis                           | 4                   | 4.6e-06              | Apoa1, Apob, Apoe, Scarb1                         |
| GO.0033993  | response to lipid                                 | 8                   | 7.45e-06             | Apoa1, Apob, Apoe, Lcat, Ppara, Rbp4, Scarb1, Tfr |
| GO.0010885  | regulation of cholesterol storage                 | 3                   | 8.97e-06             | Apob, Ppara, Scarb1                               |
| GO.0043691  | reverse cholesterol transport                     | 3                   | 1.35e-05             | Apoa1, Apoe, Scarb1                               |
| GO.0019433  | triglyceride catabolic process                    | 3                   | 1.9e-05              | Apoa1, Apob, Apoe                                 |
| GO.0042157  | lipoprotein metabolic process                     | 4                   | 2.71e-05             | Apob, Apoe, Lcat, Ppara                           |
| GO.0030301  | cholesterol transport                             | 3                   | 5.77e-05             | Apob, Apoe, Scarb1                                |
| GO.0015850  | organic hydroxy compound transport                | 4                   | 7.27e-05             | Apob, Apoe, Rbp4, Scarb1                          |
| GO.0045834  | positive regulation of lipid metabolic process    | 4                   | 0.000138             | Apoa1, Apoe, Ppara, Scarb1                        |
| GO.0015914  | phospholipid transport                            | 3                   | 0.000151             | Apoa1, Apoe, Scarb1                               |
| GO.0046890  | regulation of lipid biosynthetic process          | 4                   | 0.000151             | Apoa1, Apob, Apoe, Scarb1                         |
| GO.0051180  | vitamin transport                                 | 3                   | 0.000151             | Apoa1, Rbp4, Scarb1                               |
| GO.0006869  | lipid transport                                   | 4                   | 0.00022              | Apob, Apoe, Rbp4, Scarb1                          |
| GO.0048878  | chemical homeostasis                              | 6                   | 0.000234             | Apob, Apoe, Rbp4, Scarb1, Tf, Tfrc                |
| GO.0010876  | lipid localization                                | 4                   | 0.00029              | Apob, Apoe, Rbp4, Scarb1                          |
| GO.0044281  | small molecule metabolic process                  | 7                   | 0.00029              | Apob, Apoe, Lcat, Ppara, Rbp4, Scarb1, Ttr        |
| GO.0042159  | lipoprotein catabolic process                     | 2                   | 0.000505             | Apob, Apoe                                        |
| GO.0010033  | response to organic substance                     | 8                   | 0.000672             | Apoa1, Apob, Apoe, Lcat, Ppara, Scarb1, Tf, Tfrc  |
| GO.0016042  | lipid catabolic process                           | 4                   | 0.000703             | Apoa1, Apob, Apoe, Scarb1                         |
| GO.0006707  | cholesterol catabolic process                     | 2                   | 0.000841             | Apoe, Scarb1                                      |
| GO.0010886  | positive regulation of cholesterol storage        | 2                   | 0.000841             | Apob, Scarb1                                      |
| GO.0034372  | very-low-density lipoprotein particle remodeling  | 2                   | 0.000841             | Apoa1, Apoe                                       |
| GO.0055088  | lipid homeostasis                                 | 3                   | 0.000988             | Apob, Apoe, Scarb1                                |
| GO.0032368  | regulation of lipid transport                     | 3                   | 0.00104              | Apoa1, Apoe, Ppara                                |
| GO.0010873  | positive regulation of cholesterol esterification | 2                   | 0.00118              | Apoa1, Apoe                                       |
| GO.0019218  | regulation of steroid metabolic process           | 3                   | 0.00118              | Apoa1, Apob, Apoe                                 |
| GO.0034383  | low-density lipoprotein particle clearance        | 2                   | 0.00118              | Apob, Scarb1                                      |
| GO.0050776  | regulation of immune response                     | 4                   | 0.00118              | Apoa1, C4a, Cr11, Scarb1                          |
| GO.004688   | positive regulation of lipid                      | 3                   | 0.00136              | Apoa1, Apoe, Scarb1                               |

|           |                                                                |   |         |                                     |
|-----------|----------------------------------------------------------------|---|---------|-------------------------------------|
| 9         | biosynthetic process                                           |   |         |                                     |
| GO.001568 | ferric iron transport                                          | 2 | 0.00152 | Tf,Tfrc                             |
| GO.003370 | phospholipid efflux                                            | 2 | 0.00152 | Apoa1,Apoe                          |
| GO.003438 | high-density lipoprotein particle assembly                     | 2 | 0.00152 | Apoa1,Apoe                          |
| GO.003475 | cellular hormone metabolic process                             | 3 | 0.00152 | Rbp4,Scarb1,Ttr                     |
| GO.003475 | iron ion transmembrane transport                               | 2 | 0.00152 | Tf,Tfrc                             |
| GO.000972 | response to hormone                                            | 6 | 0.0018  | Apoa1,Apob,Apoe,Lcat,Ppara,Tf       |
| GO.003252 | response to retinoic acid                                      | 3 | 0.00236 | Apoe,Rbp4,Tfrc                      |
| GO.000669 | steroid biosynthetic process                                   | 3 | 0.00276 | Apoa1,Apoe,Scarb1                   |
| GO.007170 | organic substance transport                                    | 6 | 0.00278 | Apob,Apoe,Rbp4,Scarb1,Tfrc,Ttr      |
| GO.000225 | activation of immune response                                  | 3 | 0.0028  | C4a,Cr11,Scarb1                     |
| GO.000193 | endothelial cell proliferation                                 | 2 | 0.00311 | Apoa1,Scarb1                        |
| GO.004353 | blood vessel endothelial cell migration                        | 2 | 0.00311 | Apoa1,Scarb1                        |
| GO.001401 | peripheral nervous system axon regeneration                    | 2 | 0.00357 | Apoa1,Apoe                          |
| GO.004476 | single-organism transport                                      | 7 | 0.00357 | Apob,Apoe,Rbp4,Scarb1,Tf,Tfrc,Ttr   |
| GO.007032 | triglyceride homeostasis                                       | 2 | 0.00357 | Apoa1,Scarb1                        |
| GO.000662 | lipid metabolic process                                        | 5 | 0.00404 | Apoe,Lcat,Ppara,Rbp4,Ttr            |
| GO.000110 | response to acid chemical                                      | 4 | 0.00414 | Apob,Apoe,Rbp4,Tfrc                 |
| GO.005100 | positive regulation of nitric-oxide synthase activity          | 2 | 0.0049  | Apoe,Scarb1                         |
| GO.007139 | cellular response to lipid                                     | 4 | 0.00502 | Apob,Apoe,Ppara,Scarb1              |
| GO.190170 | response to oxygen-containing compound                         | 6 | 0.00506 | Apob,Apoe,Ppara,Scarb1,Tf,Tfrc      |
| GO.003237 | regulation of cholesterol transport                            | 2 | 0.00551 | Apoa1,Apoe                          |
| GO.009020 | positive regulation of triglyceride metabolic process          | 2 | 0.00707 | Apoa1,Scarb1                        |
| GO.000820 | steroid metabolic process                                      | 3 | 0.0115  | Apob,Apoe,Lcat                      |
| GO.004257 | retinol metabolic process                                      | 2 | 0.0115  | Rbp4,Ttr                            |
| GO.000681 | ion transport                                                  | 5 | 0.0117  | Apoa1,Apoe,Scarb1,Tf,Tfrc           |
| GO.000687 | cellular iron ion homeostasis                                  | 2 | 0.0118  | Tf,Tfrc                             |
| GO.000695 | complement activation, classical pathway                       | 2 | 0.0118  | C4a,Cr11                            |
| GO.004222 | response to chemical                                           | 7 | 0.0118  | Apob,Apoe,Lcat,Ppara,Scarb1,Tf,Tfrc |
| GO.004471 | single-organism metabolic process                              | 7 | 0.0118  | Apoe,C4a,Cr11,Lcat,Ppara,Rbp4,Ttr   |
| GO.000245 | humoral immune response mediated by circulating immunoglobulin | 2 | 0.0127  | C4a,Cr11                            |
| GO.004559 | positive regulation of cell differentiation                    | 4 | 0.0127  | Apoa1,Apob,Apoe,Tf                  |
| GO.000669 | cholesterol biosynthetic process                               | 2 | 0.0136  | Apoa1,Apoe                          |
| GO.004592 | positive regulation of fatty acid metabolic process            | 2 | 0.0136  | Apoa1,Ppara                         |
| GO.005099 | regulation of lipid catabolic process                          | 2 | 0.0141  | Apoa1,Scarb1                        |
| GO.009013 | epithelium migration                                           | 2 | 0.0141  | Apoa1,Scarb1                        |
| GO.001407 | response to organic cyclic compound                            | 5 | 0.0155  | Apoa1,Apoe,Lcat,Ppara,Tf            |

|            |                                                 |   |        |                                   |
|------------|-------------------------------------------------|---|--------|-----------------------------------|
| GO.0031347 | regulation of defense response                  | 3 | 0.0155 | Apoa1,Cr11,Scarb1                 |
| GO.0044255 | cellular lipid metabolic process                | 4 | 0.0155 | Apoe,Ppara,Rbp4,Ttr               |
| GO.0006952 | defense response                                | 4 | 0.0157 | C4a,Cr11,Tf,Tfrc                  |
| GO.0010035 | response to inorganic substance                 | 4 | 0.0162 | Apob,Lcat,Tf,Tfrc                 |
| GO.0045861 | negative regulation of proteolysis              | 3 | 0.0167 | C4a,Cr11,Pzp                      |
| GO.0033036 | macromolecule localization                      | 5 | 0.0179 | Apob,Apoe,Rbp4,Scarb1,Tfrc        |
| GO.0006641 | triglyceride metabolic process                  | 2 | 0.018  | Apoa1,Apoe                        |
| GO.0071310 | cellular response to organic substance          | 5 | 0.018  | Apob,Apoe,Ppara,Scarb1,Tf         |
| GO.0048518 | positive regulation of biological process       | 7 | 0.0181 | Apob,Apoe,C4a,Cr11,Rbp4,Scarb1,Tf |
| GO.0044092 | negative regulation of molecular function       | 4 | 0.0194 | Apoa1,C4a,Ppara,Pzp               |
| GO.0006953 | acute-phase response                            | 2 | 0.0202 | Tf,Tfrc                           |
| GO.0006950 | response to stress                              | 6 | 0.0207 | Apoa1,Apoe,C4a,Cr11,Tf,Tfrc       |
| GO.0046688 | response to copper ion                          | 2 | 0.0208 | Lcat,Tfrc                         |
| GO.0002698 | negative regulation of immune effector process  | 2 | 0.0219 | Apoa1,Cr11                        |
| GO.0051346 | negative regulation of hydrolase activity       | 3 | 0.023  | Apoa1,C4a,Pzp                     |
| GO.1901701 | cellular response to oxygen-containing compound | 4 | 0.023  | Apob,Apoe,Scarb1,Tf               |
| GO.0009892 | negative regulation of metabolic process        | 5 | 0.0232 | Apoa1,C4a,Cr11,Ppara,Pzp          |
| GO.0042158 | lipoprotein biosynthetic process                | 2 | 0.0251 | Apoa1,Apob                        |
| GO.0050777 | negative regulation of immune response          | 2 | 0.0251 | Apoa1,Cr11                        |
| GO.0019538 | protein metabolic process                       | 6 | 0.0311 | Apob,Apoe,C4a,Cr11,Lcat,Ppara     |
| GO.0031329 | regulation of cellular catabolic process        | 3 | 0.0322 | Apoa1,Ppara,Scarb1                |
| GO.0006954 | inflammatory response                           | 3 | 0.0327 | C4a,Tf,Tfrc                       |
| GO.0044707 | single-multicellular organism process           | 7 | 0.037  | Apob,Apoe,Cr11,Pzp,Rbp4,Scarb1,Tf |
| GO.0065009 | regulation of molecular function                | 5 | 0.0428 | Apoe,C4a,Ppara,Pzp,Scarb1         |
| GO.0010720 | positive regulation of cell development         | 3 | 0.0447 | Apoa1,Apoe,Tf                     |
| GO.0001666 | response to hypoxia                             | 3 | 0.0472 | Ppara,Tf,Tfrc                     |

Ayrıca düzeylerinde regülasyon gözlemlenen proteinler arasındaki bağlantının ortaya çıkarılması amaçlı STRING analizi yapılmıştır. Bağlantılar deneysel veriler üzerinden kurulmuştur.



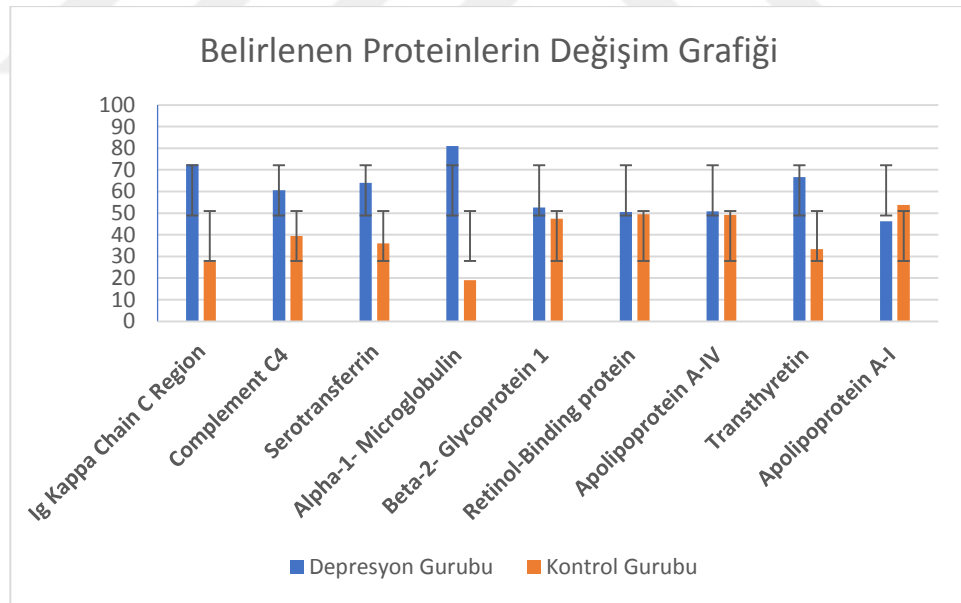
**Şekil 4.8 : STRING analizi**

MALDI-TOF analizi ile kesin olarak değişimleri gösterilen spotların tam açıklaması ve benzerlik oranları tam olarak tablo 4.4’de gösterilmiştir.

**Tablo 4.4:** Değişim gösterilen spotların tam açıklaması ve benzerlik oranları

| Spot ID | SSP  | AC no. | Best Protein Acc. | Best Protein Mass | Best Protein Score | Expect   | Match | Calc. pI | Seq. Cov. (%) | Best protein Description                                         |
|---------|------|--------|-------------------|-------------------|--------------------|----------|-------|----------|---------------|------------------------------------------------------------------|
| A1      | 7112 | P01835 | KACB_RAT          | 11594             | 82                 | 4,20E-05 | 5     | 4,97     | 47%           | Ig kappa chain C region, B allele OS=Rattus norvegicus PE=1 SV=1 |
| A2      | 7104 | P08649 | CO4_RAT           | 192042            | 48                 | 0,13     | 16    | 6,99     | 6%            | Complement C4 OS=Rattus norvegicus GN=C4 PE=1 SV=3               |
| A4      | 7401 | P12346 | TRFE_RAT          | 76346             | 446                | 1,90E-41 | 29    | 7,14     | 30%           | Serotransferrin OS=Rattus norvegicus GN=Tf PE=1 SV=3             |
| A5      | 5902 | Q63041 | A1M_RAT           | 167019            | 352                | 4,70E-32 | 33    | 6,46     | 20%           | Alpha-1-macroglobulin OS=Rattus                                  |

|     |      |        |           |       |     |          |    |      |     |                                                                           |
|-----|------|--------|-----------|-------|-----|----------|----|------|-----|---------------------------------------------------------------------------|
|     |      |        |           |       |     |          |    |      |     | norvegicus<br>GN=A1m<br>PE=1 SV=1                                         |
| A6  | 8504 | P26644 | APOH_RAT  | 33175 | 421 | 6,00E-39 | 24 | 8,59 | 44% | Beta-2-glycoprotein 1<br>OS=Rattus norvegicus<br>GN=ApoH<br>PE=2 SV=2     |
| A10 | 7106 | P04916 | RET4_RAT  | 23205 | 185 | 2,40E-15 | 14 | 5,69 | 50% | Retinol-binding protein 4<br>OS=Rattus norvegicus<br>GN=Rbp4<br>PE=1 SV=1 |
| A12 | 2304 | P02651 | APOA4_RAT | 44429 | 338 | 1,20E-30 | 26 | 5,12 | 43% | Apolipoprotein A-IV<br>OS=Rattus norvegicus<br>GN=Apoa4<br>PE=2 SV=2      |
| B1  | 5407 | P02767 | TTHY_RAT  | 15710 | 351 | 6,00E-32 | 12 | 5,77 | 51% | Transthyretin<br>OS=Rattus norvegicus<br>GN=Ttr<br>PE=1 SV=1              |
| B2  | 4103 | P04639 | POA1_RAT  | 30043 | 427 | 1,50E-39 | 30 | 5,52 | 47% | Apolipoprotein A-I<br>OS=Rattus norvegicus<br>GN=Apoa1<br>PE=1 SV=2       |



**Şekil 4.9:** Belirlenen proteinlerin değişim grafiği

Son olarak tanımlanan proteinler karşılaştırmalı olarak gösterilmiştir. Kontrol ve depresyon gurubu denekleri arasında görülen farklı protein ifadelerinin oranları, Şekil 4.9’da gösterilmiştir.

## 5. TARTIŞMA

Bu çalışmada zorunlu yüzme testi ile geliştirilen depresyon modelinde sıçan deney hayvanları kullanarak, serum örneklerinde kontrol gurubuna karşı değişen protein ifadelerinin karşılaştırılması yapılmıştır.

Depresyon ile ilgili birçok çalışma yapılmıştır. Psikolojik testler, çeşitli belirtilerle depresyon teşhisi [2, 7, 8, 15, 30, 50] konulabilirken moleküler anlamdan bir çalışma yeterli seviyede yapılmamıştır [31, 37, 38]. Tıbbi teşhislerin en önemli avantajı erken tanı yapılması ve müdahalenin erken zamanda yapılmasına olanak sağlamasıdır. Psikolojik rahatsızlıkların ilerlemesinin en büyük etmenlerinden birisi ise geç tanının yapılmasıdır [27, 71]. Bu nedenle kanser hastalıklarında da en büyük tıbbi tanı yapma şekli olan antikora dayalı testlerin psikolojik hastalıkların erken tanısında kullanılabilmesi önem arz etmektedir.

Model organizma olarak insana hem genetik hem de psikiyatrik olarak benzeyen sıçanlar deneysel depresyon modellerinde de çok kullanılmaktadır. Bu yüzden deney hayvanlarından insana doğru geçerken öncelikli çalışma sıçanlarda yapılması doğru analiz etme bakımından önemlidir.

Günümüz teknolojisinde moleküler biyoloji teknikleri her alanda kullanılmaktadır. Özellikle tıp alanındaki uygulamaları güncel sorunların çözüme katkı sağlamaktadır. Çoğu tıbbi teşhis koyma yöntemi metabolizmadaki belli olan proteinlerin değişiminin belirlenmesiyle ortaya çıkmıştır. Bu alanda önce olan tekniklerin başında MALDI-TOF ile protein dizilerinin belirlenmesi gelmektedir. Bilinmeyen proteinlerin öncelikle izoelektrik noktalarına göre ayrımından sonra moleküler ağırlıklarına göre ayrılmalardan sonra elektriksel alanda kalma sürelerine göre elde edilen diziler ile tanımlanması sağlanmaktadır. [104]

Çalışmada elde edilen sonuçlara göre yeni ve ilk defa depresyon tanısına karşı moleküler biyoloji tekniklerinden olan 2 boyutlu elektroforez ve MALDI-TOF

analizi ile potansiyel biyobelirteç elde edilmesi amaçlanmıştır. Elde edilen verilere göre 9 farklı proteinin miktarı yüzdelik olarak değişkenlik göstermiştir.

Bu sonuçlara göre Ig Kappa zincirinin C bölgesindeki alt biriminde depresyon gurubundaki hayvanlarda kontrol gurubundaki hayvanlara göre bir artma gözlemlenmiştir. Bu proteinin depresyon gurubunda bulunma oranı %73 iken kontrol gurubunda %27 olarak belirlenmiştir. İmmünglobülinin ağır zincirlerinde bulunan bu protein membran yapısında bulunan antibodylerdendir. B lenfositlerinde üretilen bu protein humoral bağışıklıkta görev almaktadır. [105] Complement C4 proteini de Ig Kappa zincirinin C bölgesindeki alt birimi gibi depresyon gurubu ile kontrol gurubu arasında farklılık gösteren proteinlerden birisidir. Depresyon gurubunda bu proteinin yüksek çıkması bu proteinin daha fazla ifade edildiği anlamına gelmektedir. Bu proteinin depresyon gurubunda bulunma oranı %61 iken kontrol gurubunda %29 olarak belirlenmiştir.

C3 ve C5 proteinlerinin enzimatik olmayan yapısı olan C4 proteini klasik tamamlama yolağı için gereklidir. Yerel enflamatuvar süreçlerinin düzenleyicisi olarak görev alan Complement C4 proteini düz kasların çalışmasını indükler ve damarsal geçirgenliğin artmasına neden olur. Bununla birlikte histamin salınımı arttır böylece bağışıklık fonksiyonunda değişikliğe neden olur. [106] Ayrıca yine C4 proteinin artması depresyon gurubundaki hayvanların kaslarının gerilmesine sebep olabilmektedir.

Serotransferrin dolaşım sisteminde demir iyonlarının taşınımından sorumlu olan transferrinlerdendir. [107] Demir iyonlarının hücreye girişi sırasında bir reseptör olarak görev yaparlar. Taşınım sırasında hücreye ulaştığında endositozu başlatır ve demir iyonları böylece hücreye girerler. Çalışma sonucunda elde ettiğimiz sonuçlara göre serotransferrin miktarı önemli derecede depresyon guruplarında kontrol guruplarına göre artış göstermiştir. Bu proteinin depresyon gurubunda bulunma oranı %64 iken kontrol gurubunda %36 olarak belirlenmiştir. Organizmada demir miktarının artması depresyon ile birlikte çeşitli hastalıklara neden olabilir. Bunların başında hemokromatoz adı verilen halk dilinde demir fazlalığı olan hastalık görülme oranı artabilir.

Önemli derecede yükseliş gösteren bir diğer protein olan Alpha-1- Microglobulin proteini omurgalılarda özellikle karaciğerde bulunan bir proteindir. [108] Çokça kan serumunda ve organların damar dışı dokularında bulunmaktadır. Organizmada hemoglobinleri bağlar ve onları parçalama görevine sahiptir. Böylelikle sürekli olarak hem gruplarını dokulardan alarak parçalarlar. Bu proteinin depresyon gurubunda bulunma oranı %81 iken kontrol gurubunda %19 olarak belirlenmiştir.

B (2) -Glikoprotein I ( $\beta$  (2) -GPI) kan içinde yüksek konsantrasyonda dolaşan bir proteindir. B (2) -GPI'nin işlevi 20 yıldan fazla bir süredir bir muammadır,  $\beta$  (2) -GPI'nin antifosfolipid sendromunda dolaşımdaki antikorların başlıca antijeni olduğu keşfedildi. Bununla birlikte, bu bilgi, proteinin fizyolojik rolü hakkındaki anlayışımızı geliştirmemiştir. Son yıllarda, yeni bilgiler, doğal bağışıklıkta bu proteinin önemli bir işlevini önerdi. B (2) -GPI'nin lipopolisakkariti temizlediği ve dolaşımdaki mikro parçacıklar gibi istenmeyen anyonik hücre kalıntılarını temizleyebildiği bulundu. B (2) -GPI'nin fonksiyonu, proteinin yapısal konformasyonuna bağlı gibi görünmektedir ve  $\beta$  (2) -GPI'nin en azından iki konformasyonda var olabileceği saptanmıştır. Bu proteinin depresyon gurubunda bulunma oranı %53 iken kontrol gurubunda %47 olarak belirlenmiştir.

A vitamini, karaciğer depolarından harekete geçirilir ve lipit alkol retinolü şeklinde plazmada taşınır ve belirli bir transport proteini, retinol bağlayıcı protein (RBP) ile bağlanır. RBP'nin kimyasal yapısı, metabolizması ve biyolojik rolleri hakkında çok şey bilinmektedir. RBP, molekül ağırlığı 20.000'e yakın olan tek bir polipeptid zincirdir [108]. RBP plazma prealbumin ile kuvvetli etkileşime girer ve normalde plazmada 1: 1 molar RBP-prealbumin kompleksi olarak dolaşır. Prealbuminin hem birincil hem de üçüncül yapısı bilinmektedir ve yakın zamanda RBP'nin primer yapısı bildirilmiştir. Bu taşıma sisteminde yer alan protein-protein ve protein-ligand etkileşimleri hakkında çok bilgi mevcuttur. Birçok klinik çalışmada insanlarda RBP ve prealbumin plazma seviyeleri üzerine çeşitli hastalıkların etkileri incelenmiştir. Karaciğer hastalığı olan hastalarda plazma RBP düzeyleri düşüktür ve kronik böbrek yetmezliği olan hastalarda yüksektir. Bu bulgular, RBP'nin karaciğerde üretildiği ve esas olarak böbreklerde katabolize olduğu gerçeğini yansıtır. Retinolün ekstra-hepatik dokulara verilmesi, RBP için spesifik hücre yüzeyi reseptörlerini içerdiği görülmektedir. Karaciğerden alınan vitamin A mobilizasyonu ve periferik dokulara

aktarım, RBP üretim ve salım hızlarını kontrol eden faktörler tarafından büyük oranda düzenlenir. Retinol eksikliği, plazma RBP seviyelerinin düşmesine ve karaciğer RBP düzeylerinin yükselmesine neden olacak şekilde RBP salgısını özel olarak bloke eder. Vitamin A eksikliği olan sıçanlara retinol enjeksiyonu, karaciğerden plazmaya RBP'nin hızlı salınmasını uyarır. Bu fenomenlere aracılık eden hücresel ve moleküler mekanizmalar incelenmektedir. Bu proteinin depresyon gurubunda bulunma oranı %51 iken kontrol gurubunda %49 olarak belirlenmiştir. RBP proteini depresyon gurubundaki hayvanlarda kontrol gurubundaki hayvanlardan çok az şekilde artmış olması A vitamini metabolizmasını etkileyebileceğini düşündürmektedir.

APOA4 geninin birincil translasyon ürünü, bir 396 kalıntı preproteini olup, proteolitik işleme tabi tutarak apo A-IV, 376 kalıntılı olgun O-bağlantılı glikoprotein üretmektedir. İnsanlar da dahil olmak üzere çoğu memelide, apo A-IV sentezi barsakla sınırlıdır; Fare ve sıçanlarda hepatik sentez de oluşur. [109] Apo A-IV yeni sentezlenen şilomikron parçacıkları yüzeyinde dolaşıma girer. Bağırsak yağ emilimi, apo A-IV sentezini ve salgılanmasını önemli ölçüde artırır. Yaptığımız çalışmaya göre APOA4 proteinin depresyon sırasında artış göstermiştir. Bu proteinin depresyon gurubunda bulunma oranı %51 iken kontrol gurubunda %49 olarak belirlenmiştir.

Prealbumin adı da verilen transtiretin, karaciğer tarafından üretilen ve kan dolaşımında bulunan önemli proteinlerdendir. Temel görevi, kan dolaşımında tiroid hormonu tiroksin ve A vitaminini taşımaktır. Genellikle kişinin beslenme durumunu ortaya koymak için, beslenme yetersizliği olanlarda ve besin desteği alan yoğun bakım hastalarında yapılır. Ancak transtiretin çeşitli hastalıklarda rolü olup olmadığına dair araştırmalar devam etmektedir.

Transtiretin proteini kan dolaşımındaki tiroksin hormonu ve A vitamininin taşınmasında görev alsa da kan dolaşımında bulunan seviyesi kişinin beslenme düzeyini belirler. Eğer besin alımında bir sorun varsa, kan dolaşımında birçok maddenin düzeyinde yetersizlik olur. [110, 111] Bunu belirlemenin yollarından biri, kan dolaşımında belirli seviyelerde bulunması gereken maddeleri tahlil etmektir. Transtiretin bu iş için son derece güzel bir örnektir. Kan dolaşımındaki kısa yarı ömrü sayesinde, beslenme düzeyini uygun bir şekilde ortaya koyar.

Ayrıca transtiretin şizofreni hastalığı ile de ilişkili olabileceği daha önce yapılan çalışmalarla ortaya konmuştur. Yüksek seviyede bulunan transtiretin şizofreni hastalığında da rol almaktadır. Şizofreni gibi nörodejeneratif bir hastalık olan depresyonda da bu proteinin ifadesinin artmış olduğu deneylerimizde de gösterilmiştir. Bu proteinin depresyon gurubunda bulunma oranı %67 iken kontrol gurubunda %33 olarak belirlenmiştir.

Apolipoprotein A1, insanlarda APOA1 geni tarafından kodlanan bir proteindir. Lipid metabolizmasında spesifik bir role sahiptir. Yakın tarihli bir rapordaki metin APOA1 mRNA'nın endojen olarak eksprese edilen antisens RNA ile düzenlendiğini ileri sürdü.

Apolipoprotein A1, plazmada HDL parçacıklarının ana protein bileşenidir. [112] Bağırsak enterositinden salınan chylomicronlar apo A1 içerir, ancak hızlı bir şekilde kan dolaşımında HDL'ye aktarılır.

HDL parçacıklarının bir bileşeni olarak protein, nakil için (hücrelerin dışındaki suda) hücrelerden (atardamar duvarlarının içindeki makrofajlar oksitlenmiş LDL parçacıklarından aşırı yük haline gelmiş olan) yağlar kabul ederek yağ moleküllerinin dışarı atılmasını sağlar. LDL parçacıkları veya atılım için karaciğer de dahil olmak üzere başka yerlerde. Çoğu plazma kolesterol esterinin oluşumundan sorumlu olan lesitin kolesterolasiltransferaz (LCAT) için bir kofaktördür. Apo A1 ayrıca bir prostasiklin (PGI<sub>2</sub>) stabilize edici faktör olarak izole edildi ve bu nedenle antiktrolama etkisi gösterebilir. Onu kodlayan gendeki bozukluklar, Tangier hastalığı da dahil olmak üzere HDL eksikliklerine ve sistemik non-nöropatik amiloidoz ile ilişkilidir.

ApoA1 sıklıkla kardiyovasküler hastalıkların tahmini için bir biyolojik belirteç olarak kullanılır. ApoB-100 / apoA1 oranı (yani LDL ve daha büyük partiküller ile HDL partikülleri), NMR ile ölçülmüş Lipoprotein (LDL / HDL) partikül oranları daha da fazla miyokard enfarktüsü olay oranları ile daha eski yöntemlere göre daha güçlü bir korelasyona sahiptir.

Çalışmamızda belirlenen diğer proteinlerin aksine depresyon guruplarında kontrol guruplarına göre düşüş gösteren bu protein özellikle yağ metabolizmasındaki

bozuklukların ortaya çıkmasına sebep olmaktadır. Bu proteinin depresyon gurubunda bulunma oranı %46 iken kontrol gurubunda %54 olarak belirlenmiştir.

Çalışmamızda, depresyonun erken tanısında kullanılabilecek yeni bir yöntem bulmak amacıyla model organizmanın serum örnekleri içinde değişen proteinlerden bilinmeyenlerin tayin edilerek tanımlanması amaç edilmiştir. Sonuçlarda elde edilen verilere göre depresyon guruplarındaki hayvanların kontrol gurubundaki hayvanlara göre artış gösteren Ig Kappa Chain C Region, Complement C4, Serotransferrin, Alpha-1- Macroglobulin, Beta-2- Glycoprotein 1, Retinol-Binding protein, Apolipoprotein A-IV, Transthyretin proteinlerine ek olarak bunlardan farklı olarak kontrol guruplarındaki hayvanlara göre depresyon gurubundaki hayvanlarda düşük olarak görülen Apolipoprotein A-I proteini birlikte düşünülerek majör depresyon tanısında kullanılabilecek bir yeni bir tanı sistemi belirlenebilir.

## 6. SONUÇ ve ÖNERİLER

### 6.1. Sonuç

Günümüzde psikiyatrik problemlerin varlığı hem bireysel hem de toplumsal açıdan dikkat çekecek ölçüde artmıştır. Depresyon, dünya nüfusunun yaklaşık %20'i gibi büyük bir kısmını etkileyecek kadar yaygın olması yanında; günlük yaşam işlevselliğini bozarak neden olduğu yeti kayıpları, ekonomik sonuçları ve yüksek intihar eğilimi nedeniyle de en önemli psikiyatrik sorunlardan biri olma özelliğini sürdürmektedir [1]. Genetik ve metabolik yatkınlık ile stres ve yaşam olayları gibi çevresel faktörlerin birlikte etkin olduğu çok faktörlü bir etiyolojiye sahiptir. Anatomik işaretler yeterli olmasa da birçok işlevsel bulgu beyin devrelerinin etkilendiğini kesinlikle göstermektedir. Depresyon nörobiyolojisinde yapılan çalışmalar ve tedavide kullanılan antidepresan ilaçların etki mekanizmalarının çeşitliliğine rağmen tedaviye yüksek oranda yanıt alınamaması veya oluşan yanıtta gecikme ile görülmesi gibi klinik sorunlar bu alanda yapılacak klinik öncesi çalışmaların önemini korumasını sağlamaktadır. [2]

Majör depresyon hastalarında beyni incelemek için moleküler profil teknolojileri kullanılarak yapılmış birçok araştırma vardır. Depresyonda beyinde meydana gelen protein seviyesindeki değişimlerin ve diğer proteinlerle ilişkisinin belirlenmesi sendromun ilerlemesi açısından önemlidir. Proteomikler, yakın zamanlarda beyin hastalıklarının tanıları için uygun belirteçlerin keşfi, hastalık seyrini izleme ve yeni tedavi hedeflerini belirlemek üzere kullanılmaya başlanan yaklaşımlardan biridir [3]. Gen düzenlenmesi ve protein ekspresyonlarının karmaşık doğası ve bunların çevresel ve dışsal faktörlerle etkileşimini insan beyninde incelemenin güçlüğü araştırmaların hayvan modelleri üzerine odaklanmalarına neden olmuştur [4]. Hayvanlarda yürütülen klinik öncesi çalışmalar hem depresyonda nöron işleyişinin farklı boyutları ile ilgili bilgi birikimimizi artırır hem de tanıya yönelik çalışmaların gelişmesine yönelik katkı sağlar.

İnsan metabolizmasındaki değişimler kandan izole edilen seruma da yansımaktadır. Hastanelerde tanıya yönelik yapılan pre-klinik çalışmalarda öncelikle biyokimyasal bulgular göz önünde bulundurulmaktadır. Günümüzde, alınan serum örneklerindeki, belirteçlerle belirlenen değişimler metabolik bir bozukluk ya da hastalığın teşhisinde kullanılmaktadır. Henüz sıçanlarda zorunlu yüzme testi ile oluşturulan depresyon modeli ile yapılmış bir proteomik çalışması bulunmamaktadır. Min Young Lee ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada majör depresyon modeli yapılmış sıçanlarda antidepresan ilaçları verilmiş ve verilmemiş hasta sıçanlarda değişen proteinlerin seviyesi gösterilmiştir. [5] Bu çalışmada ileri kromatografik tekniklerle aminoasit miktarlarına bakılmış olsa da 2 boyutlu elektroforez yöntemi ile proteomik konusunda bir bilgi verilmemiştir.

Bu amaçla zorunlu yüzme testi ile oluşturulmuş olan deneysel majör depresyon modeli kullanarak sıçanlarda deney yapılmıştır. Elde edilen depresyon gurubu ve kontrol gurubu deneklerinden elde edilen serumlar içindeki bilinmeyen proteinlerin değişimi gözlenmiş ve bunlar tanımlanmıştır. Çalışma kısaca şu aşamalardan oluşmuştur.

- Zorunlu Yüzme Testi

Bu aşamada 7 adet hayvan depresyon gurubu olan seçildi ve zorunlu yüzme testi uygulanarak depresyon modeli geliştirildi. Bu model sonucunda oluşturulan yüzme alanında çeşitli kriterler kullanılarak hayvanların depresyona girmeleri sağlandı. Kontrol amaçlı zorunlu yüzme testi kriterlerine göre hayvanların depresyona girdikleri belirlendi. Depresyon gurubuna ek olarak kontrol gurubu yani hiçbir mode geliştirilmeyen 7 adet hayvan seçilerek bu gruptaki hayvanlara hiçbir etkide bulunulmadı.

- Serum örneklerinin Toplanması

Depresyon modeli geliştirilen gruptaki ve kontrol gurubundaki hayvanlardan elde edilen serumlar çalışma yapılacak güne kadar -80°C’de saklandı. Serum örnekleri çeşitli kromatografik yöntemlerle zenginleştirilip büyük moleküllerden arındırılarak çalışmaya uygun hale getirildi.

- 2 Boyutlu Jel Elektroforezi

Serum örnekleri belirli aşamalardan geçtikten sonra deneye hazır hale geldiler. Örnekler ayrı jellerde aynı ortamda yürütülerek genel protein profillemesi yapıldı. Elde edilen sonuca göre proteinlerin uygun pH’da yürütülmeleri kararlaştırıldı. pH

belirleme adımından sonra elde edilen verilere göre 2 boyutlu jel elektroforezi yapıldı ve bilinmeyen proteinlerin belirlenmesi için bilgisayar yazılımı ile inceleme aşamasına geçildi.

- Farklı İfade Edilmiş Proteinleri Belirleme

Bilgisayar yazılımı ile inceleme aşamasının sırasında elde edilen verilerle farklı ifade edilmiş proteinler belirlendi. Bu adımda gözle görülmesinin mümkün olmadığı ve ayırım gücünün zor olması nedeniyle analizler bilgisayar yazılım ile yapıldı. Protein ifade farklılığı belirlenen noktalar jelden izole edilerek dizilerinin belirlenmesi için MALDI-TOF adımına geçildi.

- MALDI-TOF Analizi

Çalışmanın son aşaması olan MALDI-TOF analizi aşamasında, gruplar arasında farklı ifade edildiği belirlenen noktaların dizileri elektriksel alanda aminoasit kalım sürelerini hesaplama yoluyla belirlendi. Aralarında anlamlı farklılık bulunan protein ifadeleri karşılaştırılarak elde edilen 9 farklı noktanın ayrı ayrı yada bir kaç birlikte kullanılarak potansiyel biyobelirteç olabilecekleri sonucuna varıldı.

## 6.2. Öneriler

- Zorunlu yüzme testi ile oluşturulan majör depresyon modellerinin kesin olarak depresyonda kullanılması halen güncel literatür ile tam olarak desteklenmemektedir. Bu yüzden model organizmalarla yapılan çalışmaların insan çalışmalarına aktarılması konusunda tereddütlerin oluşmasına neden olmaktadır. Bu yüzden psikanaliz sonucu depresyon tanısı konmuş insanlarla çalışma yapılması sonuçların daha doğru olmasını sağlayabilir.

- Serum genel anlamda metabolik değişimleri gösterse de majör depresyonun beyin ile ilişkilendirilmesi daha baskın olduğundan dolayı beyin metabolizması ile ilgili çalışılması için beyin dokularının analiz edilmesi daha uygun sonuçlar ele edilmesini sağlayacaktır.

- İnsan beyni dokularına ulaşmanın zor olması bu yönde negatif etki etse de majör depresyon tanısı konduktan sonra hayatını kaybeden hastalardan elde edilecek beyin dokusu ile çalışmalar daha da bilgi verici olabilir.

- Protein ayırmada kullanılan kolonlar hala günümüz teknolojisine rağmen istenilen verimde çalışma konusunda eksikliklere sahiptir. Kromatografi sırasında oluşan protein kayıpları gerçek bir biyo belirteç üretme aşamasında zorluklara sebep

olmaktadır. Bu yüzden daha gelişmiş yöntemlerle kromatografi yapmak daha kesin sonuçlara neden olacaktır.

- Elektroforez yönteminde kullanıcı hataları ve pipet hatalarından dolayı yanlış sonuç alma olasılığı artmaktadır. Bu yüzden artık daha yeni teknolojilerden olan mRNA düzeyinde ifadeler analiz edilerek birçok biyobelirtecini bir arada olduğu tanı tekniklerinin üretilmesi daha gerçek sonuçların elde edilmesini sağlayacaktır.
- Elde edilen bilinmeyen proteinler moleküler genetik teknikleri kullanılarak prokaryotik ya da ökaryotik mikroorganizmalar kullanılarak antijen olarak ifade ettirilip devamında üretilen antijenler hibridoma dayalı yada faj display tekniğine dayalı antikor üretme yöntemleri kullanarak üretilen antikorlar ile de biyokimyasal tanı kitleri üretilir. Yine antijene dayalı tanı kitleri gibi antikora dayalı tanı kitleri üretilerek majör depresyon hastalığı için erken teşhis yapılabilir.
- Elde edilen sonuçların kas fizyoloji çalışmaları ile birlikte yapılması halinde depresyon modelinin doğruluğunu arttırabilir. Ortaya çıkan sonuçların depresyon modelinden mi yoksa kasların kasılması sonucunda mı ortaya çıktığı konusundaki soru işaretlerini giderecektir.

## KAYNAKLAR

- [1] Cryan, J.F., Markou, A. & Lucki, I. (2002). Assessing antidepressant activity in rodents: recent developments and future needs. *Trends in Pharmacological Sciences*, 23(5), 238-245.
- [2] Frodl, T. (2016). *Systems Neuroscience in Depression*. Academic Press.
- [3] Khawaja, X., Xu, J., Liang, J.J. & Barret, J.E. (2004). Proteomic analysis of protein changes developing in rat hippocampus after chronic antidepressant treatment: implications for depressive disorders and future therapies. *Journal of Neuroscience Research*, 75(4), 451-460.
- [4] Mu, J., Yang, Z. S. & Xie, P. (2008). Proteomic analysis of a rat model of depression. *Expert Review of Proteomics*, 5(2), 315-245.
- [5] Lee, M. Y., Kim, E. Y., Kim, S. H., Cho, K. C., Ha, K., Kim, K. P., & Ahn, Y. M. (2016). Discovery of serum protein biomarkers in drug- free patients with major depressive disorder. *Progress in Neuro Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 69, 60-68
- [6] Kaya, M., Genç, M., Kaya, B., & Pehlivan, E. (2007). Prevalence of Depressive Symptoms, Ways of Coping and Related Factors Among Medical School and Health Services Higher Education Students. *Türk Psikiyatri Dergisi*, 18(2), 1-9
- [7] Işık, E. (2003) *Depresyon ve bipolar bozukluklar*. Ankara: Görsel Sanatlar Matbaacılık, 5-11.
- [8] Yetkin, S., & Özgen, F. (2007). Tarihsel Bakış İçinde Depresyon. *Türkiye Klinikleri Journal of Internal Medical Sciences*, 3(47), 1-5.
- [9] Akiskal, H.S. (2005). Comprehensive Textbooks of Psychiatry *B Sadock, V Sadock (Eds.), Mood disorders: historical introduction and conceptual overview, (vol. 1)*. London, Lippincott Williams and Wilkins.
- [10] Georgotas, A. (1998). Evolution of the concepts of depression and mania. Georgotas A, Cancro R (Eds.), *Depression and mania* (s. 3-12). New York: Elsevier Science Publishing Co.
- [11] Akiskal, H. S., Hantouche, E. G., & Allilaire, J. F. (2003). Bipolar II with and without cyclothymic temperament: “dark” and “sunny” expressions of soft bipolarity. *Journal of affective disorders*, 73(1) 49-57.
- [12] American Psychiatric Association. (2013). *Diagnostic and statistical manual of mental disorders* (DSM-5®). American Psychiatric Pub.
- [13] Üstün, T. B., Ayuso-Mateos, J. L., Chatterji, S., Mathers, C., & Murray, C.J. (2004). Global burden of depressive disorders in the year 2000. *The British journal of psychiatry*, 184(5), 386-392.
- [14] Goodwin, R. D., Jacobi, F., & Bittner, A. (2007) Duygudurum Bozuklukları Temel Kitabı. Timuçin Oral (Ed.), *Duygudurum Bozukluklarının Epidemiyolojisi*. (s.33-54). İstanbul: Sigma Publishing Ltd. Şti.

- [15] Çelik, F. H., & Hocaoglu, Ç. (2016). Majör Depresif Bozukluk Tanımı, Etiyolojisi ve Epidemiyolojisi. *Bir Gözden Geçirme. Çağdaş Tıp Dergisi*, 6(1), 51-66.
- [16] Weissman, M. M., Bland, R., Joyce, P. R., Newman, S., Wells, J. E., & Wittchen, H. U. (1993). Sex differences in rates of depression: cross-national perspectives. *Journal of affective disorders*, 29(2) 77-84.
- [17] Kessler, R. C., McGonagle, K. A., Zhao, S., Nelson, C. B., Hughes, M., Eshleman, S., Wittchen, H. U., & Kendler, K. S. (1994). Lifetime and 12-month prevalence of DSM-III-R psychiatric disorders in the United States: results from the National Comorbidity Survey. *Archives of general psychiatry*, 51(1), 8-19.
- [18] Küey, L. (1985). *Yarı kentsel bir bölgede afektif bozukluklar ın yaygınlığı ve bu bozukluklara karşı gösterilen tutumları araştıran epidemiyolojik bir çalışma*. (Uzmanlık Tezi). Ege Üniversitesi, Psikiyatri Anabilim Dalı, İzmir.
- [19] Erol, N., Kılıç, C., & Ulusoy, M. (1988). Türkiye'nin ruh sağlığı profili raporu. *TC Sağlık Bakanlığı Temel Hizmetleri Genel Müdürlüğü Yayınları*, Ankara.
- [20] Savaş, H. A., & Yumru, M. (2006). Bipolar (ikiuçlu) bozuklukta genetik çalışmalar. *Türkiye Klinikleri Journal of Internal Medical Sciences*, 2(29), 10-16.
- [21] Andrews, G., Stewart, G., Allen, R., & Henderson, A. S. (1990). The genetics of six neurotic disorders: a twin study. *Journal of Affective Disorders*, 19(1) 23-29.
- [22] Bunney, W. E., & Davis, J. M. (1965). Norepinephrine in depressive reactions: A review. *Archives of General Psychiatry*, 13(6), 483-494.
- [23] Coppen, A. (1967). The biochemistry of affective disorders. *The British Journal of Psychiatry*, 113(504), 1237-1264.
- [24] Sadock, B. J., & Sadock, V. A. (2011). Kaplan and Sadock's synopsis of psychiatry: *Behavioral sciences/clinical psychiatry*. Lippincott Williams & Wilkins.
- [25] Demyttenaere, K., De Fruyt, J., & Stahl, S. M. (2005). The many faces of fatigue in major depressive disorder. *International Journal of Neuropsychopharmacology*, 8(1), 93-105.
- [26] Delgado, P. L., & Moreno, F. A. (1999). Role of norepinephrine in depression. *The Journal of clinical psychiatry*, 61, 5-12.
- [27] Richelson, E., & Nelson, A. (1984). Antagonism by antidepressants of neurotransmitter receptors of normal human brain in vitro. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 230(1), 94-102.
- [28] Rieder, P., Kopp, N., & Pearson, J. (1990). *An introduction to neurotransmission in health and disease*. Oxford University Press, USA.
- [29] Yüksel, N. (2000). *Birinci Basamakta Depresyon: Tanı ve Tedavi*. Ankara, Çizgi tıp yayınevi.
- [30] Albayrak, E.Ö. & Ceylan, M. E. (2004). Depresyon Etiyolojisinde Nörobijyolojik Etkenler. *Düşünen Adam Dergisi*.
- [31] Drevets, W. C., Frank, E., Price, J., Kupfer, D. J., Holt, D., Greer, P.J., & Mathis, C. (1999). PET imaging of serotonin 1A receptor binding in depression. *Biological Psychiatry*, 46(10), 1375-1387.

- [32] McClure, D. J. (1973). The role of dopamin in depression. *Canadian Psychiatric Association Journal*, 18(4), 309-312.
- [33] Thomas, M. J., Malenka, R. C., & Bonci, A. (2000). Modulation of long term depression by dopamine in the mesolimbic system. *Journal of Neuroscience*, 20(15), 5581-5586.
- [34] Stein Dan, J., Kupfer, D. J., & Schatzberg A. F. (2007). Duygudurum Bozuklukları Temel Kitabı. Timuçin Oral (Ed). Bölüm 7 (s. 117-130). İstanbul: Sigma Publishing Ltd. Şti.
- [35] Uzbay, T. (2004). Anksiyete ve depresyonun nörobiyolojisi. *Klinik Psikiyatri Dergisi*, 4(3), 1-11.
- [36] Altamura, C., Maes, M., Dai, J., & Meltzer, H. Y. (1995). Plasma concentrations of excitatory amino acids, serine, glycine, taurine and histidine in major depression. *European Neuropsychopharmacology*, 5, 71-75.
- [37] Tarhan, N., & Çetin, M. (1993). Depresyonda Biyolojik Göstergeler. *Depresyon Monografileri Serisi*, 4, 175-200.
- [38] Kotan, V. O., Eker, S.S., Sivrioğlu, E. Y., & Akkaya, C. (2009). N-Methyl D-Aspartic Acid (NMDA) Receptors and Depression. *Psikiyatride Guncel Yaklasimler-Current Approaches in Psychiatry*, 1(1), 36-44.
- [39] Tural, Ü., & Önder E. (2002). Glutamaterjik Sistem, N-Metil-D-Aspartik Asit Reseptörleri ve Depresyon. *Klinik Psikiyatri*, 4, 30-34.
- [40] Yemez, B. & Alptekin, K. (1998). Depresyon etiyolojisi *Psikiyatri Dünyası*, 1, 21-25.
- [41] Eşel, E. & Sofuoğlu, S. (2001). Depresyonun nöroendokrinolojisi. *Duygudurum Bozuklukları*, 1(3), 132-44.
- [42] Aron, D. C., Findling, J. W., & Tyrrell, J. B. (2007). Glucocorticoids and adrenal androgens. *Basic and clinical endocrinology*, 272-309.
- [43] Balcıoğlu, G. (1999). Depresyonun etyopatogenezi. Depresyon, somatizasyon ve psikiyatri.
- [44] Lasser, R.A. & Baldessarini, R. J. (1997). Thyroid hormones in depressive disorders: a reappraisal of clinical utility. *Harvard review of psychiatry*, 4(6), 291-305.
- [45] Eşel, E. (2002). Depresyondaki Nöroendokrinolojik Değişiklikler. *Klinik Psikiyatri Dergisi*, 5, 35-50.
- [46] Mendlewicz, J., Linkowski, P., Kerkhofs, M., Desmedt, D., Goldstein, J., Copinschi, G., & Van Cauter, E. (1985). Diurnal hypersecretion of growth hormone in depression. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 60(3), 505-512.
- [47] Joffe, R. T. (1997). The use of thyroid supplements to augment antidepressant medication. *The Journal of clinical psychiatry*, 59, 26-9.
- [48] Schmidt, H. D., & Duman, R. S. (2007). The role of neurotrophic factors in adult hippocampal neurogenesis, antidepressant treatments and animal models of depressive-like behavior. *Behavioural pharmacology*, 18(5-6), 391-418.
- [49] Özpoyraz, N. (2002). Depresyonda nöroanatomik bağlantılar. *Klinik Psikiyatri Dergisi*, 5, 68-72.
- [50] Sharma, A., Hoeffler, C. A., Takayasu, Y., Miyawaki, T., McBride, S. M., Klann, E., & Zukin, R. S. (2010). Dysregulation of mTOR

signaling in fragile X syndrome. *Journal of Neuroscience*, 30(2), 694-702.

- [51] Gross, C., Nakamoto, M., Yao, X., Chan, C. B., Yim, S. Y., Ye, K., ... & Bassell, G. J. (2010). Excess phosphoinositide 3-kinase subunit synthesis and activity as a novel therapeutic target in fragile X syndrome. *Journal of Neuroscience*, 30(32), 10624-10638.
- [52] Lista, V. A. (2002). Serotonin and antidepressant treatments: new issues about the therapeutic mechanism of action. *Vertex* (Buenos Aires, Argentina), 14(51), 25-29.
- [53] Brenner, C. (1977). *Psikanalizin Temelleri*. (I. Savaşır ve Y. Savaşır, Çev). Ankara: Yankı Matbaası.
- [54] Sigmund F. (1924). Mourning and melancholia. *The Psychoanalytic Review* (11), 77.
- [55] Rado, T. (1951). Psychodynamics of depression from the etiologic point of view. *Psychosomatic Medicine*, 13(1), 51-55.
- [56] Klein, D. F. (1974). Endogenomorphic depression: a conceptual and terminological revision. *Archives of General Psychiatry*, 31(4), 447-454.
- [57] Bibring, E. (1952). The problem of depression. *Psyche*, 6(2), 82
- [58] Beck, A. T. (1979). Cognitive therapy of depression. Guilford press.
- [59] Çam, O. (2007). Bilge A. Ruh hastalığına yönelik inanç ve tutumlar. *Anadolu Psikiyatri Dergisi*, 8, 215-223.
- [60] Dilbaz, N., & Seber, G. (1993). Umutsuzluk kavramı: Depresyon ve intiharda önemi. *Kriz Dergisi*, 1(3), 134-138.
- [61] Cengil, M. (2003). Depresyonu Önlemede Dini İnancın Koruyucu Rolü. *Dinbilimleri Akademik Araştırma Dergisi*, 3(3), 129-152.
- [62] Türkçapar, M. H., & Sargin, A. E. (2012). Bilişsel davranışçı psikoterapiler: tarihçe ve gelişim. *Bilişsel Davranışçı Psikoterapi ve Araştırmalar Dergisi*, 1, 7-14.
- [63] McKinney, W. T., & Bunney, W.E. (1969). Animal model of depression: I. Review of evidence: Implications for research. *Archives of general psychiatry*, 21(2), 240-248.
- [64] Costa, E., Garattini, S., & Valzelli, L. (1960) Interactions between reserpine, chlorpromazine, and imipramine. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 16(10), 461-463.
- [65] Willner, P., (1990). Animal models of depression: an overview. *Pharmacology Therapeutics*, 45(3), 425-455.
- [66] O'Neil, M.F., & Moore, N.A. (2003). Animal models of depression: are there any? *Human Psychopharmacology: Clinical and Experimental*, 18(4), 239-254.
- [67] Barr, A. M., Markou A., & Phillips, A.G. (2002). A 'crash'course on psychostimulant withdrawal as a model of depression. *Trends in pharmacological sciences*, 23(10) 475-482.
- [68] Russig, H., Pezze, M. A., Nanz-Bahr, N. I., Pryce, C. R., Feldon, J., & Murphy, C. A. (2003). Amphetamine withdrawal does not produce a depressive-like state in rats as measured by three behavioral tests. *Behavioural pharmacology*, 14(1), 1-18.
- [69] Seligman, M. E. (1972). Learned helplessness. *Annual Review of Medicine*, 23(1), 407-412.

- [70] Maier, S. F. (1984). Learned helplessness and animal models of depression. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 8(3), 435-446.
- [71] Nestler, E. J., Gould, E., & Manji, H. (2002). Preclinical models: status of basic research in depression. *Biological psychiatry*, 52(6), 503-528.
- [72] Willner, P. (1984). The validity of animal models of depression. *Psychopharmacology*, 83(1), 1-16.
- [73] Blanchard, R.J., McKittrick, C.R., & Blanchard, D.C. (2001). Animal models of social stress: effects on behavior and brain neurochemical systems. *Physiology & behavior*, 73(3), 261-271.
- [74] Leonard, B.E., & Tuite, M. (1981). Anatomical, physiological, and behavioral aspects of olfactory bulbectomy in the rat. *International review of neurobiology*, 22, 251-286.
- [75] Nowak, G., Szewczyk, B., Wieronska, J. M., Branski, P., Palucha, A., Pilc, A., Sadlik, K., & Piekoszewski, W. (2003). Antidepressant-like effects of acute and chronic treatment with zinc in forced swim test and olfactory bulbectomy model in rats. *Brain research bulletin*, 61(2), 159-164.
- [76] Steru, L., Chermat, R., Thierry, B., & Simon, P. (1985). The tail suspension test: a new method for screening antidepressants in mice. *Psychopharmacology*, 85(3), 367-370.
- [77] Porsolt, R.D., Anton, G., Blavet, N., & Jalfre, M. (1978). Behavioural despair in rats: a new model sensitive to antidepressant treatments. *European journal of pharmacology*, 47(4), 379-391.
- [78] Cryan, J.F., Valentino, R.J., & Lucki, I. (2005). Assessing substrates underlying the behavioral effects of antidepressants using the modified rat forced swimming test. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 29(4), 547-569.
- [79] Castagné, V., Moser, P., Roux, S., & Porsolt, R. D. (2010). Rodent models of depression: forced swim and tail suspension behavioral despair tests in rats and mice. *Current Protocols in Pharmacology*, 55, 5-8.
- [80] Başar, K. & Ertuğrul, A. (2005). Animal Models in Depression Research. *Clinical Psychiatry*, 8(3), 123-134.
- [81] Mellon, F.A. (2003). *Combined Chromatography and Mass Spectrometry A2 - Caballero, Benjamin, in Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition* (2nd ed. pp. 1294-1301). Academic Press: Oxford.
- [82] Tanbay, E. (2010). *Protein Ayırma Saflaştırma Yöntemleri. Elektroforez ve İki Yönlü Elektroforez (2d)*. (Lisans Tezi). Erciyes Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Kayseri.
- [83] Bo, T. & Pawliszyn, J. (2006). Characterization of bovine serum albumin-tryptophan interaction by capillary isoelectric focusing with whole column imaging detection. *Journal of Chromatography A*, 1105(1-2), 25-32.
- [84] You, J., Shan, Y., Zhen, L., Zhang, L., & Zhang, Y. (2003). Determination of peptides and amino acids from wool and beer with sensitive fluorescent reagent 2-(9-carbazole)-ethyl chloroformate by reverse phase high-performance liquid chromatography and liquid chromatography mass spectrometry. *Analytical Biochemistry*, 313(1), 17-27.

- [85] Assimon, M. M., Wenger, J. B., Wang, L., & Flythe, J. E. (2016). Ultrafiltration Rate and Mortality in Maintenance Hemodialysis Patients. *American Journal of Kidney Diseases*, 68(6), 911-922.
- [86] Liu, R., Wu, L., Pan, J., Jiang, C., & Xu, T. (2014). Diffusion dialysis membranes with semi-interpenetrating network for alkali recovery. *Journal of Membrane Science*, 451, 18-23.
- [87] Gabrielczyk, J., & Jördening, H.-J. (2017). Ion exchange resins as additives for efficient protein refolding by dialysis. *Protein Expression and Purification*, 133, 35-40.
- [88] Xiao, X., Wu, C., Cui, P., Luo, J., Wu, Y., & Xu, T. (2011). Cation exchange hybrid membranes from SPPO and multi-alkoxy silicon copolymer: Preparation, properties and diffusion dialysis performances for sodium hydroxide recovery. *Journal of Membrane Science*, 379(1-2), 112-120.
- [89] Gervais, D. & King, D. (2014). Capillary isoelectric focusing of a difficult-to-denature tetrameric enzyme using alkylurea-urea mixtures. *Analytical Biochemistry*, 465, 90-95.
- [90] Fuller, W., Eaton, P., Medina, R. A., Bell, J., & Shattock, M. J. (2001). Differential Centrifugation Separates Cardiac Sarcolemmal and Endosomal Membranes from Langendorff-Perfused Rat Hearts. *Analytical Biochemistry*, 293(2), 216-223.
- [91] Van Ierssel, S. H., Van Craenenbroeck, E. M., Conraads, V. M., Van Tendeloo, V. F., Vrints, C. J., Jorens, P. G., & Hoymans, V. Y. (2010). Flow cytometric detection of endothelial microparticles (EMP): Effects of centrifugation and storage alter with the phenotype studied. *Thrombosis Research*, 125(4), 332-339.
- [92] Sastry, K. V. H., Harikumar, K. G., Sailaja, P., & Sarma, M. J. (1997). Use of zonal centrifugation method for the preparation of  $\mu$ -opioid receptor enriched membranes from bovine corpus striatum. *Journal of Neuroscience Methods*, 74(1), 45-52.
- [93] Needleman, S.B. & Porvaznik, M. (1995). Identification of parent benzodiazepines by gas chromatography/mass spectroscopy (GC/MS) from urinary extracts treated with B-glucuronidase. *Forensic Science International*, 73(1), 49-60.
- [94] Ferreira, R.A. & Martins-Dias, S. (2016). Purification of plant complex protein extracts in non-denaturing conditions by in-solution isoelectric focusing. *Analytical Biochemistry*, 509, 100-103.
- [95] Koval, D., Kašička, V., & Cottet, H. (2011). Analysis of glycated hemoglobin A1c by capillary electrophoresis and capillary isoelectric focusing. *Analytical Biochemistry*, 413(1), 8-15.
- [96] Yokoyama, R., Iwafune, Y., Kawasaki, H., & Hirano, H. (2009). Isoelectric focusing of high-molecular-weight protein complex under native conditions using agarose gel. *Analytical Biochemistry*, 387(1), 60-63.
- [97] Zhang, X., Voronov, S., Mussa, N., & Li, Z. (2017). A novel reagent significantly improved assay robustness in imaged capillary isoelectric focusing. *Analytical Biochemistry*, 521, 1-7.
- [98] Evans, I.H. & Mathias, A.P. (1980). The fractionation of suspensions of isolated hepatocytes by rate zonal centrifugation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 628, 480-488.

- [99] Wei, H., Zhang, X., Tian, X., & Wu, G. (2016). Pharmaceutical applications of affinity-ultrafiltration mass spectrometry: Recent advances and future prospects. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 131, 444-453.
- [100] Xu, C., Liu, X., Xie, B., Yao, C., Hu, W., Li, Y., & Li, X. (2016). Preparation of PES ultrafiltration membranes with natural amino acids based zwitterionic antifouling surfaces. *Applied Surface Science*, 385, 130-138.
- [101] Jin, Q., Yue, J., Shan, L., Tao, G., Wang, X., & Qiu, A. (2008). Process research of macroporous resin chromatography for separation of N-(p-coumaroyl)serotonin and N-feruloylserotonin from Chinese safflower seed extracts. *Separation and Purification Technology*, 62(2), 370-375.
- [102] Zerifi, A., Labie, C., & Benard, G. (1991). SDS-PAGE technique for the species identification of cooked meat. *Fleischwirtschaft*, 71(9), 1060-1062.
- [103] Owusu-Apenten, R. (2002). *Food Protein Analysis: Quantitative Effects On Processing*. CRC Press.
- [104] Feshitan, J.A., Chen, C. C., Kwan, J. J., & Borden, M. A. (2009). Microbubble size isolation by differential centrifugation. *Journal of Colloid and Interface Science*, 329(2), 316-324.
- [105] Kovács, P. & Posta, J. (2005). Separation of humic acids using capillary isoelectric focusing. *Microchemical Journal*, 79(1-2), 49-54.
- [106] Horká, M., Karasek, P., Salplachta, J., Ruzicka, F., Vykydalova, M., Kubesova, A., & Slais, K. (2013). Capillary isoelectric focusing of probiotic bacteria from cow's milk in tapered fused silica capillary with off-line matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry identification. *Analytica Chimica Acta*, 788, 193-199.
- [107] Teng, G. & Papavasiliou, F.N. (2007). Immunoglobulin somatic hypermutation. *Annu Rev Genet*, 41, 107-20.
- [108] Episkopou, V., Maeda, S., Nishiguchi, S., Shimada, K., Gaitanaris, G. A., Gottesman, M. E., & Robertson, E. J. (1993). Disruption of the transthyretin gene results in mice with depressed levels of plasma retinol and thyroid hormone. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90(6), 2375-9.
- [109] Stelzhammer, V., Haenisch, F., Chan, M. K., Cooper, J. D., Steiner, J., Steeb, H., Martin de Souza, D., Rahmoune, H., Guest, C. P., & Bahn, S. (2014). Proteomic changes in serum of first onset, antidepressant drug-naïve major depression patients. *International Journal of Neuropsychopharmacology*, 17(10), 608-1599.
- [110] Lee, C.K., Weindruch, R., & Prolla, T. (2000). A. Gene-expression profile of
- [111] Sousa, J.C., Catarina, G., Ruiz, F. J., Miguel, D. R., Souza, D. L., Magalhaes, I. A., Saraiva, J. M., Souza, M. & Pulha, A. J. (2004). Transthyretin is involved in depression-like behaviour and exploratory activity. *Journal of Neurochemistry*, 88(5) 1052-1058.
- [112] Song, Y.R., Wu, B., Yang, Y. T., Chen, J., Zhang, L. J., Zhang, Z. W., Shi, H. Y., Huang, C. L., Pan, J. X. & Xie, P. (2015). Specific alterations in plasma proteins during depressed, manic, and euthymic

states of bipolar disorder. *Brazilian Journal of Medical Biological Research*, 48(11), 973-82.



## **EKLER**



**EK A : Etik kurul onay formu**



**T.C.  
BEZMÎÂLEM VAKIF ÜNİVERSİTESİ  
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU  
KARAR METNİ**

SAYI: 2016/ 148

27.05.2016

KONU: Sn. Prof.Dr.İsmet KIRPINAR

**Sayın, Prof.Dr.İsmet KIRPINAR**

“Sıçanlarda Zorunlu Yüzme Testi ile oluşturulan depresyon modelinde 2 boyutlu elektroforez ile tanıya yönelik proteinlerin araştırılması” başlıklı projeniz 27.05.2016 tarihinde yapılan Yerel Etik Kurul toplantısında değerlendirilmiş ve onanmıştır.

Doç. Dr. Fahri AKBAS  
Etik Kurul Başkanı

Prof. Dr. Ahmet BELCE  
Üye

Prof. Dr. Erhan AYŞAN  
Üye

Prof. Dr. İsmail MERMİ  
Üye

Prof. Dr. Sedat UŞUMUZ  
Üye

Yrd. Doç. Dr. Ömer UYSAL  
Üye

Vet. Hek. Mert ÇELİK TEN  
Üye

Nasuhi GÜNAY  
Üye

Hakan AKTÜRK  
Üye

KATILIMLI

- Etik kurulumuzdan onam alan her proje için, çalışma başlamadan üç ay önce çalışılacak hayvan rezervinin uygunluğunu (tür, yaş, cinsiyet) belirlemek amacıyla Deney Hayvanları Laboratuvarına başvurulmalıdır.

## ÖZGEÇMİŞ

**Ad Soyad** : Tuğçe DUMAN  
**Doğum Tarihi ve Yeri** : 03/10/1990 İSTANBUL  
**E-posta** : tugce@tugceduman.com

### ÖĞRENİM DURUMU

- **Lisans** : 2013, İstanbul Bilgi Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Psikoloji
- **Yüksek Lisans** : 2017, Bezmialem Vakıf Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Sinir Bilimleri Tezli yüksek lisans programı
- **Yüksek Lisans** : 2017 Fatih Sultan Mehmet Vakıf Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Klinik Psikoloji Tezsiz yüksek lisans programı

### MESLEKİ DENEYİMLER

- 2013 yılında Duman Tekstil’de çalıştı.
- 2013 yılında Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Onkoloji Bölümü’nde 1 ay staj yaptı.
- 2012 yılında Ermeni Hastanesi’nde 1 ay staj yaptı.
- 2011 yılında Bakırköy Prof. Dr. Mahzar Osman Ruh Ve Sinir Hastalıkları Hastanesi’nde 1 ay staj yaptı.
- 2011- 2012 yılları arasında Eyüp Devlet Hastanesi’nde 10 ay staj yaptı.
- 2010 yılında Maltepe Çocuk Cezaevi’nde 1.5 ay gönüllü olarak çalıştı.
- 2010 yılında Yakacık Huzurevi’nde 6 ay gönüllü olarak çalıştı.