



T.C.  
GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**FARE BEYNİNDE DORSAL RAFE ÇEKİRDEĞİ NÖRONLARINDA  
PİNDOLOLÜN SEROTONİN CEVABI ÜZERİNE ETKİSİ**

Burak YAMAN  
DOKTORA TEZİ

FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN  
Prof. Dr. Ramazan BAL

GAZİANTEP  
2019



T.C.  
GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**FARE BEYNİNDE DORSAL RAFE ÇEKİRDEĞİ NÖRONLARINDA  
PİNDOLOLÜN SEROTONİN CEVABI ÜZERİNE ETKİSİ**

Burak YAMAN  
DOKTORA TEZİ

FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN  
Prof. Dr. Ramazan BAL

GAZİANTEP  
2019

**T.C.**  
**GAZIANTEP ÜNİVERSİTESİ**  
**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**  
**FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**FARE BEYNİNDE DORSAL RAFE ÇEKİRDEĞİ NÖRONLARINDA**  
**PİNDOLOLÜN SEROTONİN CEVABI ÜZERİNE ETKİSİ**

**Burak YAMAN**

Tez Savunma Tarihi: 13/11/2019  
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Onayı

**Prof. Dr. Mehmet TARAKÇIOĞLU**  
**Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü**

Bu tez çalışmasının “Doktora” derecesi için uygun ve yeterli bir çalışma olduğunu onaylıyorum.

**Prof. Dr. Ramazan BAL**  
**Fizyoloji Anabilim Dalı Başkanı**

Bu tez tarafımda okunmuş, kapsamı ve niteliği açısından bir “Doktora” tezi olarak kabul edilmiştir.

**Prof. Dr. Ramazan BAL**  
**Tez Danışmanı**

Bu tez tarafımda okunmuş, kapsamı ve niteliği açısından bir “Doktora” tezi olarak kabul edilmiştir.

**Tez Jürisi**

**İmzası**

Prof. Dr. Lütfi ÇAKAR

Prof. Dr. A. Tuncay DEMİRYÜREK

Prof. Dr. Ramazan BAL

Doç. Dr. Davut Sinan KAPLAN

Dr. Öğr. Üyesi Burçin ALTINBAŞ

## BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün aşamalarda 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.

Tarih: 13/11/2019

Burak Yaman



## TEŐEKKÜR

Doktora eğitimim sırasında tez danıőmanlıđımı üstlenen, yama kenetleme tekniğini öğreten ve öğrendiklerimi elektrofizyoloji laboratuvarında özgür düşünce ortamında uygulayabilme imkânı sağlayan kıymetli hocam **Prof. Dr. Ramazan Bal**'a

Doktora eğitimim sırasında desteğini esirgemeyen değerli hocam **Prof. Dr. őeniz Demiryürek**'e

Doktora tezi süreci boyunca çok kıymetli fikirleriyle katkı sağlayan tez izleme komitesi üyeleri değerli hocalarım **Prof. Dr. A. Tuncay Demiryürek** ve **Doç. Dr. Davut Sinan Kaplan**'a

**Gaziantep Üniversitesi Deney Hayvanları Araştırma Merkezi** sorumlusu **Dr. Öğr. Üyesi A. Sarper Bozkurt** ve araştırma merkezi çalışanlarına

Bu süreçte desteğini yanımdan hiç esirgemeyen değerli **Aileme**

Teőekkürü bir borç bilirim.

Bu tez TF. DT.19.21 numaralı proje ile **Gaziantep Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri** birimi tarafından ve **Gaziantep Üniversitesi ÖYP koordinatörlüğü** tarafından desteklenmiőtir.

# İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER .....	i
KISALTMALAR.....	iii
ŞEKİL LİSTESİ.....	v
RESİM LİSTESİ.....	vii
TABLO LİSTESİ.....	viii
ÖZET .....	1
ABSTRACT.....	2
1. GİRİŞ VE AMAÇ .....	3
2. GENEL BİLGİLER.....	6
2.1. Rafe çekirdekleri .....	6
2.2. Serotonin .....	11
2.3. Serotonin reseptörleri .....	12
2.4. Majör depresyon.....	17
2.5. Venlafaksin .....	21
2.6. Pindolol .....	22
2.7. Elektrofizyoloji ve yama kenetleme tekniği .....	23
2.8. İyon kanalları .....	26
2.8.1. Potasyum kanalları .....	27
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	31
3.1. Deney hayvanları .....	31
3.2. Yama kenetleme tekniği.....	31
3.3. Fare beyinde dorsal rafe çekirdek bölgesinin lokalizasyonu .....	34
3.4. Beyin kesitlerinin alınması (diseksiyon).....	37
3.5. Yama kenetleme kayıtları .....	41
3.6. Solüsyonların içeriği .....	43
3.7. Perfüzyon sistemi .....	43

3.8. Hücrelerin tanımlanması .....	46
3.9. Davranış deneyleri .....	48
3.9.1. İlaçların uygulanması .....	48
3.9.2. Kuyruk asma testi .....	49
3.9.3. Zorunlu yüzme testi .....	49
3.9.4. Açık alan testi .....	50
3.10. İstatistiksel analiz .....	50
4. BULGULAR .....	52
4.1. <i>İn vitro</i> yama kenetleme deneyleri .....	52
4.1.1. DRD nöronlarının aksiyon potansiyeli desenleri, aktif ve pasif zar özellikleri .....	52
4.1.2. Serotonin DRD nöronlarının zar potansiyeli üzerine etkisi .....	56
4.1.3. Serotonin DRD nöronlarının zar akımları üzerine olan etkisi .....	58
4.2. <i>İn vivo</i> davranış deneyleri .....	75
4.2.1. Kuyruk asma testi .....	75
4.2.2. Zorunlu yüzme testi .....	76
4.2.3. Açık alan testi .....	76
5. TARTIŞMA VE SONUÇ .....	79
5.1. Yama kenetleme çalışmaları .....	79
5.1.1. Akım kenetleme çalışmaları .....	79
5.1.2. Voltaj kenetleme çalışmaları .....	81
5.2. Davranış deneyleri .....	86
5.3. Sonuç .....	89
KAYNAKLAR .....	91
ETİK KURUL KARARI .....	100
ÖZGEÇMİŞ .....	101

## KISALTMALAR

<b>5-CT:</b>	5-Karboksiamidotriptamin, serotonin analogu
<b>5-HT:</b>	5-Hidroksitriptamin, serotonin
<b>8-OHDPAT:</b>	(R)-(+)-8-Hidroksi-2-(dipropilamino)tetralin hidrobromit, 5-HT1A reseptör agonisti
<b>AAT:</b>	Açık alan testi (open field test)
<b>AC:</b>	Adenilat siklaz
<b>AHP:</b>	Geç (After) hiperpolarizasyon
<b>AP:</b>	Aksiyon potansiyeli
<b>ATP:</b>	Adenozin trifosfat
<b>cAMP:</b>	Siklik adenozin monofosfat
<b>CaCl<sub>2</sub>:</b>	Kalsiyum klorür
<b>DRN:</b>	Dorsal rafe çekirdeği
<b>DRD:</b>	Dorsal rafe çekirdeği dorsal altçekirdeği
<b>EGTA:</b>	Etilenglikol-bis (2-aminoetileter)-N,N,N',N'- tetraasetik asit
<b>GTP:</b>	Guanozin trifosfat
<b>HEPES:</b>	4-(2-Hidroksietil)piperazin-1-atansülfonikasit,N-(2- Hidroksietil)piperazin-N'-(2-etanülfonik asit)
<b>HCl:</b>	Hidroklorik asit
<b>I<sub>5</sub>-HT:</b>	Serotoninenden kaynaklanan zar akımı
<b>I<sub>8</sub>-OHDPAT:</b>	8-OHDPAT'dan kaynaklanan zar akımı
<b>KAT:</b>	Kuyruk asma testi (tail suspension test)
<b>KCl:</b>	Potasyum klorür
<b>KOH:</b>	Potasyum hidroksit
<b>MAO:</b>	Monoamin oksidaz
<b>MgCl<sub>2</sub>:</b>	Magnezyum klorür
<b>mV:</b>	Milivolt
<b>NaCl:</b>	Sodyum klorür
<b>NaOH:</b>	Sodyum hidroksit
<b>NEM:</b>	N-etilmaleimit (N-ethylmaleimide)
<b>nA:</b>	Nanoamper
<b>pA:</b>	Pikoamper



<b>PTX:</b>	Boğmaca toksini, pertussis toksini
<b>s.c.</b>	Subkutan
<b>SNRI:</b>	Serotonin noradrenalin gerialım (reuptake) inhibitörü
<b>SSRI:</b>	Selektif serotonin gerialım (reuptake) inhibitörü
<b>SF:</b>	Serum fizyolojik
<b>V<sub>m</sub>:</b>	Transmembran potansiyeli
<b>WAY 100135:</b>	N-tert-Bütil-3-(4-(2-metoksifenil)-piperazin-1-il)-2-fenilpropanamid dihidroklorid, 5-HT1A reseptör blokörü
<b>yBOS:</b>	Yapay beyin omurilik sıvısı
<b>ZYT:</b>	Zorunlu yüzme testi (forced swimming test)



## ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1: İnsanda beyin sapı boyunca bulunan rafe çekirdekleri .....	6
Şekil 2.2: Sıçan beyninde bulunan serotonerjik nöron grupları ve projeksiyonları .....	7
Şekil 2.3: Üst düzey beyin bölgelerinden dorsal rafe çekirdeği serotonerjik nöronları üzerine gelen GABAerjik ve glutamaterjik inputlar .....	9
Şekil 2.4: Serotonin sentez basamakları .....	12
Şekil 2.5: DRN nöronlarında serotonin sentezlenmesinin düzenlenmesi ve antidepresan ilaçların bu nöronlar üzerine etkisi. ....	19
Şekil 2.6: 5-HT <sub>1A</sub> reseptörünün hücre içindeki G proteini ilişkili sinyal ileti mekanizması. ....	20
Şekil 2.7: Yama kenetleme konfigürasyonları.....	25
Şekil 2.8: İyon kanallarının genel yapısı. ....	26
Şekil 2.9: İçeride doğru düzeltici potasyum kanallarından olan GIRK kanal yapısı ve açılma mekanizması. ....	30
Şekil 3.1: Farede orta hattın 0.04 mm lateral hattından sagittal düzlemde alınmış olan kesit.....	37
Şekil 3.2: Yama kenetleme tekniğinin dorsal rafe çekirdeği nöronu üzerine uygulanışının temsili çizimi.....	43
Şekil 3.3: Yama kenetleme deneylerinde kullanılan perfüzyon sisteminin şematik çizimi. ....	45
Şekil 4.1: DRD nöronlarının serotonine akım cevabı verme oranları. ....	52
Şekil 4.2: Serotonin uygulamasına cevap veren bir nöronda kare puls akım enjeksiyonlarına (+80,+72,+56, -16,-40,-56 pA) verilen voltaj yanıtlar. ....	53
Şekil 4.3: Negatif akım enjeksiyonu yapılan bir hücrede membran zaman sabiti ( $\tau$ ) ölçümü. ....	55
Şekil 4.4: Akım kenetleme şartlarında 5-HT uygulamasının etkisi.....	57
Şekil 4.5: Voltaj kenetleme şartlarında serotonin uygulaması. ....	59
Şekil 4.6: Voltaj kenetleme protokolüyle I <sub>5-HT</sub> 'nin karakterizasyonu (normal yBOS)...	62
Şekil 4.7: Voltaj kenetleme protokolüyle I <sub>5-HT</sub> 'nin karakterizasyonu (potasyumdan zengin yBOS).....	63
Şekil 4.8: I <sub>5-HT</sub> 'nin akım-voltaj ilişkisi. ....	64
Şekil 4.9: Kinin ön uygulaması ile I <sub>5-HT</sub> 'de ortaya çıkan değişim.....	66

Şekil 4.10: I <sub>5-HT</sub> 'ye WAY-100135 etkisi.....	68
Şekil 4.11: I <sub>5-HT</sub> 'ye pindolol etkisi.....	70
Şekil 4.12: 8-OHDPAT ile I <sub>5-HT</sub> imitasyonu.....	72
Şekil 4.13: Pindololün I <sub>8-OHDPAT</sub> 'a etkisi. ....	74
Şekil 4.14: Kuyruk asma testinde grupların altı dk içerisindeki immobilizasyon süresi. .....	75
Şekil 4.15: Zorunlu yüzme testinin son dört dk'sı boyunca ölçülen immobilizasyon süresi. ....	76
Şekil 4.16: Açık alan testinde bölünmüş olan 16 kare alan arasındaki geçiş frekansı. ..	77
Şekil 4.17: Açık alan testinde hayvanların orta alan içerisinde geçirdiği süre. ....	78



## RESİM LİSTESİ

Resim 2.1: Dorsal rafe çekirdeğinde bulunan serotonerjik nöronların dağılımı.....	10
Resim 2.2: Dorsal rafe çekirdeğinde bulunan serotonerjik nöronların immünohistokimyasal görüntüsü. ....	10
Resim 2.3: İnsan beyinde 5-HT1A reseptör dağılımı. ....	16
Resim 3.1: Yama kenetleme sistemi. ....	34
Resim 3.2: Mikroskop altında neutral red ile boyanmış DRN kesiti (A) ve DRN immünohistokimyasal boyama görüntüsü (B). ....	36
Resim 3.3: Dorsal rafe çekirdeği diseksiyonu. ....	39
Resim 3.4: Dorsal rafe çekirdeği beyin kesitlerinin elde edilmesi. ....	40
Resim 3.5: Serotonine duyarlı olan bir DRD nöronu ile mikrokapiller pipetin gigaseal pozisyonu (DIC mikroskop, 63x). ....	42
Resim 3.6: Yama kenetleme deneylerinde kullanılan perfüzyon sisteminin fotoğrafı...	45
Resim 3.7: Kuyruk asma testi, zorunlu yüzme testi ve açık alan testi örnekleri .....	50

## TABLO LİSTESİ

Tablo 2.1: Serotonin reseptörleri, beyinde buldukları bölgeler ve etki mekanizmaları .....	14
Tablo 2.2: Majör depresyon DSM-IV tanı kriterleri.....	18
Tablo 2.3: Moleküler yapılarına göre insanda bulunan potasyum iyon kanalları sınıflandırması .....	28
Tablo 3.1: Deney düzeneği grupları .....	33
Tablo 3.2: Deney grupları ve kimyasal madde uygulamaları .....	33
Tablo 3.3: Serotonine yanıt veren nöronlarda uygulanan deney düzenekleri.....	47
Tablo 4.1: DRD nöronlarının pasif zar özellikleri.....	55
Tablo 4.2: DRD nöronlarının aktif zar özellikleri .....	56
Tablo 4.3: DRD nöronlarında standart ve potasyumdan zengin yBOS solüsyonlarında I <sub>5-HT</sub> için ölçülen ters potansiyeller ve hesaplanan Nernst potansiyellerinin karşılaştırılması.....	61

## ÖZET

### FARE BEYNİNDE DORSAL RAFE ÇEKİRDEĞİ NÖRONLARINDA PİNDOLOLÜN SEROTONİN CEVABI ÜZERİNE ETKİSİ

Burak YAMAN

Doktora Tezi, Fizyoloji Anabilim Dalı  
**Tez Danışmanı:** Prof. Dr. Ramazan BAL  
13/11/2019, 101 sayfa

Majör depresyon gibi duygudurum bozukluklarının tedavisinde antidepresan ilaçlar etkilidir. Ancak kullanılmaya başlandığı ilk birkaç gün içerisinde serotonerjik dorsal rafe çekirdeği nöronlarında somatodendritik bölgede serotonin artışına yol açarak bu nöronların inhibisyonuna neden olmaktadır. Antidepresan ilaçlarla birlikte kullanıldığında pindololün bu inhibisyonu ortadan kaldıracabileceği geçmiş çalışmalarda raporlanmıştır. Bu çalışmada 28-34 günlük Balb/c ırkı fareler kullanılmıştır. *In vitro* yama kenetleme tekniği kullanılarak canlı dorsal rafe çekirdeği dorsal altçekirdeği (DRD) nöronlarından elektrofizyolojik kayıtlar elde edilmiştir. Yapılan deneylerde DRD nöronlarında serotonin (25µM) istirahat zar potansiyelinde  $14.3 \pm 3.14$  mV (n=9) hiperpolarizasyona ( $p < 0.05$ ) ve  $23,36 \pm 3,79$  pA (n=27) dışa doğru akıma neden olmuştur. Bu etki ayrı ayrı kinin (GIRK blokörü, 1mM), WAY-100135 (5-HT1A blokörü, 21 µM) ve pindolol (10µM) ön uygulaması ile inhibe edilmiştir. ( $p < 0.05$ ). 8-OHDPAT (5-HT1A agonisti, 30µM) serotonin benzeri dışa doğru akıma yol açmıştır ( $p > 0.05$ ) ve bu akım pindolol (10µM) ön uygulaması ile inhibe edilmiştir ( $p < 0.05$ ). *In vivo* davranış deneylerinde, kuyruk asma ve zorunlu yüzme testlerinde pindolol (15 mg/kg/gün) – venlafaksin (20 mg/kg/gün) kombinasyonu, lokomotor aktivitede değişikliğe yol açmadan kontrol grubuna göre immobilizasyon süresini istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşürmüştür ( $p < 0.05$ ). Venlafaksin ya da pindolol tek başına uygulandığında immobilizasyon süresini istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşürmemiştir ( $p > 0.05$ ). Bu çalışmada pindololün antidepresan ilaçların dorsal rafe çekirdeğinde yol açtığı serotonin artışından kaynaklanan inhibisyonu burada bulunan 5-HT1A otoresptörlerini inhibe ederek engelleyebilme potansiyeline sahip olduğu gösterilmiştir. Ayrıca pindololün venlafaksinle birlikte kullanıldığında antidepresan etki açısından venlafaksini potansiyalize edebildiği davranış deneyleriyle gösterilmiştir. Özellikle antidepresan tedaviye cevap vermeyen duygudurum bozukluklarının tedavisinde geri alım inhibitörü antidepresan ilaçlarla pindolol kombine edilerek antidepresan etkinliğin artması sağlanabilir.

**Anahtar Kelimeler:** Dorsal rafe çekirdeği, majör depresyon, pindolol, serotonin, yama kenetleme

## ABSTRACT

### EFFECT OF PINDOLOL ON SEROTONIN RESPONSE IN DORSAL RAPHE NUCLEUS NEURONS IN MICE BRAIN

Burak YAMAN

Ph. D. Thesis, Physiology Department

**Supervisor:** Prof. Dr. Ramazan BAL

13/11/2019, 101 pages

Antidepressants are effective in treatment of mood disorders like major depression. However, in the first few days of their usage, they lead to increase in serotonin level in the somatodendritic region of the serotonergic dorsal raphe nucleus (DRN) neurons, inhibiting the serotonergic neurons locally. Pindolol may eliminate this inhibition when used in combination with antidepressants. In this research, Balb/c mice, 28-34 days-old, were used. Electrophysiological recordings from the neurons in the dorsal subnucleus of the dorsal raphe were obtained by using the patch clamp technique. Serotonin application (25 $\mu$ M) resulted in  $14.3 \pm 3.14$  mV (n = 9) hyperpolarization (p<0.05) of resting membrane potential and induced an outward current by  $23.36 \pm 3.79$  pA (n = 27). This effect was inhibited by pre-administration of quinine (GIRK blocker, 1mM), WAY-100135 (5-HT<sub>1A</sub> blocker, 21  $\mu$ M) and pindolol (10 $\mu$ M) separately. (P<0.05). 8-OHDPAT (5-HT<sub>1A</sub> agonist, 30 $\mu$ M) induced a serotonin-like outward flow (p>0.05), which was inhibited by pre-administration of pindolol (10 $\mu$ M) (p<0.05). Besides, combination of venlafaxine (20 mg/kg/day) and pindolol (15 mg/kg/day) significantly reduced immobilization time compared to the control group in tail suspension test and forced swimming test (p<0.05) without any change in locomotor activity. Venlafaxine or pindolol alone did not significantly reduce immobilization time (p>0.05). In conclusion, pindolol, which blocks somatodendritic 5-HT<sub>1A</sub> receptors, has the potential to prevent the inhibition of serotonergic neurons resulting from increased serotonin levels in the DRN after antidepressant use. Hence, pindolol can potentiate antidepressant effect of venlafaxine. In the mood disorders that do not respond to antidepressant treatment, pindolol is likely to increase the effectiveness of antidepressant drugs when given in combination.

**Key Words:** Dorsal raphe nucleus, major depression, patch clamp, pindolol, serotonin

# 1. GİRİŞ VE AMAÇ

Monoamin grubu nörotransmitterlerden olan serotonin, santral sinir sisteminde (SSS), sindirim sisteminde ve kanın pıhtılaşmasından sorumlu olan trombositlerde bulunur. Santral sinir sisteminde duygudurum, iştah, uyku ve hafıza gibi önemli fonksiyonlardan sorumludur (1,2). Sindirim sisteminde gastrointestinal motiliteyi artırıcı etkisi bulunmaktadır. Trombositlerde ise vazokonstriktör etkisi ile kan pıhtılaşmasına yardımcı olur. Serotonin, santral sinir sisteminde beyin sapında bulunan rafe çekirdeklerindeki serotonerjik nöronlarda triptofan aminoasidinden triptofan hidroksilaz enzimi ile sentezlenir ve monoamin oksidaz (MAO) enzimleri ile yıkılır. Santral sinir sisteminde serotonin düzeyi ve işlevindeki bozukluklar majör depresyon (MD), anksiyete bozukluğu, obsesif kompulsif bozukluk, şizofreni gibi psikiyatrik hastalıkların fizyopatolojisi ile ilişkilendirilmiştir (1). Bu psikiyatrik hastalıkların yanı sıra inme, hipertansiyon, migren gibi nörolojik hastalıkların da gelişmesinde serotonin etkilidir. Santral sinir sisteminde alt tiplerle birlikte toplamda 14 adet serotonin reseptörü tipi bulunmaktadır. Bunlar 5HT-1A, 5HT-1B, 5HT-1D, 5HT-1E, 5HT-1F, 5HT-2A, 5HT-2B, 5HT-2C, 5HT-3, 5HT-4, 5HT-5A, 5HT-5B, 5HT-6 ve 5HT-7 reseptörleridir. 5-HT1A reseptörü serotonerjik sistemin korteks ve subkortikal alan sonlanmalarındaki postsinaptik nöronlarda bulunmakla birlikte, serotoninin sentezlendiği rafe çekirdeği nöronlarında da somatodendritik otoreseptörler olarak bulunmaktadır.

Psikiyatrik hastalıklar içerisinde MD toplumda en yaygın görülenler arasındadır (3). Bölgesel olarak değişmekle birlikte toplumun yaklaşık olarak %15'inde görülen, toplumda iş gücü kaybına yol açabilen, keyif alamamaktan (anhedoni) öz kısıma (suisid girişim) kadar geniş bir skalada semptomları bulunabilen bir nöropsikiyatrik hastalıktır. Etiyolojisinde serotonin ve noradrenalin nörotransmitterlerinin sinaptik kavşakta yetersiz ya da dengesiz salımları etkilidir. Günümüzde sinaptik kavşaktaki serotonin ve noradrenalin miktarını arttırmayı hedefleyen çeşitli tedavi stratejileri geliştirilmiş olmakla birlikte; kullanılan ilaçlar ancak 3 - 6 hafta arasında etkili olabilmektedir (4) ve çeşitli doza bağımlı yan etkileri bulunmaktadır. Bu problemde hareketle asıl endikasyonu hipertansiyon olan pindololün (non-selektif beta blokör) selektif serotonin reuptake inhibitörleri (SSRI) veya serotonin noradrenalin reuptake inhibitörü (SNRI) antidepresan ilaçlarla birlikte kullanıldığında bu ilaçları potansiyalize edebileceğine dair



araştırmalar mevcuttur (5–7). MD hastalarında yapılan klinik bir çalışmada dirençli olmayan depresyon hastalarında sitalopramın (SSRI) pindololle birlikte daha güçlü antidepresan etki gösterdiği sonucuna varılmıştır (8). Yine bir başka klinik çalışmada özellikle yavaş metabolize edici depresyon hastalarında pindolol ile birlikte kullanıldığında venlafaksin (SNRI) daha güçlü antidepresan etki gösterdiği saptanmıştır (9).

SNRI ve SSRI grubu antidepresan ilaçlar serotonin transporter (SERT) proteinlerini inhibe ederek nörosinaptik kavşaktan serotonin geri alımını inhibe ederler ve bu durum nörosinaptik kavşakta serotonin miktarının artmasıyla sonuçlanır. Ancak bu artış dorsal rafe ekirdek (DRN) nöronlarının somatodendritik bölgelerinde de ortaya çıkar ve serotonerjik nöronların DRN bölgesindeki somalarında bulunan inhibitör 5-HT1A otoreseptörlerini aktive eder. Bunun sonucu olarak beyindeki kortikal ve subkortikal bölgelere serotonin salınımı azalır. Bu durum antidepresan ilaçların etkilerinin hem geç başlamasının hem de daha yüksek dozlarına ihtiyaç duyulmasının temel nedenidir. Postsinaptik reseptörler bloke edilmeden burada bulunan 5-HT1A reseptörleri bloke edilebilirse antidepresan ilaçların etkinliği arttırılabilecektir. Yapılan hayvan çalışmalarında pindololün bu işlevi gösterebileceğine dair bulgular elde edilmiştir (5,7).

Bu tezde yapılan *in vitro* yama kenetleme çalışmalarının amacı; Balb/c ırkı farelerde serotoninin dorsal rafe çekirdeği nöronlarında istirahat zar potansiyeli ve zar akımları üzerine olan etkisini araştırmak, ortaya çıkan etkiye neden olan serotonin reseptörünü belirlemek, bu etkide rol oynayan iyonu ve iyon kanalının biyofiziksel ve farmakolojik özelliklerini karakterize etmektir. Bu etki mekanizması ortaya konduktan sonra ise pindololün bu mekanizmanın işleyişi üzerine yaptığı manipülasyonun antidepresan kullanımını sonucu dorsal rafe çekirdeğinde artan serotonin miktarından kaynaklanan nöronların inhibisyonunu engelleyebilme kapasitesini araştırmak ve bunun mekanizmasını ortaya koymaktır. Yapılan *in vivo* davranış deneylerinin amacı ise pindololün antidepresanlarla birlikte kullanıldığında antidepresan etkinliğinin nasıl olacağının hayvan deneyleriyle gösterilebilmesidir.

Elektrofizyolojik tekniklerle SSS'deki nöronların elektriksel aktiviteleri llebilme ve bu sayede beynin nörokimyasal yapısı ve beyinde bulunan bir takım işlevsel yolaklar hakkında fikir sahibi olunabilmektedir. İlk defa Hodgkin ve Huxley

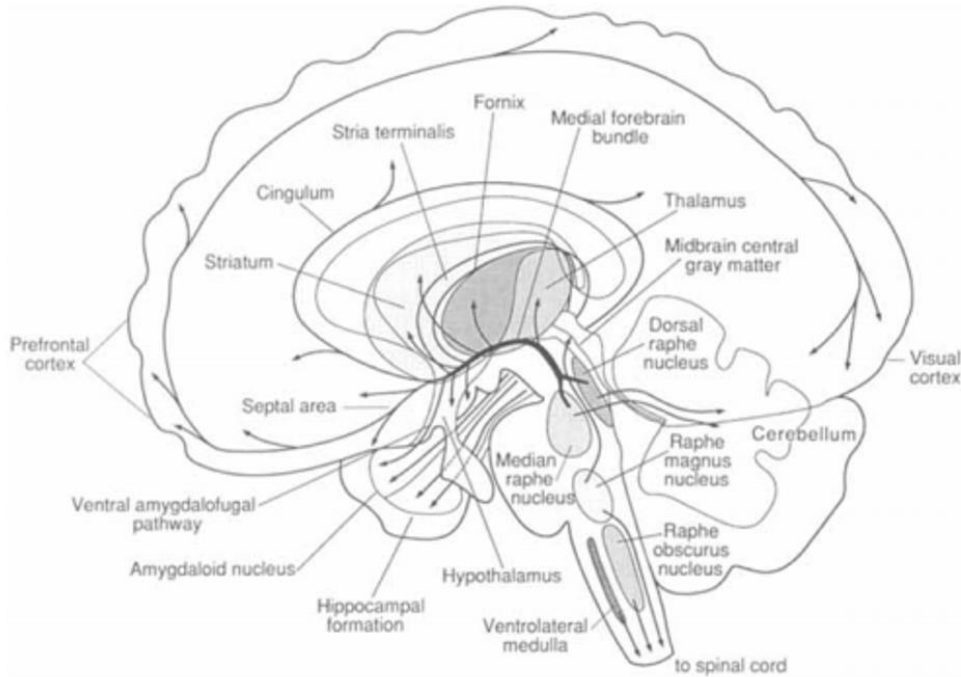
mürekkep balığı aksonunda oluşan elektriksel aktiviteyi ölçerek elektrofizyoloji tekniğinin ortaya çıkmasını sağlamıştır. Hücre içi elektrofizyoloji çalışmaları hücre içindeki ve hücre dışındaki sıvı ortama birer mikro elektrot yerleştirerek iki ortam arasındaki potansiyel farkın ve elektriksel akımın ölçümü esasına dayanmaktadır. Bu ölçümü gerçekleştirebilmek için yama kenetleme tekniği kullanılmaktadır. Yama kenetleme tekniğinde cam mikro elektrot hücre zarına değdirilir ve vakum uygulanarak buraya yapışması sağlanır. Ardından farklı konfigürasyonlarda hücrenin elektrofizyolojik parametreleri ölçülür.

Bu çalışmada, DRN bölgesindeki nöronlar üzerine serotoninin etkisi araştırılırken öncelikle akım kenetleme deneylerinde serotoninin istirahat zar potansiyeli üzerinde yaptığı değişiklikler belirlendi. Bu değişikliklerin hangi zar akımlarından kaynaklandığını bulmak amacıyla voltaj kenetleme deneyleri uygulandı. Ortaya çıkan zar akımına sebep olan iyon ve bu iyonun kanalı araştırılırken çeşitli voltaj kenetleme protokolleri ve G protein kenetli içe doğru düzeltici potasyum kanalı (GIRK) blokörü kinin kullanıldı. İkinci aşamada serotoninin bu hücrelerde etkisini hangi serotonin reseptörü ile gerçekleştirdiği sorusuna spesifik 5-HT1A reseptör blokörü WAY-100135 ve spesifik 5-HT1A reseptör agonisti 8-OHDPAT kullanılarak cevap arandı. Son olarak da pindololün serotonin akımına ve 8-OHDPAT akımına olan etkisi incelenerek antidepresan ilaçlar üzerinde potansiyalize edici etkisinin nedenleri araştırıldı. Bu bölgedeki nöronlara serotonin uygulamasının bir amacı da antidepresan ilaçların uygulaması sırasında bölgede ortaya çıkan serotonin artışının *in vitro* intrasellüler elektrofizyolojik deney ortamında imitasyonunun sağlanmasıydı. Bu sayede pindololün antidepresan ilaçlarla bir arada kullanıldığında ortaya çıkaracağı etkinin varlığı ve bu etkinin şiddeti ortaya konulabilecekti. Bu araştırmada, pindololün DRN çekirdeğinin dorsal altçekirdek (DRD) nöronlarının serotonin cevabına etkisi araştırılarak pindolol ile SNRI ilaçlar arasındaki potansiyalize edici etkinin mekanizmasının ortaya konmasına çalışılmıştır. Ayrıca davranış deneyleriyle de pindololün, venlafaksin antidepresan etkisini potansiyalize etme kapasitesi araştırılmıştır. Literatürde pindololün 8-OHDPAT kaynaklı 5-HT1A reseptör aktivasyonu üzerine etkisi voltaj kenetleme şartlarında daha önce araştırılmamıştır. Ayrıca daha önce pindololün antidepresan etki açısından venlafaksini potansiyalize edici etkisi de davranış deneyleriyle araştırılmamıştır. Araştırmamız bu yönleriyle özgün niteliğe sahiptir.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Rafe çekirdekleri

Serotonin SSS'de beyin sapında bulunan rafe çekirdeklerinde (Raphé nuclei) yer alan serotonerjik nöronlarda sentezlenmektedir. Rafe çekirdekleri beyin sapının medulla, pons ve mezensefalon bölümlerinde bulunmaktadır (Şekil 2.1). Bu çekirdekler beyin sapında buldukları seviyeye göre temelde rostral ve kaudal olmak üzere ikiye ayrılmıştır. Rostral rafe çekirdekleri; dorsal rafe çekirdeği (dorsal raphe nucleus), medyan rafe çekirdeği (median raphe nucleus) ve kaudal lineer çekirdek'ten (caudal linear nucleus) oluşmaktadır. Kaudal rafe çekirdekleri ise rafe obskurus çekirdeği (nucleus raphe obscurus), rafe pallidus çekirdeği (nucleus raphe pallidus), rafe magnus çekirdeği (nucleus raphe magnus) ve lateral retiküler formasyondan oluşur. Rostral rafe çekirdekleri üst düzey beyin bölgelerine; kaudal rafe çekirdekleri ise beyin sapı ve omuriliğe serotonerjik uyarı gönderilmesinden sorumludur (10,11).



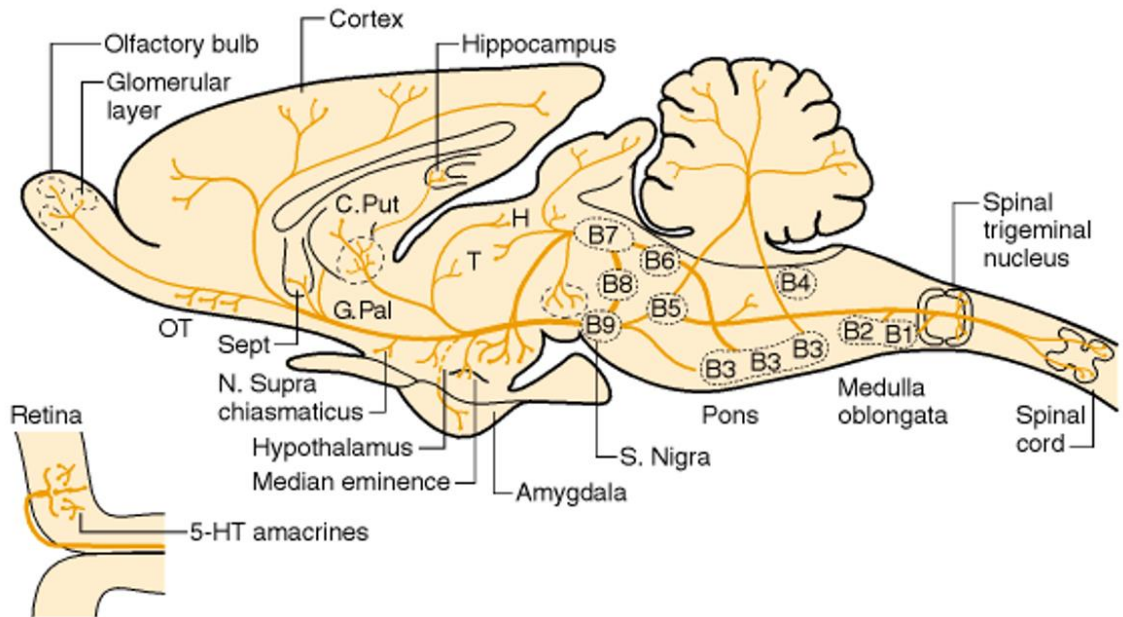
Şekil 2.1: İnsanda beyin sapı boyunca bulunan rafe çekirdekleri (11).

### Dorsal rafe çekirdeği

Dorsal rafe çekirdeği rafe çekirdekleri içinde en fazla serotonerjik nöron bulunduran çekirdektir. Dorsal rafe çekirdeği insanlarda  $66 \pm 9 \text{ mm}^3$  büyüklüğünde olup (12) yaklaşık 160.000 adet serotonerjik nöron bulundurmaktadır. Kedilerde bu sayı 24.000 civarındadır

(12). Serotonin sentezleyen nöron gövdeleri beyin sapı boyunca dokuz ana gruba ayrılmıştır (Şekil 2.2). B1- B4 kaudal medulladan ponsun ortasına kadar olan bölgede yer almaktadır. B6 ve B7 birlikte dorsal rafe çekirdeğini oluşturmaktadırlar. B8 ise median rafe çekirdeğini oluşturmaktadır. B9 mezensefalonda yer almaktadır.

DRN orta beynin periakuaduktal gri cevherinin ön kısmında konumlanmıştır. Bununla birlikte kaudal kısmı rostral ponsun periakuaduktal gri cevherine kadar uzanmaktadır. Çekirdekte bulunan nöronların büyüklüğü insanda  $353 \pm 12 \mu\text{m}^2$ 'dir (12). Küçük nöronlar orta hat boyunca bulunurken büyük nöronlar dorsolateral kısımlarda yoğunluk göstermektedir. Dorsal rafe çekirdeği dorsal, ventral, kaudal ve interfasiolar olmak üzere dört alt çekirdeğe ayrılmıştır. Dorsal altçekirdek, dorsal rafe çekirdeğinin en büyük serotonerjik nöronlarını barındırır. İnterfasiolar kısım, iğ şeklinde hücrelerden oluşmuştur ve burada hücre yoğunluğu yüksektir. Ventral alt grup, bipolar ve multipolar olan az organize hücre kümesinden oluşmaktadır. Kaudal altçekirdek, DRN'nin kuyruk kısmını oluşturur ve trigeminal sinirin motor çekirdeğine kadar uzanmaktadır (11).



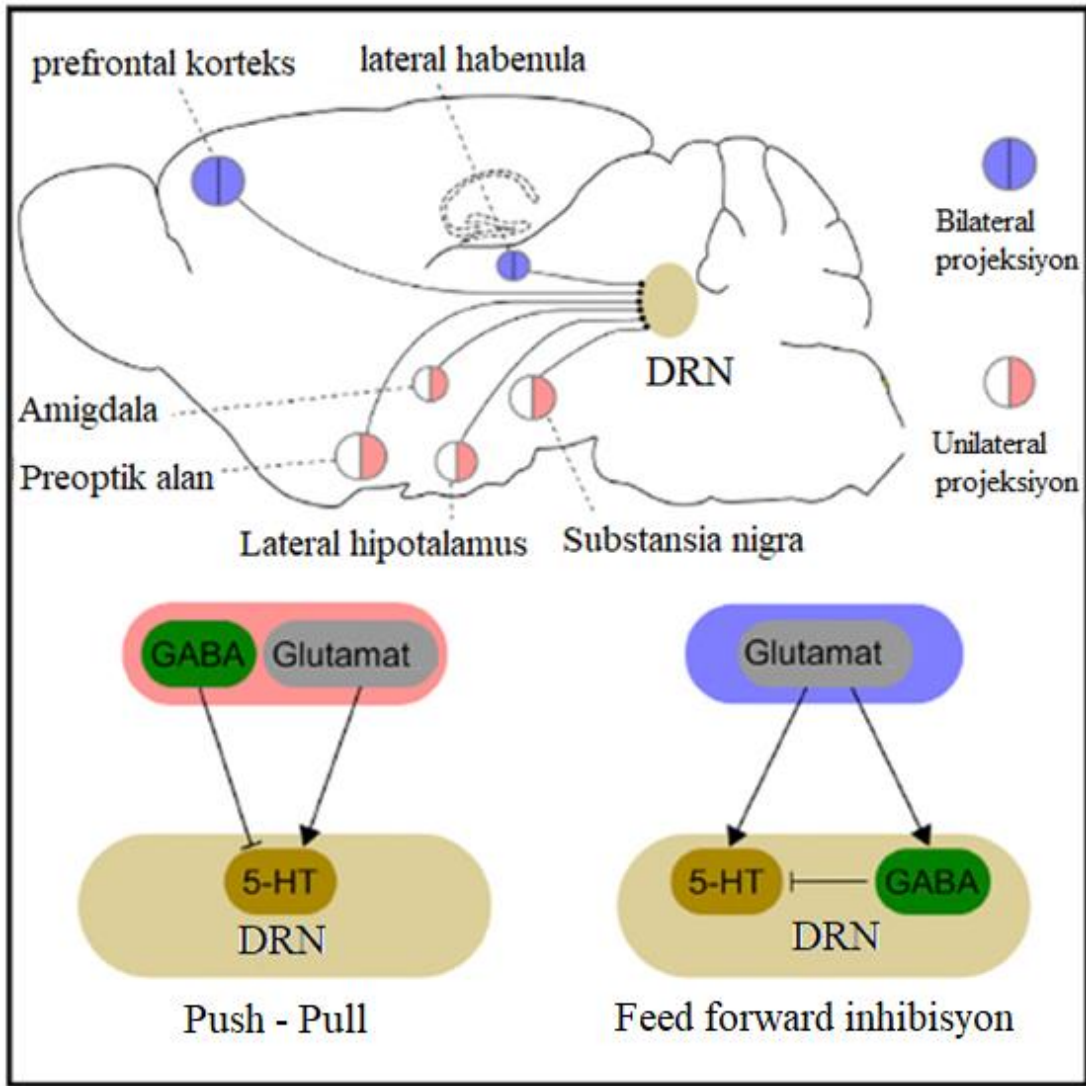
Şekil 2.2: Sıçan beyininde bulunan serotonerjik nöron grupları ve projeksiyonları (13).

Rostral rafe çekirdeklerinden üst düzey beyin bölgelerine giden yollar diensefalona katılarak ikiye ayrılır. Birisi internal kapsül boyunca ilerleyip lateral serebral kortekste sonlanır. İkincisi ise medyal ön beyin demeti boyunca ilerleyip hipotalamus, bazal ön beyin, amigdala, hipokampus ve medyal serebral kortekste sonlanır.

Kaudal rafe çekirdeklerinden çıkan yollar ise beyin sapındaki somatik ve viseral motor çekirdeklerde ve lateral retiküler formasyonda sonlanırken, omurilikte iki paralel yol boyunca devam ederler. Bunlar dorsolateral ve ventromedyal yolaklardır (10,14). Omuriliğe giden serotonerjik uyarılar omurilik ara nöronlarında enkefalin salgılanmasına neden olarak ağrı iletimini inhibe ederler.

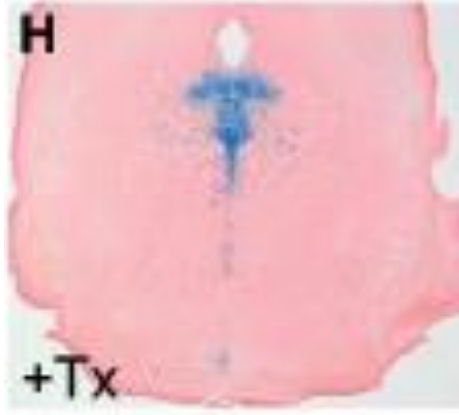
Dorsal rafe çekirdeğinden çıkan aksonlar serebral korteksin hemen hemen her tabakasına ve bölgesine dağılmakla birlikte en çok primer sensorial bölgelerde ve IV. tabakada yoğunlaşmıştır (10,15). Üst düzey beyin bölgelerine giden bu uyarılar duygudurum, iştah, uyku ve hafızada önemli rol oynamaktadır (16). Dorsal rafe çekirdeğinden hipokampus ve limbik sistemin diğer bölümlerine giden serotonerjik uyarılar duygudurumunun düzenlenmesinde, MD ve anksiyete bozuklukları gibi nevrotik hastalıkların fizyopatolojisinde önemli rol almaktadır (7).

Dorsal rafe çekirdeği üst düzey beyin bölgelerine projeksiyon göndermekle birlikte buralardan inputlar da almaktadır. Medyal prefrontal korteks ve lateral habenuladan çift taraflı (bilateral); amigdala, preoptik alan, substansia nigra ve lateral hipotalamustan ise tek taraflı (unilateral) inputlar alır (17,18). GABA ve glutamat nörotransmitterleri ile taşınan bu inputlar “bas-çek (push-pull)” ve “ileri besleme (feed forward) inhibisyon” gibi mekanizmalarla DRN serotonerjik nöronlarından serotonin salınımının düzenlenmesini sağlamaktadırlar. Bu mekanizmalar Şekil 2.3’te gösterilmiştir. Bas-çek mekanizmasında serotonerjik DRN nöronları üst düzey beyin bölgelerinde bulunan glutamaterjik nöronlarla AMPA reseptörleri aracılığıyla uyarılırken GABAerjik nöronlarla GABA<sub>A</sub> reseptörü aracılığıyla inhibe edilerek ateşleme frekansı ve uyarılabilirliğinin dengede kalması sağlanır. İleri besleme mekanizmasında ise glutamaterjik inputlar DRN’de bulunan hem serotonerjik nöronları hem de GABAerjik nöronları uyarır. Glutamat ile uyarılmış olan GABAerjik nöronlar ise buradaki serotonerjik nöronları GABA<sub>A</sub> reseptörleri aracılığıyla inhibe ederler. Her iki mekanizmayla da serotonerjik nöronların glutamat ile aktive edilirken GABA ile inhibe edilerek dengeli bir şekilde aktivite göstermesi sağlanmış olur.



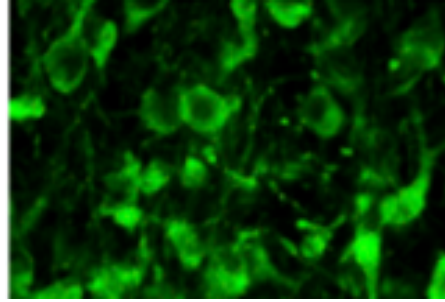
Şekil 2.3: Üst düzey beyin bölgelerinden dorsal rafe çekirdeği serotonerjik nöronları üzerine gelen GABAerjik ve glutamaterjik inputlar (17).

DRN nöronları temel olarak serotonerjik, GABAerjik ve glutamaterjik olarak sınıflandırılmakla birlikte dopamin, nitrik oksit (NO), somatostatin, nöropeptit Y, büyüme hormonu ve gastrin içeren nöronlar da dorsal rafe çekirdeğinde karakterize edilmiştir (19). Serotonerjik nöronların; serotoninin yanı sıra aynı zamanda kortikotropin salıcı hormon (CRF), tirotropin salıcı hormon (TRH), P maddesi, galanin gibi nörotransmitterlerin de salınımını gerçekleştirebildiği rapor edilmiştir (20). Dorsal rafe çekirdeğinde serotonerjik nöronların sayısı glutamaterjik ve GABAerjik nöronlara göre belirgin olarak fazladır. Dorsal rafe çekirdeğinde bulunan serotonerjik nöronların dağılımı Resim 2.1’de gösterilmiştir.



Resim 2.1: Dorsal rafe çekirdeğinde bulunan serotonerjik nöronların dağılımı. Tamoxifen verilen fare beyninden koronal ekseninde alınan kesitte yapılan X-Gal boyama sonucu akuaduktusun önünde dorsal rafe çekirdeği serotonerjik nöronları mavi renkli olarak görülmektedir (21).

Serotonin L-triptofan'ın triptofan hidroksilaz-2 enzimiyle hidroksillenmesi ile sentezlendiğinden, serotonerjik nöronlar bol miktarda triptofan hidroksilaz içermektedirler. Bu nedenle Resim 2.2'de görüldüğü gibi bu enzime yönelik immünohistokimyasal boyama yapılarak serotonerjik nöronlar görüntülenebilirler. Sıçanlarda dorsal rafe çekirdeğinde yapılan bir immünohistokimya çalışmasında boyama yapılan nöronların %67'sinde (n=33) serotonin bulunduğu saptanırken (serotonerjik) %33'ünde serotonin bulunmadığı (n=16) saptanmıştır (22).



Resim 2.2: Dorsal rafe çekirdeğinde bulunan serotonerjik nöronların immünohistokimyasal görüntüsü. Triptofan Hidrosilaz 2 enzimi bulunduran (serotonerjik) dorsal rafe çekirdeği nöronları görülmektedir (23).

DRN'de bulunan serotonerjik nöronlar şekilleri bakımından 3 sınıfa ayrılırlar. Sınıf 1 nöronların mekik şeklinde somaları vardır ve çok sayıda sinaps çıkıntıları (spiny) bulunur. Sınıf 2 nöronlar geniş multipolar tip bir soma yapısına sahiptir ve çok sayıda sinaps çıkıntıları bulunur. Sınıf 3 nöronların ise oval ya da armut (piriform) şeklinde hücre gövdeleri bulunurken, sinaps çıkıntıları bulunmaz (20).

Serotonerjik nöronların uyarıldıklarında aksonal terminallerinin yanı sıra somatodendritik bölgelerinde de serotonin miktarı artmaktadır (16). Somatodendritik bölgelerde serotoninin seviyesinin artmasının nedeninin, hücre kültüründe tekrarlayan kollateraller ya da çapraz bağlantılar olduğu belirtilmiştir (16). Ancak rafe çekirdeklerinde bu sözü edilen serotonin terminalleri henüz gösterilememiştir (16, 24). Bununla birlikte serotonin salınımının göstergesi olan basson proteini konfokal mikroskop altında immünohistokimya tekniği kullanılarak aksonal terminallerle birlikte hücre gövdesinde de gösterilmiştir. Bu bulgu fare embriyonik kök hücre kültürü ortamında somatodendritik 5-HT salınımı olarak yorumlanmıştır (16,25). Sonuç olarak somatodendritik serotonin artışının kaynağı direkt somatodendritik serotonin salınımından ya da komşu rafe çekirdeklerinin kollateral terminallerinden veya çapraz bağlantılardan kaynaklanıyor olabilir (16). Ayrıca canlı sıçan beyin kesitlerinde immüno floresan mikroskopi ve elektron mikroskobu kullanılarak yapılan bir çalışmada ilk defa serotonerjik DRN nöronlarında veziküler monoamin taşıyıcısı (VMAT2) varlığı gösterilmiştir (26). VMAT2, veziküllerde serotoninin toplanmasına imkan sağlayan bir proteindir. Bu bulgu, somatodendritik bölgede veziküler serotonin salınımının olabileceği şeklinde yorumlanmıştır (26).

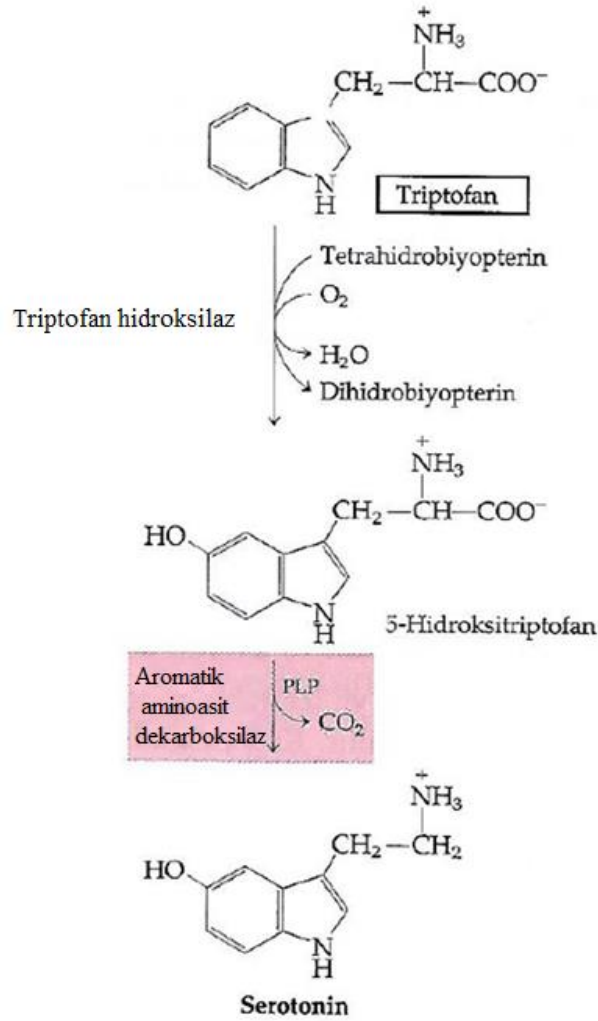
## **2.2. Serotonin**

Serotonin yaklaşık 70 yıl önce ilk defa kanda vazokonstriktör madde olarak tanımlanmıştır (27). Memeli hayvanlarda SSS, sindirim sistemi ve kanın pıhtılaşmasından sorumlu olan trombositlerde bulunmaktadır. Toplam serotoninin %95'i sindirim sisteminde enterokromafin (ECL) hücrelerden sentezlenir (Şekil 2.4), bunun bir miktarı kan dolaşımına girer ve ardından trombositlerde depo edilir. Sindirim sisteminde gastrointestinal motiliteyi arttırıcı etkisi bulunmaktadır. Trombositlerde ise vazokonstriktör etkisi ile kan pıhtılaşmasına yardımcı olur. Serotoninin % 5'i ise SSS'de sentezlenmekte olup burada duygudurum, iştah, uyku ve hafıza gibi serebral fonksiyonların düzenlenmesinden sorumludur (2,16).

Serotoninin öncül maddesi triptofan aminoasididir. Kimyasal yapısı itibarıyla beşinci karbon atomunda hidroksil grubu (OH<sup>-</sup>) bulundurduğu için 5-Hidroksitriptamin (5-HT) adını da almaktadır. SSS'de serotonin sentezinin hız kısıtlayıcı basamağı triptofan hidroksilaz 2 enzimidir ve bu enzim rafe çekirdeklerinde bulunan serotonerjik nöronlarda



spesifik olarak bulunur (28–30). Serotoninin yıkımı ise monoamin oksidaz enzimi ile gerçekleşmektedir.



Şekil 2.4: Serotonin sentez basamakları (31).

### 2.3. Serotonin reseptörleri

Serotonin reseptörleriyle ilgili ilk çalışmalar izole Gine domuzu ileumunda serotonine kontraksiyon cevabının elde edildiği araştırmalara dayanır. Bu çalışmalarda serotonin reseptörleri D ve M reseptörü olarak sınıflandırılmıştır. Daha sonra bu reseptörler radyoligand bağ ölçümü tekniği ile yapılan çalışmalarda 5-HT 1 ve 2 olarak sınıflandırılmıştır. Bradley ve arkadaşları 1980'lerde farmakolojik ve fonksiyonel kıstaslara dayanarak 3 adet serotonin reseptör tipi tanımlamıştır. Moleküler biyolojik tekniklerin geliştirilmesiyle birlikte serotonin reseptör alt tiplerinin sayısı daha da artmış ve fonksiyonları hakkında daha fazla bilgi elde edilmiştir (32).

Serotonin reseptörleri 7 ana gruptan oluşmaktadır. Bunlar 5HT-1 (5HT-1A, 5HT-1B, 5HT-1D, 5HT-1E, 5HT-1F), 5HT-2 (5HT-2A, 5HT-2B, 5HT-2C,) 5HT-3, 5HT-4, 5HT-5 (5HT-5A, 5HT-5B), 5HT-6 ve 5HT-7 reseptörleridir. Altıptilerle birlikte toplamda 14 adet serotonin reseptör tipi bulunmaktadır (33). Bu reseptörlerden sadece 5HT-3 ligand bağımlı iyon kanalıdır. Diğer tüm reseptörler G proteini kenetli reseptörlerdir (GPCR) ve etkilerini hücre içinde ikincil haberci mekanizmalarını kullanarak gösterirler. Tablo 2.1’de serotonin reseptörlerinin beyinde bulunduğu bölgeler ve etki mekanizmaları verilmiştir. 5-HT1A reseptörleri potasyum kanallarının açılmasını sağlayarak hücrede hiperpolarizasyona neden olur. 5-HT2A reseptörleri potasyum kanallarının kapanmasına yol açarak hücrede depolarizasyonu tetikler. 5-HT3 reseptörleri serotonin kapılı katyon kanallarıdır ve uyarıldıklarında hücre içine katyon girişini sağlayarak hücrenin hızlı depolarizasyonuna yol açarlar. 5-HT4, 5-HT5, 5-HT6 ve 5-HT7 reseptörleri etkilerini hücre içinde adenilat siklaz enzimi aktivitesini değiştirerek gösterirler.

Tablo 2.1: Serotonin reseptörleri, beyinde buldukları bölgeler ve etki mekanizmaları (32)

Serotonin reseptörü	Bulduğu bölge	Etki mekanizması
5-HT <sub>1A</sub>	Rafe çekirdekleri, hipokampus, hipotalamus, amigdala, septum, entorinal korteks	Potasyum kanalı aktivasyonu, Adenilat siklaz inhibisyonu
5-HT <sub>1B</sub>	Bazal ganglionlar ve serotonerjik nöronların presinaptik terminalleri	Adenilat siklaz inhibisyonu
5-HT <sub>1D</sub>	Substansia nigra, bazal gangliyonlar, superior kollikulus	Adenilat siklaz inhibisyonu
5-HT <sub>1E</sub>	Frontal korteks, olfaktör bulbus, hipokampus	Adenilat siklaz inhibisyonu
5-HT <sub>1F</sub>	Serebral korteks, striatum, hipokampus, bulbus olfaktorius	Adenilat siklaz inhibisyonu
5-HT <sub>2A</sub>	Serebral korteks, klastrum, olfaktör tüberkül, striatum, Akkumbens çekirdeği	Fosfolipaz C aktivasyonu, K <sup>+</sup> kanallarının kapanması
5-HT <sub>2B</sub>	Rafe çekirdeklerinde serotonerjik nöronlarda	Fosfolipaz C aktivasyonu
5-HT <sub>2C</sub>	Koroid pleksus, globus pallidus, serebral korteks, hipotalamus, septum, substansia nigra, medulla spinalis	Fosfolipaz C aktivasyonu
5-HT <sub>3</sub>	Hipokampus, entorinal korteks, amigdala, akkumbens çekirdeği, traktus solitarius çekirdeği, 5.kraniyal sinir, 10. kraniyal sinirin dorsal motor çekirdeği, area postrema, medulla spinalis	Ligand bağımlı iyon kanalı
5-HT <sub>4</sub>	Hipokampus, striatum, olfaktör tüberkül, substansia nigra	Adenilat siklaz aktivasyonu
5-HT <sub>5A</sub>	Hipokampus, prefrontal korteks	Adenilat siklaz inhibisyonu
5-HT <sub>5B</sub>	İnsanda bulunmaz	?
5-HT <sub>6</sub>	Olfaktör tüberkül, akkumbens çekirdeği, serebral korteks, striatum, hipokampus, kaudat çekirdek	Adenilat siklaz aktivasyonu
5-HT <sub>7</sub>	Serebral korteks, septum, talamus, hipotalamus, amigdala, superior kollikulus	Adenilat siklaz aktivasyonu

## **G proteini kenetli reseptörler (GPCR)**

G proteini kenetli reseptörler sadece ökaryot hücrelerde bulunur. Sahip oldukları protein yapısı hücre zarını yedi kere kat ettiğinden dolayı “7 transmembran reseptör” olarak da isimlendirilirler. Bu durum G proteini kenetli reseptörlere has bir özelliktir. Transmembran proteinde hücrenin dış yüzüne ligand bağlanırken iç yüzünde G proteini bulunur ve bu protein alfa, beta ve gama olmak üzere üç alt birimden oluşmaktadır. G proteini alfa ve gama alt birimi lipid çapa (lipid raft) ile hücre zarına bağlıdır.

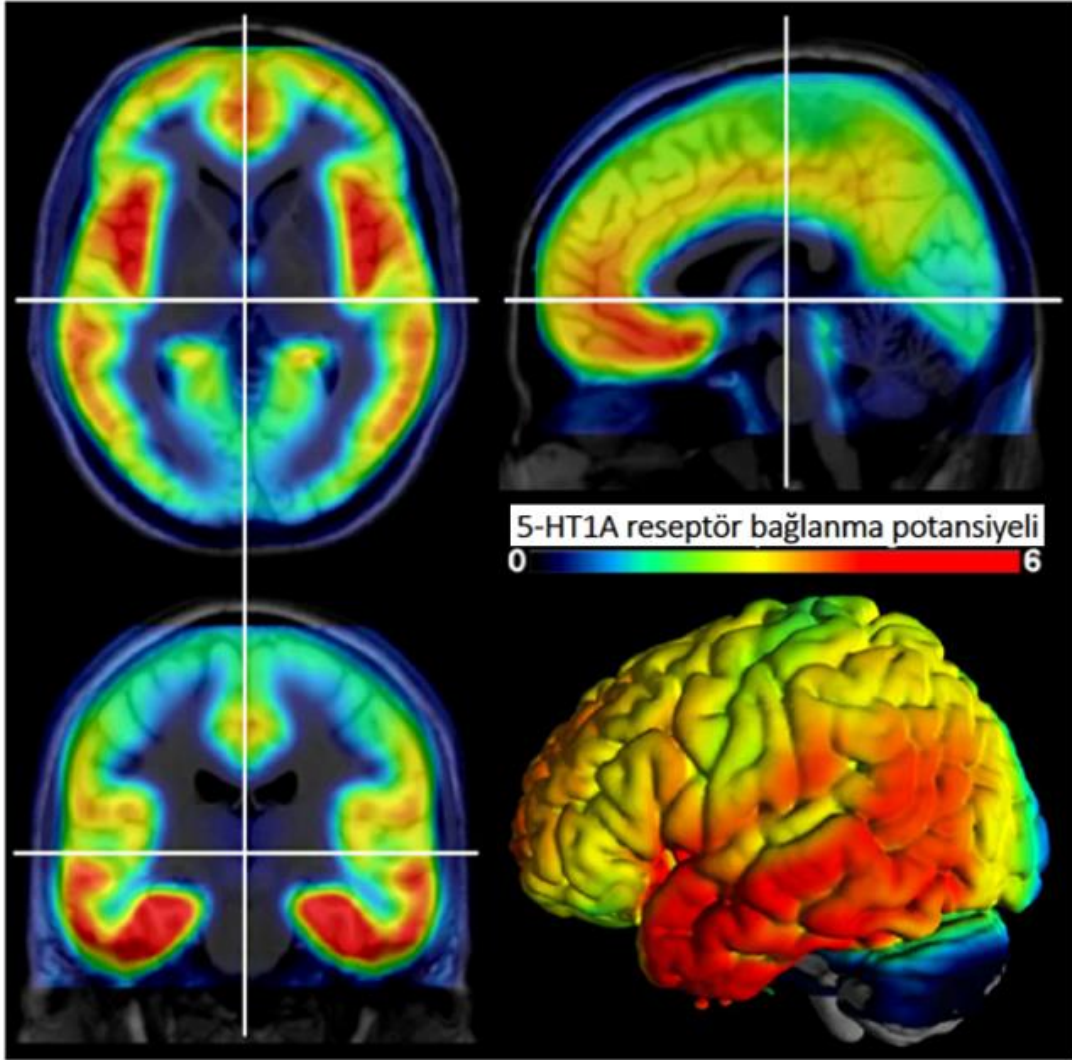
Serotonerjik sistemde önemli yer alan 5-HT1A reseptörleri bu grup içerisinde yer almaktadır. Serotoninin reseptöre bağlanması üzerine G proteini beta ve gama altbirimi alfa altbiriminden ayrılır ve G proteini kenetli içe doğru düzeltici (inward rectifier) potasyum kanallarının (GIRK) açılmasına neden olur. İstirahat zar potansiyelinde bulunan DRN nöronları, bu kanalların açılmasıyla hücre içinden hücre dışına doğru potasyum iyon çıkışı sonucu hiperpolarize olur (16).

## **5-HT1A reseptörü**

5-HT1A reseptörleri SSS’de birçok bölgede nöronlarda presinaptik ve postsinaptik olarak bulunabilmektedir (Resim 2.3). Presinaptik olarak dorsal ve medyan rafe çekirdeklerinde bulunur (34). Postsinaptik reseptörler olarak ise, hipokampusun piramidal GABAerjik ve granüler hücrelerinde, septum, hipotalamus, amigdala, kortikal piramidal nöronlarda ve entorinal kortekste bulunmaktadır. Ayrıca bu reseptörler astrositlerde ve diğer glial hücrelerde de bulunmaktadır. Bu hücrelerde bulunan reseptörlerin duygudurumunun düzenlenmesinde etkili olduğu düşünülmektedir (35).

Rafe çekirdeklerinden çıkan serotonerjik uyarılar duygudurumu, stres reaktivitesi ve uykunun düzenlenmesinde önemli rol alırken, MD ve anksiyete bozuklukları gibi nöropsikiyatrik hastalıkların gelişmesinden sorumlu tutulmaktadır. Postsinaptik 5-HT1A reseptörleri duygudurum ile ilişkili olan kortikolimbik bölgelerde yoğun olarak bulunduğu için dolayı bu tip hastalıkların gelişmesinde oldukça önemlidir (36–40). 5-HT1A reseptörleri ayrıca rafe çekirdeklerinde somatodendritik otoreseptörler olarak bulunmaktadır. (41–43). Serotonerjik nöronlarda bulunan bu reseptörlerin aktivasyonu serotonin sentezinin inhibe olmasına neden olmaktadır. Bu nedenle bu reseptörler antidepresan tedavisi uygulanan hastalarda ilaç cevabının gecikmesinden sorumlu

tutulmaktadır (42–50). Ayrıca 5-HT1A otoreseptörlerinin artmış gen ifadenmesi MD ve kronik SSRI direnci ile ilişkilendirilmiştir (51).



Resim 2.3: İnsan beyninde 5-HT1A reseptör dağılımı. Sağlıklı bireylerden elde edilen ve [Carbonyl-<sup>11</sup>C]-WAY-100635 radyoligandı kullanılarak ölçülen PET görüntülerinde 5-HT1A reseptörlerinin farklı yoğunluklarda bulunduğu bölgeler görülmektedir. 5-HT1A reseptörleri rafe çekirdekleri ve hipokampusun yanı sıra frontal, temporal, singulat ve entorinal kortekste yoğun olarak bulunmaktadır. Bununla birlikte en düşük yoğunluk ise oksipital kortekstedir (52). Serotonin reseptör bağlanma potansiyeli; 0: en az, 6: en çok.

5-HT1A reseptörlerinden yoksun farelerle yapılan çalışmalarda hayvanlar anksiyete davranışı göstermiştir ve bu hayvanlara SSRI ilaç tedavisi etkisiz kalmıştır (53–56). Yapılan bir başka çalışmada %30 daha az 5-HT1A otoreseptörüne sahip farelerde serotonerjik nöron ateşleme frekansı ve serotonin salınımı artmıştır ve depresyon benzeri davranışlarda azalma gözlenmiştir (56). Postsinaptik 5-HT1A reseptör yetersizliği anksiyete benzeri semptomların ortaya çıkması ile ilişkilendirilirken, presinaptik

somatodendritik 5-HT1A otoreseptörlerinin artışı depresyon benzeri semptomların ortaya çıkması ile ilişkilendirilmiştir (51).

#### **2.4. Majör depresyon**

MD toplumda yaklaşık %15 oranında görülen, iş gücü ve insan kaybına yol açabilen nöropsikiyatrik bir hastalıktır (16). Kadınlarda erkeklerden iki kat daha fazla görülmektedir (57,58). Gelişmiş ülkelerde yaşam boyu hastalık yükü sıralamasında ikinci sıradadır ve 2030 yılına kadar ilk sıraya yerleşmesi öngörülmektedir (59–61).

MD'nin temel nedeni beyinde nörosinaptik kavşakta bulunan serotonin miktarının yetersizliğidir (62–65). Akut triptofan yetmezliğinin depresyonu tetiklemesi ve nörosinaptik kavşakta serotonin miktarını arttıran SSRI ilaçlarının kullanılması ile depresyon tedavisinin sağlanması bunu kanıtlar niteliktedir (66–70). Bununla birlikte MD etiyofizyopatolojisinde noradrenalin, dopamin, glutamat gibi nörotransmitterler de indirek olarak rol almaktadır (69–72). MD (73–77) ve anksiyete bozukluklarında (78–83) postsinaptik 5-HT1A reseptörleri miktarı çeşitli kortikal bölgelerde düşerken, 5-HT1A otoreseptörleri miktarı artmaktadır (84–86). Bu bulgular MD fizyopatolojisinde, nörosinaptik kavşakta bulunan serotonin miktarının yanısıra 5-HT1A reseptörlerinin beyindeki dağılımının da önemli rol aldığını göstermektedir. Postsinaptik 5-HT1A reseptörlerinde azalma MD riskini arttırırken rafe çekirdeklerinde bulunan presinaptik somatodendritik 5-HT1A otoreseptörlerindeki artış da MD riskini arttırmaktadır (16).

MD kliniğinde hemen her gün, gün boyu süren depresif duygudurum, etkinliklere karşı ilgi kaybı ve zevk alamama gibi bulgular yer alır. Hastalar sosyal yaşamdan uzaklaşmıştır ve iş gücüne katılımları önemli ölçüde kısıtlanmıştır. Hastalar basit bitkinlik ve enerji kaybından, öz kısıma kadar gidebilen geniş bir yelpazede belirti verebilmektedir. Günümüzde MD tanısı DSM-IV (the diagnostic and statistical manual of mental disorders- IV) tanı kriterlerine göre konulmaktadır. Tablo 2.2'de MD DSM-IV tanı kriterleri yer almaktadır. Bir hastaya MD tanısı konulabilmesi için hastada bu kriterlerden en az beşinin bulunması ve bu beş kriterden en az birinin ilk iki kriterden birisi olması gerekir (87).

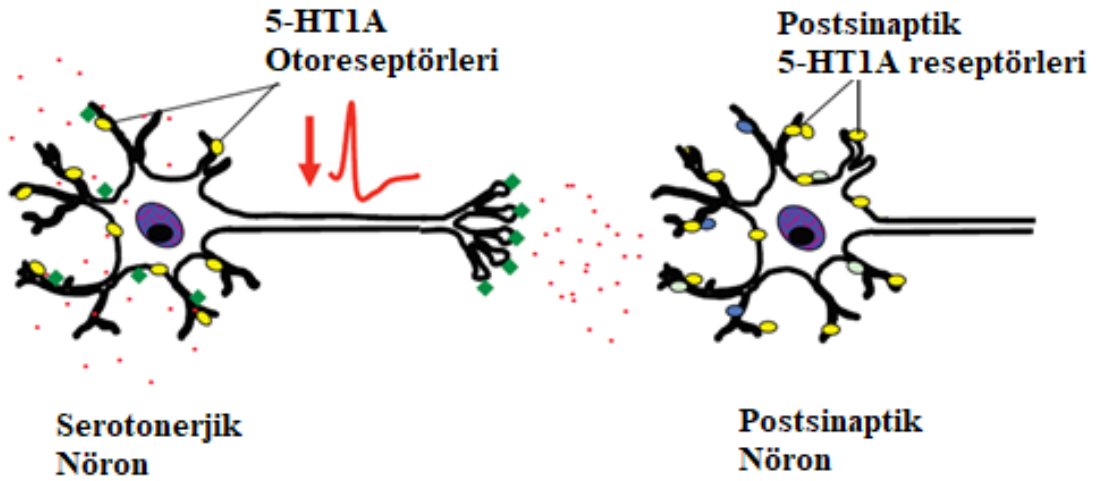
Tablo 2.2: Majör depresyon DSM-IV tanı kriterleri

	<b>Semptomlar</b>
1.	Hemen her gün yaklaşık gün boyu süren depresif duygu durumu
2.	Hemen her gün yaklaşık gün boyu süren tüm etkinliklere karşı ilgi kaybı ya da zevk alamama (anhedoni)
3.	Önemli derecede kilo kaybı ya da kilo alımı
4.	Hemen her gün süren uykusuzluk ya da aşırı uyku
5.	Hemen her gün psikomotor ajitasyon ya da retardasyon
6.	Hemen her gün yorgunluk, bitkinlik ya da enerji kaybı
7.	Hemen her gün aşırı ya da uygunsuz değersizlik, suçluluk duyguları
8.	Hemen her gün düşüncelerini belli bir konuya odaklama yetisinde azalma ya da kararsızlık
9.	Tekrarlayan olumsuz düşünceler ya da girişimler

### **Serotonin nörotransmisyonu**

Rafe çekirdeklerinde bulunan serotonerjik nöronların aksonal terminallerinde serotonin vezikülleri bulunur. Somatodendritik alanda eksitator postsinaptik potansiyeller sonucu istirahat zar potansiyelinin eşik değere ulaşması halinde akson hiluksta aksiyon potansiyeli (AP) meydana gelir. Aksiyon potansiyelinin gerçekleşmesinden sonra uyarı akson boyunca iletilir ve akson terminalinde voltaj bağımlı kalsiyum kanalları açılır ve kalsiyum iyonları hücreler arası sıvıdan sitoplazma içine geçerek serotonin veziküllerinin nörosinaptik kavşağa salınmasına neden olur. Serotonin nörosinaptik kavşakta postsinaptik nöronların soma ve dendritlerinde bulunan serotonin reseptörlerine bağlanarak etkisini gösterir (Şekil 2.5'te sağ taraftaki postsinaptik nöronda olduğu gibi).

Serotonerjik nöronların uyarılması ile aksonal terminalde bulunan nörosinaptik kavşakla birlikte serotonerjik nöronların somatodendritik bölgesinde de serotonin miktarı artar (16). Bu durum somatodendritik bölgede bulunan serotonin otoreseptörlerinin de uyarılmasına yol açar. DRN nöronlarında bu somatodendritik otoreseptörler 5-HT1A reseptörleridir. Bu reseptörlerin uyarılması bu nöronların hiperpolarizasyonuna ve dolayısıyla inhibisyonuna yol açar. Şekil 2.5'te sol taraftaki nöronun soma ve dendritlerinde otoreseptörler gösterilmiştir. Böylelikle serotonerjik nöronlarda serotonin sentezi için gereken uyarılabilirliğin artışı, beraberinde inhibisyonu getirerek bir negatif geribesleme (feedback) mekanizmasının kurulmasını sağlamaktadır (24).

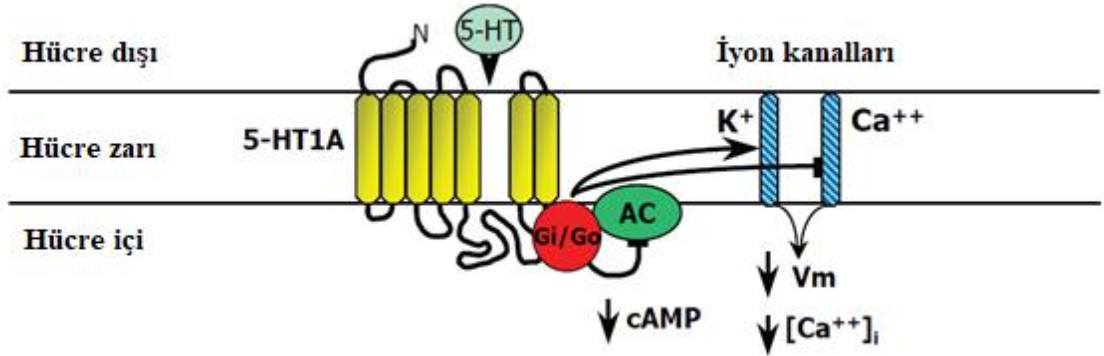


Şekil 2.5: DRN nöronlarında serotonin sentezlenmesinin düzenlenmesi ve antidepresan ilaçların bu nöronlar üzerine etkisi. Geri alım inhibitörü antidepresan ilaçlar akson terminali ve somatodendritik bölgede bulunan SERT proteinlerini inhibe ederler. Serotonin geri alımı durur ve bu bölgelerde serotonin miktarı artar. Nörosinaptik kavşakta serotonin artışı bu ilaçların kullanılma amacıdır ancak somatodendritik bölgede de serotonin miktarının artışı burada bulunan serotonerjik nöronların inhibe olmasından dolayı bu ilaçların etkinliğini kısıtlar. Kırmızı nokta: Serotonin, yeşil dörtgen: SERT proteinleri, sarı daire: 5-HT1A reseptörleri, mavi daire: Diğer serotonin reseptörleri (16).

Hücre zarında bulunan 5-HT1A reseptörü G proteini ilişkili bir reseptördür ve sitoplazmik yüzünde  $G_i$  proteinlerini bulundurur. Serotonin, 5-HT1A reseptörüne bağlandığı sırada reseptörün sitoplazmik yüzünde bulunan  $G_i$  proteini sitoplazmaya salınır ve iki ayrı yol izler.  $G_i$  proteinleri sitoplazmada bulunan adenilat siklaz (AC) enzimini bloke eder ve cAMP seviyesini düşürür. İkinci yolda ise  $G_i$  proteinleri doğrudan hücre zarında bulunan potasyum iyon kanallarına bağlanarak bu kanalların açılmasına neden olur (16). Bunun sonucunda sitoplazmada bulunan potasyum iyonları elektrokimyasal gradiyentten dolayı hücre dışına çıkarak istirahat zar potansiyelinin hiperpolarize olmasına yol açar (Şekil 2.6). Bu durum aynı zamanda hücrenin inhibisyonu



anlamını taşır. 5-HT<sub>1A</sub> reseptörleri postsinaptik nöronların soma ve dendritlerinde yer aldığı gibi dorsal rafe çekirdeklerinde yer alan serotonerjik olan ve serotonerjik olmayan nöronların somatodendritik kısımlarında da bulunmaktadır (16). Yani rafe çekirdeğinde sentezlenip salınan serotonin aynı zamanda burada bulunan nöronların da aktivitesini etkilemektedir (16,25).



Şekil 2.6: 5-HT<sub>1A</sub> reseptörünün hücre içindeki G proteini ilişkili sinyal ileti mekanizması. Serotonin 5-HT<sub>1A</sub> reseptörüne bağlandığında G<sub>i/o</sub> proteinleri altbirimleri serbestlenir ve bu proteinler GIRK kanallarının açılmasını sağlayarak potasyum iyonunun hücre dışına çıkışını ve transmembran potansiyelin hiperpolarizasyonuna neden olur. Dolayısıyla voltaj bağımlı kalsiyum kanallarının kapanmasını sağlayarak hücre içi kalsiyum konsantrasyonunun düşmesini sağlar. Ayrıca adenilat siklaz enzimini inhibe ederek cAMP miktarının düşmesine yol açar. Bu etkiler hücrenin inhibisyonuna ve serotonin salınımının engellenmesine neden olur (16).

### **Geri alım inhibitörü antidepressanların (SSRI ve SNRI) etki ve yan etki mekanizması**

SSRI ve SNRI grubu antidepressan ilaçlar aksonal terminalde bulunan serotonin transporter (SERT) proteinlerini inhibe ederek serotoninin nörosinaptik kavşaktan hücreye geri alınmasına engel olurlar. Ancak SERT proteinleri serotonerjik nöronların somatodendritik kısmında da bulunur ve bu ilaçlar buradaki SERT proteinlerini de inhibe eder. Bu nedenle geri alım inhibitörleri MD tedavisi için kullanıldığında ilk iki gün içerisinde maksimum düzeye çıkacak şekilde serotonerjik nöronlarda inhibisyona yol açmaktadır (Şekil 2.5). Bu etkinin nedeni; serotonin geri alım inhibitörü antidepressan ilaçların serotonin miktarını nörosinaptik kavşakta arttırmanın yanı sıra dorsal rafe çekirdeğinde bulunan serotonerjik nöronların somatodendritik kısımlarında da arttırmasıdır (16,25). Somatodendritik bölgede artan serotonin, presinaptik serotonerjik nöronların somatodendritik 5-HT<sub>1A</sub> otoreseptörlerine bağlanarak hiperpolarizasyonuna ve dolayısıyla bu nöronların inhibe olup nörosinaptik kavşağa daha fazla serotonin sentezleyememesine neden olmaktadır (16). Bu durum serotonin geri alım inhibitörü

antidepresan ilaçların etki süresinin gecikmesine ve etkili olabilmeleri için gereken dozlarının yükselmesine neden olmaktadır.

Yapılan bazı deneysel araştırmalar geri alım inhibitörü ilaçlarla bir non-selektif beta blokör olan ve hipertansiyon tedavisinde kullanılan pindololün (-) formunun somatodendritik 5-HT1A reseptörlerine parsiyel agonist etkili olduğu ve serotonin varlığında antagonistik etki göstererek 5-HT1A otoreseptörlerini inhibe ettiğini göstermiştir (7,85).

MD tedavisi için geri alım inhibitörü antidepresanları (SSRI, SNRI) içeren belirli tedavi modaliteleri geliştirilmiştir. Ancak mevcut tedaviler için kullanılan ilaçların doza bağlı yan etkileri görölmekle birlikte bu ilaçların etkisinin ortaya çıkma süresi oldukça uzun sürmektedir. İlacın alınmaya başlanmasından etki ettiği zamana kadar hastaların belirli bir kısmı etkisinin olmadığı düşünceyle tedaviyi sonlandırmaktadır. Depresyon tedavisinde pindololün antidepresan etkili ilaçların etkisini artırabileceği ve daha kısa sürede etkili olmasını sağlayabileceği çeşitli çalışmalarda bildirilmiştir. Yapılan klinik araştırmalarda MD tanısı almış olan hastalarda antidepresanların, pindolol ile birlikte kullanıldıklarında tek başlarına kullanılmasından daha etkili olabileceği gösterilmiştir (9,89).

Sıçanlarda DRN bölgesinden *in vivo* elektrofizyolojik kayıt alınarak yapılan prelinik araştırmalarda antidepresan ilaçlardan kaynaklanan DRN nöronları blokajının pindolol ön uygulaması ile engellenebileceği gösterilmiştir (5,7). Ancak bu tip araştırmalarda pindolol tek başına uygulandığında ise DRN nöronlarını inhibe ettiği gösterilmiştir (90,91). Her iki bulgu birlikte değerlendirildiğinde pindololün 5-HT1A otoreseptörleri üzerine parsiyel agonistik etkiye sahip olduğu ortaya çıkmaktadır. Nitekim Çin hemstırı ovarium hücrelerinde rekombinant 5-HT1A reseptörlerinin araştırıldığı bir çalışmada pindololün bu reseptörler üzerine parsiyel agonistik etkisi gösterilmiştir (88).

## **2.5. Venlafaksin**

Venlafaksin ve onun aktif metaboliti O-desmetilvenlafaksin, SSS'de serotonin ve noradrenalin nörotransmitterlerinin güçlü gerialım inhibitörüdür (92). Bu nedenle venlafaksin, serotonin noradrenalin gerialım inhibitörü grubu antidepresanlar arasında yer alır.

Venlafaksin, serotonerjik nöronlar ile postsinaptik nöronlar arasındaki nörosinaptik kavşakta serotonin miktarını arttırarak antidepresan etkisini göstermektedir. Bununla birlikte venlafaksin kullanımıyla serotonin miktarı dorsal rafe çekirdeği serotonerjik nöronlarının somatodendritik bölgelerinde de artar ve bu durum 5-HT1A otoreseptörlerinin aktivasyonuna yol açar (7,16). Bu reseptörler inhibitördür ve uyarılmaları serotonerjik nöronların inhibisyonuyla sonuçlanır. Bu durum venlafaksin kullanılma amacının tam tersidir ve venlafaksin etkisinin azalmasıyla birlikte, venlafaksin etkili olması için ihtiyaç duyulan dozun artmasına neden olur. Sıçanlarda yapılan *in vivo* elektrofizyolojik bir çalışma, pindololün venlafaksin etkinliğini önleyen bu durumu engelleyebileceğini raporlamıştır (7).

12 ve 8 hafta süren iki ayrı çift körlü klinik çalışmada da MD hastalarında venlafaksin kullanımı HAM-D (Hamilton depression rating scale) skoruna göre plaseboya üstün gelmiştir (92). Venlafaksin endikasyonları arasında MD, yaygın anksiyete bozukluğu ve panik atak yer almaktadır.

Venlafaksin uykusuzluk, sinirlilik, baş dönmesi, mani, hipomani atakları, anormal rüyalar, titreme, ağız kuruluğu, iştah ve kilo kaybı, bulantı, libido kaybı gibi yan etkileri görülmektedir. Gebelik kategorisi C'dir. Sindirim sisteminden %92 oranında emilmektedir. Biyoyararlanımı %45'tir. Venlafaksin %5'i hiç değişmeden idrarla atılır. Alındıktan 48 saat sonra %87'si idrara geçer (92).

## **2.6. Pindolol**

Pindolol terapötik doz aralığında (10-60 mg) intrinsik sempatomimetik aktiviteye sahip olan fakat bu aralıkta kinidin benzeri membran stabilize edici aktivitesi bulunmayan selektif olmayan beta blokördür. Egzersizden kaynaklanan kalp atış hızı, sistolik kan basıncı ve kardiyak debi artışını engeller. Çift körlü kontrollü klinik araştırmalarda tek başına ya da tiazid grubu diüretiklerle kullanıldığında etkili bir antihipertansif ajan olduğu gösterilmiştir. Antihipertansif etki mekanizması hakkında iki görüş bulunmaktadır. Bunlardan biri kan beyin bariyerini geçerek SSS'den sempatik sinir sistemine iletilen uyarıyı azaltmasıdır. Diğeri ise periferde (örneğin kalpte) diğerkatekolaminlerle yarışmalı antagonizma ile sempatik sistemin beta reseptör blokajına neden olmasıdır (93). Alındıktan sonra gastrointestinal sistemde hızlı bir şekilde emilerek (%95) bir saat sonra pik plazma konsantrasyonuna ulaşır. Pindolol %60 oranında kan plazması ve eritrositlere

dağılırken %40'ı plazma proteinlerine bağlanır. Sağlıklı bir erişkinde dağılım hacmi 2 L/kg'dır. İlk geçiş etkisi oldukça sınırlıdır. %35-40' ı hiç değişmeden idrarla atılırken %60-65'i hidroksi-metabolitlerine (glukronid, sülfat) dönüştürülerek atılmaktadır (93).

Santral sinir sistemi yan etkileri arasında; duygudurum bozuklukları, yer ve zaman uyumsuzluğuyla (dezoryantasyon) karakterize geri dönüşlü (reversible) mental depresyon, kısa dönem hafıza kaybı ve nöropsikometrik performansta düşme görülür. Yapılmış olan klinik ve prelinik araştırmalarda pindololün beta blokör etkisinin yanı sıra SSS'de DRN nöronlarının somatodendritik bölgelerinde bulunan 5-HT1A otoreseptörlerine karşı da parsiyel agonistik etkisinin olabileceği ortaya konulmuştur (5,7,88). Pindololün antihipertansif olarak kullanıldığı çalışmalarda da SSS yan etkilerinin nedeni, 5-HT1A reseptörleri ile etkileşimi olabilir.

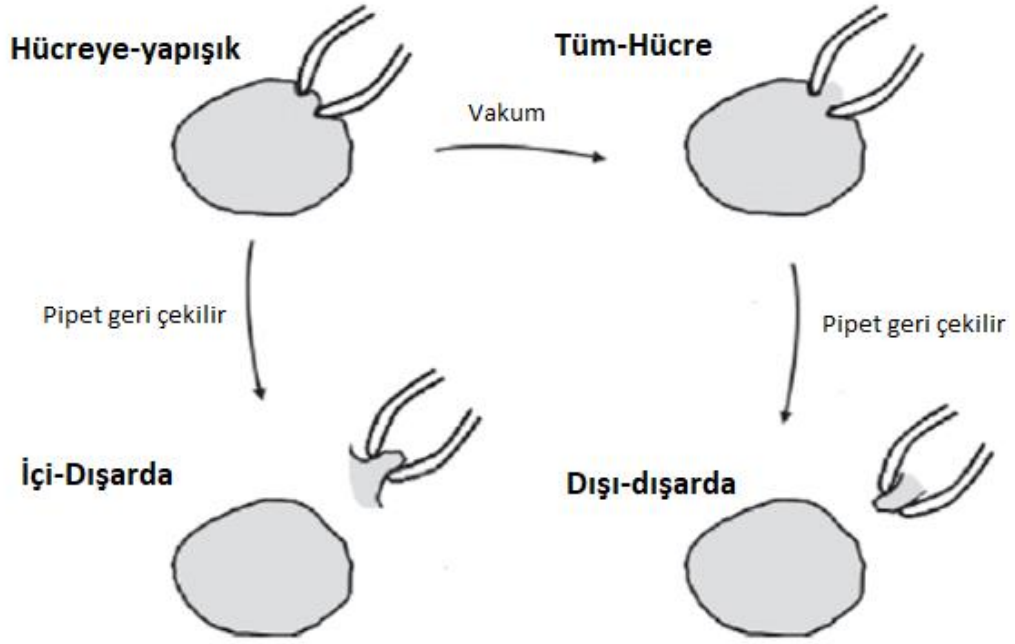
## **2.7. Elektrofizyoloji ve yama kenetleme tekniği**

Elektrofizyoloji biyolojik hücre ve dokuların elektriksel özelliklerine ilişkin çalışmaların genel adıdır. Beyinde bulunan sinir hücrelerinden elektrofizyolojik kayıt alınmasında, beyinde elektroensefalografi ölçümünde ya da kalpte elektrokardiyografi ölçümünde elektrofizyoloji tekniklerinden faydalanılmaktadır. Elektrofizyolojik teknikler arasında nöronlardan kayıt alınmasını sağlayan hücre dışı ve hücre içi kayıt teknikleri de yer alır. Hücre içi kayıt teknikleri arasında yama kenetleme tekniği en bilinenidir.

Yama kenetleme tekniği hücre zarındaki fizyolojik süreçlerde görev alan ve birçok patolojik durumla (kanalopatiler) ilişkisi olduğu düşünülen iyon kanallarının biyofiziksel ve farmakolojik özelliklerinin anlaşılmasına yardımcı olan elektrofizyolojik bir tekniktir. İlk olarak 1941 yılında Alan Lloyd Hodgkin ve Andrew Fielding Huxley mürekkep balığı dev aksonunda hücre içi elektrotlar kullanarak aksiyon potansiyelini kaydetmiş ve pasif zar özelliklerini incelemişlerdir (94). Daha sonra bu iki araştırmacı hücre zarı akımlarını ölçmeye yarayan voltaj kenetleme (voltage clamp) tekniğini geliştirmiştir (95,96). Ancak o dönemde alınan kayıtlar cam pipetlerdeki akım sızıntısından dolayı gürültülü idi ve bu nedenle tek bir iyon kanalının akımı ölçülemezdi. Bunun üzerine Bernard Katz'ın öğrencilerinden Bert Sakmann, Erwin Neher ile birlikte pipete negatif basınç uygulayarak kayıt almayı denedi ve gürültünün ortadan kalkmasını sağlayarak tek bir iyon kanalından yüksek çözünürlüklü zar akım kaydı almayı başardı (97). Bu tekniğe "yama-kenetleme" (*patch-clamp*) ismi verildi.

Yama kenetleme tekniğinin akım kenetleme (current clamp) ve voltaj kenetleme (voltage clamp) olmak üzere iki ayrı uygulama alanı bulunmaktadır. Akım kenetleme deneylerinde hücreye büyüklüğü bilinen miktarda akım verilir ve hücrenin bu akıma karşı göstermiş olduğu voltaj yanıt ölçülür. Akım kenetleme deneyleriyle hücrenin istirahat zar potansiyeli ile birtakım pasif ve aktif zar özellikleri ölçülebilir. Voltaj kenetleme deneylerinde ise hücrenin transmembran potansiyeli (hücre zarının iki yanı arasındaki potansiyel fark,  $V_m$ ) belirli bir zar potansiyelinde tutulur (kenetlenir -  $V_H$ ) ve bu potansiyelde hücre zarından geçen akım miktarı ölçülür (98).

Yama kenetleme içerisinde mikroelettrot ile hücrenin farklı pozisyonlarını içeren 4 adet konfigürasyon bulunmaktadır (Şekil 2.7). Bunlar hücreye-yapışık (cell-attached), tüm-hücre (whole-cell), içi-dışarda (inside out) ve dışı-dışarda (outside out) konfigürasyonlarıdır (98). Bunların her birinin birbirine göre avantajları bulunmaktadır. Hücreye-yapışık konfigürasyonunda pipet ucu hücre zarına yapışmış durumdadır. İçi-dışarda (inside out) ve dışı-dışarda (outside out) konfigürasyonlarında ise zar bütünlüğü bozulmuştur ve sadece zarın küçük bir kısmından kayıt alınır. Bu durum tek bir iyon kanalında çalışabilme imkanı sağlamaktadır. Ayrıca içi-dışarda konfigürasyonunda intrasellüler maddelerin (ikincil haberciler) iyon kanallarına etkisi araştırılabilmektedir. Tüm hücre konfigürasyonunda zar bütünlüğü korunmaktadır ve böylece hücrenin fizyolojik şartlarına yakın bir ortam sağlanarak iyonik akımlar ve voltaj değişimleri gerçeğe uygun şekilde ölçülebilmektedir. Araştırmamızda bu nedenlerle DRD nöronlarından elektrofizyolojik kayıtların alınması için tüm-hücre konfigürasyonu seçilmiştir.



Şekil 2.7: Yama kenetleme konfigürasyonları. Gigaseal pozisyonunda kayıt alındığında hücreye-yapışık konfigürasyon elde edilmektedir. Negatif basınç uygulanarak hücre zarı kopartılırsa tüm-hücre konfigürasyonu elde edilir. Hücreye-yapışık konfigürasyonunda pipet geri çekilerek hücre zarı kopartılırsa içi-dışarda konfigürasyonu elde edilir. Tüm-hücre konfigürasyonunda iken pipet geri çekilirse dışı-dışarda konfigürasyonu elde edilir (99).

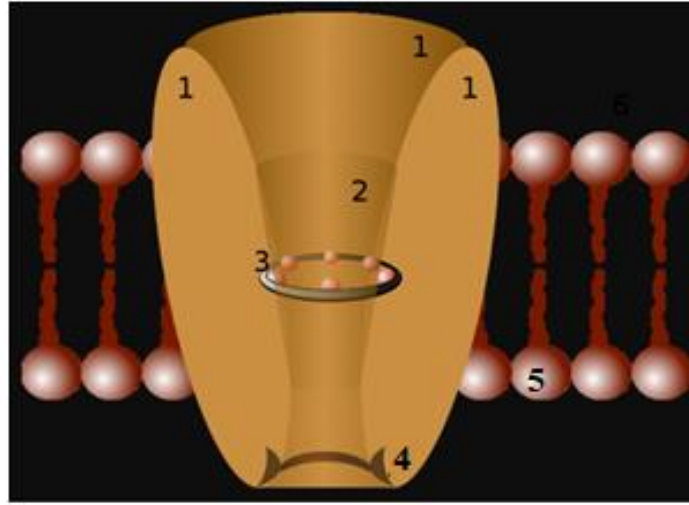
Tüm hücre konfigürasyonunda akım kenetleme ve voltaj kenetleme deneyleri uygulanabilmektedir. Öncelikle 1.5 ml iç hacme sahip özel bir kayıt odacığı üzerinde bulunan canlı beyin kesitlerinde hücreler belirlenir ve uygun dirençte (7-10 M $\Omega$ ) hazırlanmış pipetler intrasellüler pipet solüsyonu ile doldurulur ve pipet makro ve mikro manipülatörler yardımıyla bu hücrelere yanaştırılır. Daha sonra pipete vakum işlemi uygulanarak direncin G $\Omega$  (gigaohm) seviyesine çıkması sağlanır. Bu duruma gigaseal denir. Aynı zamanda bu pozisyon hücreye yapışık (cell attached) konfigürasyonudur. Daha sonra tekrarlayan vakum işlemleri ile hücre zarının yırtılması sağlanır. Bu durumda pipet solüsyonu hücre içindeki sitoplazma ile karışır.

Bu aşamada akım kenetleme deneyleriyle hücre içi ile hücre dışı arasındaki potansiyel fark (transmembran potansiyel,  $V_m$ ) kolaylıkla ölçülebilir. Hücreye farklı büyüklüklerde akım enjeksiyonları yapılarak zar potansiyeli, aksiyon potansiyeli desenleri, hücrenin pasif ve aktif zar özellikleri incelenir. Voltaj kenetleme deneylerinde ise bir kısım iyon kanalları voltaja duyarlı olduğu için, zar potansiyeli manipüle edilerek bu iyon kanallarının aktivasyon ve inaktivasyonları çalışılabilir. Diğer taraftan ligand kapılı iyon kanalları da ligandlar ile açıldıkları için o kanala spesifik ligandlar uygulanarak çalışılabilir.

Voltaj kenetleme çalışmalarında, zar potansiyeli farklı voltajlarda kenetlenerek zar akımları ölçülür. Her iyon kanalının akımının izolasyonu için belirli voltaj kenetleme protokolleri geliştirilmiştir. Örneğin GIRK kanalları izolasyonu için transmembran potansiyel -60 mV'da kenetlenirken -120 den başlatılıp -20'ye kadar 20 mV luk aralıklarla artan çeşitli adım potansiyeller (step potential) uygulanır. Bu potansiyellerin her birinde hücre zarından geçen akımlar ölçülebilmektedir (100).

## 2.8. İyon kanalları

İyon kanalları hücre zarında bulunan makromoleküler por şeklinde bulunan integral proteinlerdir (94). Prokaryot ve ökaryot hücrelerde temel olarak hücre zarında tuz transportu ve osmotik dengenin sağlanmasından sorumludurlar (98). Bu kanallardan tek bir tanesinden 10.000 kadar iyon 1 milisaniye kadar kısa sürede geçebilmektedir (31). İyon kanallarında genelde seçici bir filtre ve sitoplazmik kısmında ise kapılanmanın kontrol edildiği fosforilasyon bölgesi bulunmaktadır (Şekil 2.8).



Şekil 2.8: İyon kanallarının genel yapısı. 1: Kanal alanı, 2: dış açıklık, 3: seçici filtre, 4: fosforilasyon bölgesi, 5: hücre zarı (101).

İyon kanalları sinir hücrelerinde istirahat zar potansiyelinin korunmasını, aksiyon potansiyelinin gerçekleşmesini ve bir takım elektriksel sinyallerin iletilmesini sağlamaktadır. Sodyum-potasyum (Na-K) pompası gibi iyon taşıyıcılarla birlikte çalışarak hücre zarında istirahat zar potansiyelinin dengede kalmasını sağlarlar. Sağlıklı bir sinir hücresinde istirahat zar potansiyeli yaklaşık -65 mV kadardır. Bunun sağlanmasında iyon kanalları tarafından kontrol edilen; hücre zarının iki tarafı arasındaki

elektiriksel yük farkı ve iyon konsantrasyon farkları (elektrokimyasal fark) ile hücre zarının bu iyonlara karşı geçirgenliği en önemli faktörlerdir (31).

İyon kanalları nöronların uyarılabilirliğinin temel belirleyicisidir. Bir iyon kanalının açılması veya kapanması ilgili reseptörün spesifik ligandının bağlanmasına veya hücre zarının transmembran potansiyeline bağlıdır (31). Örneğin; asetilkolin reseptörüne asetilkolin bağlandığında ligand kapılı iyon kanalı açılır ve sodyum hücre içine girerek transmembran potansiyelinde değişikliğe neden olur. Ya da aksiyon potansiyelinin depolarizasyon safhasında voltaj bağımlı potasyum kanalları açılır ve hücre dışına potasyum çıkışına neden olarak repolarizasyonun gerçekleşmesini sağlar. Hedef hücrenin istirahat zar potansiyeli diğer nöronlardan salınan nörotransmitter aracılığıyla gelen uyarıların etkisi altındadır. Bu uyarılar yeterli büyüklükte depolarizasyona yol açtığı zaman aksiyon potansiyelinin gerçekleşmesini sağlamaktadır (31).

İyon kanalları kapılanma mekanizmalarına göre, taşıdığı iyon tiplerine göre ve hücrede bulunduğu lokalizasyonlara göre sınıflandırılmaktadırlar. Kapılanma mekanizmalarına göre beşe ayrılır. Bunlar voltaj-kapılı iyon kanalları, ligand-kapılı iyon kanalları, mekanosensitif iyon kanalları, siklik nükleotid kapılı iyon kanalları ve kalsiyum kapılı iyon kanallarıdır. İyon kanalları açıldığında taşıdığı iyon tipine göre ise potasyum iyon kanalları, sodyum iyon kanalları, klor iyon kanalları, kalsiyum iyon kanalları ve non-selektif katyon kanalları olarak beşe ayrılırlar (98).

### **2.8.1. Potasyum kanalları**

1998 yılında X ışını kristalografisiyle saptanan *Streptomyces lividans* bakterisinin potasyum kanalı yapısı, iyon kanallarının mekanizmasının anlaşılması konusunda önemli bir adım olmuştur. Bu kanalın dört altbirimden oluşan geniş ağız ekstrasellüler ortama bakan bir koni şeklindedir ve ortasında protein dizisinden kaynaklanan potasyum ( $K^+$ ) seçici filtre bulundurulur. Bu kanallarda bulunan filtre, potasyumun ( $1.33 \text{ \AA}$ ) sodyumdan ( $0.95 \text{ \AA}$ ) 10.000 kat daha hızlı geçmesini sağlamaktadır (31). Potasyum kanallarının açılması, zar potansiyelini potasyum Nernst potansiyeline (equilibrium potential) yaklaştırır ve ateşleme eşik değerinden uzaklaştırır. Uyarılabilir hücrelerde eksitator inputların etkisini azaltır, ateşleme aralıklarının süresini düzenler, yoğun aktif periyodları engeller ve aksiyon potansiyeli süresinin kısa kalmasını sağlar. Potasyum iyon kanalının



bu işlevleri zar potansiyelinin stabilitesinin artmasını sağlamaktadır (98). Tablo 2.3'te potasyum iyon kanallarının moleküler yapılarına göre sınıflandırılması yer almaktadır.

Tablo 2.3: Moleküler yapılarına göre insanda bulunan potasyum iyon kanalları sınıflandırması (98)

Moleküler yapı (hücre zarında bulunan transmembran protein sayısı)	Genotip	Fenotip	Alt tipleri
2 TM	KCNH	İçe doğru düzeltici potasyum kanalları (Inward rectifiers)	Kir1,2,4,5,7: klasik inward rectifiers Kir3: GIRK Kir6: ATP duyarlı potasyum kanalları
4 TM	KCNK	Potasyum sızma kanalları (2P domain K leaks)	TWIK
6 TM	(KCNA,B,C,D), KCNS	Voltaj kapılı potasyum kanalları (delayed rectifiers)	Kv1-9
	KCNQ	Voltaj kapılı potasyum kanalları (slow delayed rectifiers)	KCNQ1
	KCNM,KCNN	Kalsiyum kapılı potasyum kanalları	Mslo (büyük), SKI (küçük ve orta)
	KCNH	Voltaj kapılı ERG kanalları	eag
	HCN,CNG	Miks katyon kanalları	NCN1, CNG1

TM: transmembran protein.

### **Voltaj bağımlı potasyum kanalları**

Hücre zarında potasyum iyonlarına spesifik olan ve zar potansiyelindeki değişikliklere bağımlı olarak açılıp kapanan kanallardır. Depolarizasyon sonrası hücrenin istirahat zar potansiyeline tekrar dönmesinde temel düzenleyicidir (98).

### **Kalsiyum ile aktive olan potasyum kanalları**

İletkenliklerine göre iletkenliği büyük olan potasyum kanalları, iletkenliği orta olan potasyum kanalları ve iletkenliği küçük olan potasyum kanalları olmak üzere üçe ayrılmıştır. İntrasellüler kalsiyum seviyesinin artması bu kanallardan potasyum akımını tetikler ve hiperpolarizasyona ya da repolarizasyona yol açar. Aksiyon potansiyeli sonrasında gelişen “after hiperpolarizasyon (AHP)” komponentinin oluşmasını sağlayarak spontan aktif hücrelerin aktivitesinin yavaşlamasına neden olmaktadır (98).

### **Potasyum sızma kanalları;**

On beş adet alt tipi tanımlanmıştır. Transmembran potansiyeli, istirahat zar potansiyeli düzeyinde iken potasyumun hücre içinden hücre dışına çıkmasına neden olurlar.

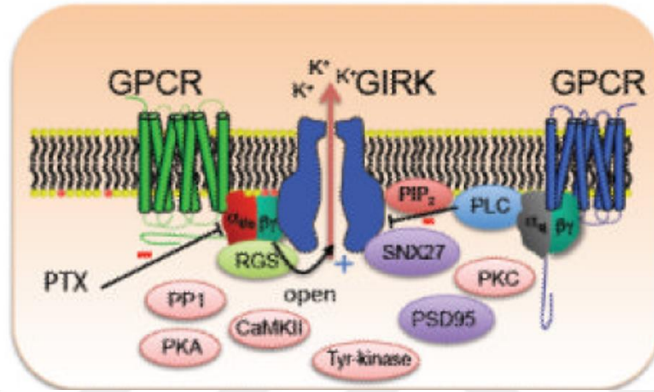
### **İçe doğru düzeltici (inward rectifier) potasyum kanalları;**

İçe doğru düzeltici potasyum akımı ilk keşfedildiğinde diğer dışa doğru (outward) potasyum akımlarından ayırmak için aykırı (anomalous) düzeltici olarak tanımlanmıştır. Memeli hayvan hücrelerinde bitkilerde ve bakterilerde yedi adet alttipi tanımlanmıştır. Potasyum iyonu için seçicidir. Kalpte aksiyon potansiyeli süresinin uzamasını sağlar. Sinir hücrelerinde nörotransmitter salınımının düzenlenmesinde etkilidir. Potasyumun ters potansiyelinden (reverse potential) daha negatif potansiyellerde içe doğru (inward) akıma yol açarken pozitif potansiyellerde dışa doğru akıma yol açar. Bu kanallar içe doğru akıma daha yatkındır ve içe doğru akım genliği dışa doğru akım genliğinden daha yüksektir (98).

### **G proteini kenetli içe doğru düzeltici potasyum kanalları**

G proteini kenetli içe doğru düzeltici potasyum kanalları (GIRK) içe doğru düzeltici (inward rectifier) kanal süper ailesinin bir üyesidir. Kanalların intrasellüler yüzünde bulunan  $Mg^{+2}$  iyonu ve poliaminler nedeniyle bu kanallardan geçen içe doğru (inward) akım dışa doğru (outward) akımdan daha büyüktür. GIRK kanalları istirahat zar potansiyeline yakın voltajlarda dışa doğru akım ortaya çıkararak hiperpolarizasyona

neden olur. Serotonin 5-HT<sub>1A</sub>, adenzin A<sub>1</sub>, dopamin D<sub>2</sub>, GABA<sub>B</sub>, asetilkolin M<sub>2</sub> ve adrenerjik  $\alpha_2$  reseptörleri gibi G proteini kenetli reseptörler (GPCR) sitoplazmik yüzlerinde G proteini taşırlar. Bu reseptörlerin aktivasyonları ile reseptöre bağlı bulunan G $\beta\gamma$  alt birimi serbestleşerek GIRK kanallarını aktive eder (102–107). Bu mekanizma Şekil 2.9’da görülmektedir. Metabotropik reseptörlerin aktivasyonu ile açılan bu kanalların açılması iyonotropik reseptörler kadar hızlı değildir ve saniyeler alır. Böylelikle ortaya çıkan bu inhibitör postsinaptik potansiyeller (IPSP) daha geç başlamakta ve daha uzun sürebilmektedir (108).



Şekil 2.9: İçeride doğru düzeltici potasyum kanallarından olan GIRK kanal yapısı ve açılma mekanizması. GPCR nin uyarılması sonucu ile G $\beta\gamma$ <sub>i/o</sub>, G $\alpha$ <sub>i/o</sub> dan ayrılır ve GIRK kanalının açılmasını sağlar. Pertusis (PTX) toksini G $\alpha$ <sub>i/o</sub> üzerinden bu mekanizmayı inhibe eder. Hücre içi birçok sinyal ileti mekanizması GIRK kanalları ile ilişkilidir. Örneğin hücre içinde fosfolipaz C (PLC) artışı GIRK açılmasını inhibe eder (109).

Fonksiyonel GIRK kanalları GIRK altbirimlerinin heterotetramerlerinden oluşmaktadır. Bu alt birimler dört adettir ve GIRK 1, GIRK 2, GIRK 3, GIRK 4 olarak sınıflandırılmaktadır. Bunların sistematik isimleri ise sırasıyla K<sub>ir</sub> 3.1, K<sub>ir</sub> 3.2, K<sub>ir</sub> 3.3 ve K<sub>ir</sub> 3.4’tür. GIRK tetramerlerinin bu çeşitliliği hücre zarındaki iyon akış trafiğinde varyasyonların ve kanalların G $\beta\gamma$  altbirimlerine olan afinitelerindeki farklılıkların ortaya çıkmasını sağlamaktadır. GIRK 1 ve 2 altbirimleri beyinde sentezlenen GIRK kanalları içerisindeki baskın grubu oluşturmaktadır (108). DRN bölgesinde bulunan nöronlarda GIRK 1-2 ve 3 alt birimlerinin mRNA’ları bulunmaktadır (110).

GIRK 1, 2 ve 3 SSS’de bulunurken, GIRK 4 kalpte bulunmaktadır. Kalpte muskarinik reseptörlerin asetilkolin ile aktivasyonu sonucu bu kanallar aktifleşir ve kalp kası hücrelerinin hiperpolarizasyonu ve kalp hızının yavaşlaması ile sonuçlanır. Kalpte GIRK kanalları iki GIRK 1 ve iki GIRK 4 altbiriminden oluşmuştur (111).

### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

#### 3.1. Deneysel hayvanları

Araştırmada kullanılan deneysel hayvanları için Gaziantep Üniversitesi Hayvan Deneysel Yerele Etik Kurulu Başkanlığı'ndan 2019/28 karar numaralı etik kurul onay belgesi alınmıştır. Yapılan çalışmalarda hayvan materyali olarak albino Balb/c ırkı 28-34 günlük erkek fareler kullanılmıştır. Hayvanların suya ve besine erişimi sürekli olarak (*ad libitum*) sağlanmıştır. Fareler 4 mevcutlu kafeslerde 22-25 derece oda sıcaklığında barındı ve 12/12 saat aydınlık-karanlık döngüsüne maruz bırakıldı. *In vitro* yama kenetleme ve *in vivo* davranış deneysel için toplamda 227 adet hayvan kullanılmıştır.

Farelerde serotonin reseptörleri 24 günlük yaşta sentezlenmeye başlamakta ve ancak bu dönemden sonra fonksiyonel hale gelmektedir (112). Daha genç yaşdaki hayvanlarda rafe çekirdeğindeki hücreler gelişimlerini tamamlamadığı ve serotonin reseptörleri fonksiyonel hale gelmediği için elde edilecek veriler yetişkin hayvanlardaki durumu yansıtmayacaktır. Daha yaşlı farelerde ise bağ doku daha fazla geliştiği için kesit alma sırasında hücreler daha fazla hasar görecektir ve elektrofizyolojik kayıt almak zorlaşacaktır. Bu nedenlerden dolayı çalışmamızda 28-34 günlük hayvanlar kullanılmıştır.

#### 3.2. Yama kenetleme tekniği

Yapılan çalışmada canlı nöronlardan elektrofizyolojik kayıt alabilme imkanı sunan yama kenetleme tekniği kullanılmıştır. Yama kenetleme; mikroelektrotların üretimi, yapay beyin omurilik solüsyonunun hazırlanması, yeterli hızda ve doğrulukta beyin diseksiyonu yapılması, alınan kesitlerde canlı hücre bulunabilmesi ve bu hücrelerden yeterli netlikte gürültüsüz kayıt alınabilmesi gibi kompleks süreçleri içeren güvenilir bir elektrofizyolojik tekniktir.

Tez çalışması kapsamında, öncelikle 28-34 günlük farelerin beyin sapından dorsal rafe çekirdeğini içeren koronal kesitler elde edildi. Daha sonra dorsal rafe çekirdeğinin dorsal altçekirdeğinde (DRD) bulunan nöronlardan yama kenetleme tekniğinin tüm-hücre (whole cell) konfigürasyonu ile intrasellüler elektrofizyolojik kayıtlar alındı. Deneysel çalışmalar Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı'nda bulunan elektrofizyoloji laboratuvarında yama kenetleme sistemi ile gerçekleştirilmiştir.

Mikroelektrot olarak pipetler mikropipet puller (P-97, Sutter Instrument) kullanılarak üretilmiştir. İlgili beyin alanının diseksiyonu için diseksiyon mikroskobu ve beyin sapından 200 µm kalınlığında dorsal rafe çekirdeği kesitlerinin elde edilmesi için vibratom (Frederick Haer and Co, New Brunswick, ME) kullanılmıştır. Alınan kesitlerde canlı hücrelerin gözlenip pipet ile yama kenetleme konfigürasyonunun oluşmasında 63x suda immersiyon objektifi içeren diferansiyel girişim kontrastlı (differential interference contrast, DIC) araştırma mikroskobu (Axio Scope FS, Zeiss) kullanılmıştır. Yapay beyin-omurilik sıvısının istenen hızda perfüzyonunu sağlayan perfüzyon sistemi yer çekimi prensibiyle çalışmaktadır ve vana sistemiyle değişik farmakolojik ajanlar içeren solüsyonların perfüzyonu sağlanmaktadır. Diseksiyon ve perfüzyonda kullanılan yBOS'un sıcaklığı oda ısısında tutulmuştur.

Antivibratif masa (TMC) kullanılarak kayıt sırasında zemindeki titreşimlerin kayıt ortamına yansıtılması engellenmiştir. Mikropipet ile hücreye hassas şekilde yanaşılması makromanipülörler ve mikromanipülörler yardımıyla sağlanmıştır. Biyolojik sinyallerin dijital sinyallere ve dijital sinyallerin biyolojik sinyallere dönüştürülmesi analog/dijital (A/D) dönüştürücü (converter) (Axon Instruments, Foster City, CA) ve sinyallerin amplifikasyonu ise yama kenetleme amplifikatörü (Axopatch-200B) ile gerçekleştirilmiştir. Elde edilen verilerin kaydedilmesi ve analizi pClamp (versiyon 10, Axon Instruments) paket programı kullanılarak yapılmıştır. Resim 3.1'de kullanılan yama kenetleme sistemi görülmektedir.

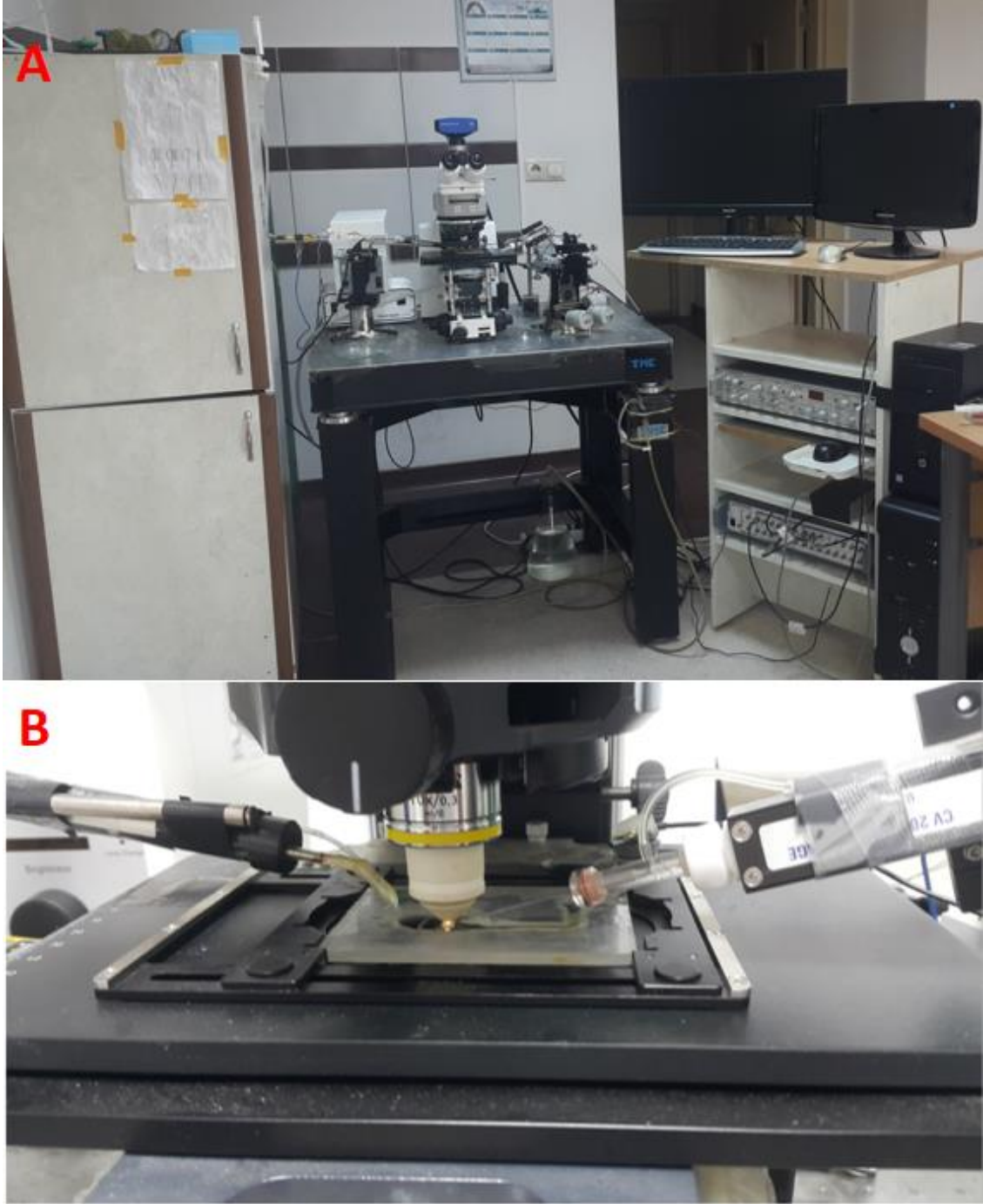
Yama kenetleme deneylerinde elektrofizyolojik kayıtlar üç başlık altında değerlendirilmiştir. İlk olarak DRD nöronlarında serotoninin istirahat zar potansiyeli üzerine olan etkisi akım kenetleme deneyleriyle araştırılmıştır. İkinci olarak serotonin uygulamasının DRD nöronlarında indüklediği iyonik akım, voltaj kenetleme deneyleriyle araştırılmıştır. Üçüncü olarak ise serotoninin DRD nöronları üzerine olan etkisine hangi serotonin reseptör tipinin aracı olduğu ve pindololün serotonin ve 8-OHDPAT ile indüklenen akımlara etkisi yine voltaj kenetleme deneyleriyle araştırılmıştır. Bu üç başlık ve amaçları Tablo 3.1'de özetlenmiştir. Her deney düzeneğinde kayıt alınan hücre sayısı Tablo 3.2'de verilmiştir.

Tablo 3.1: Deney düzeneği grupları

Deney Düzeneği	Amaç
1. Akım kenetleme deneyleri	a. Serotoninin istirahat zar potansiyeli üzerine etkisinin araştırılması b. Serotonine cevap veren ve cevap vermeyen nöronların aktif ve pasif zar özelliklerinin araştırılması
2. İyon kanalı düzeyindeki voltaj kenetleme deneyleri	a. Serotonin ile indüklenen akımın biyofiziksel ve farmakolojik karakterizasyonu
3. Reseptör düzeyindeki voltaj kenetleme deneyleri	a. Serotonin ile indüklenen akımın hangi serotonin reseptöründen kaynaklandığının araştırılması b. Pindololün $I_{5-HT}$ 'ye etkisinin araştırılması c. 5-HT <sub>1A</sub> agonisti olan 8-OHDPAT ile indüklenen akım ( $I_{8-OHDPAT}$ ) üzerine pindololün etkisinin araştırılması

Tablo 3.2: Deney grupları ve kimyasal madde uygulamaları

Deney metodu	Kullanılan kimyasal	Deneyde kayıt alınan hücre sayısı
Akım kenetleme	Serotonin, standart yBOS	9
Voltaj kenetleme	Serotonin, standart yBOS	27
Voltaj kenetleme protokolü	Serotonin, standart yBOS	6
Voltaj kenetleme protokolü	Serotonin, 20mM yBOS	5
Voltaj kenetleme	Serotonin ve kinin	5
Voltaj kenetleme	Serotonin ve WAY 100135	6
Voltaj kenetleme	Serotonin ve pindolol	5
Voltaj kenetleme	Serotonin ve 8-OHDPAT	7
Voltaj kenetleme	8-OHDPAT ve pindolol	5



Resim 3.1: Yama kenetleme sistemi. **A:** Antivibratif masa üzerinde bulunan kayıt mikroskobu, yanında amplifikatör (en alt sırada), A/D dönüştürücü (ortada) ve monitör görülmektedir. **B:** Yakın çekimde mikroskobun objektifi altında kayıt odacığı ve mikroelektrot görülmektedir.

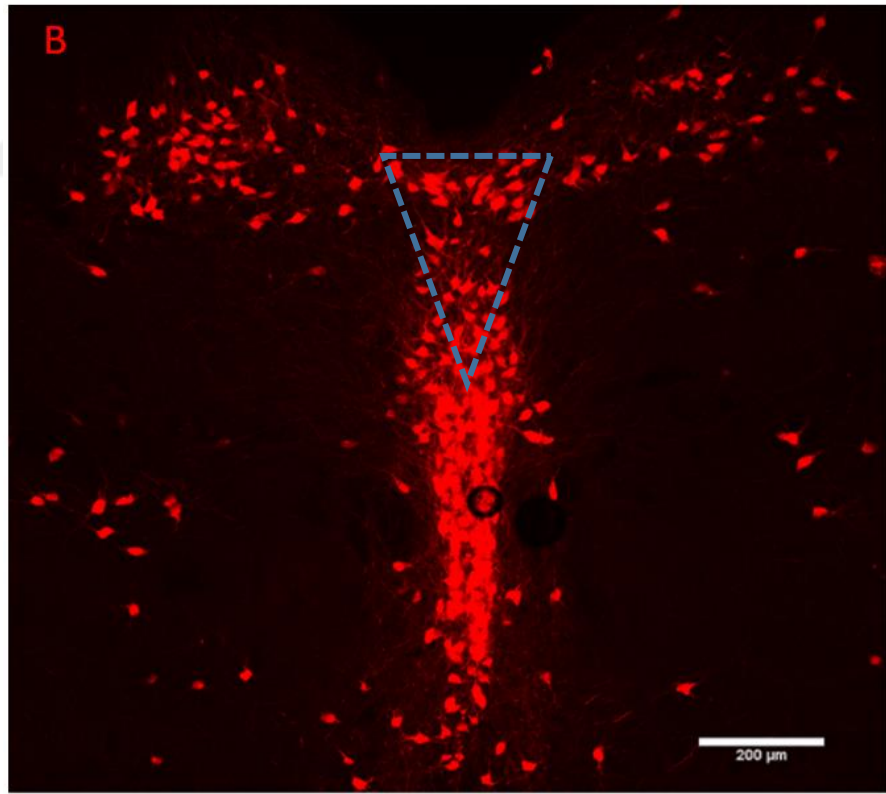
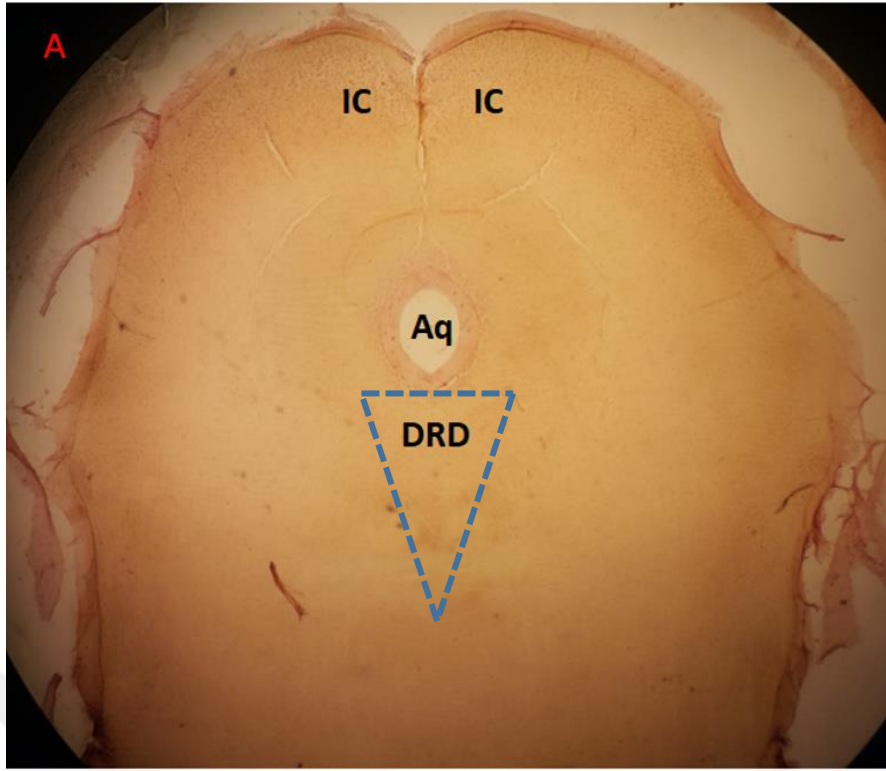
### 3.3. Fare beyinde dorsal rafe çekirdek bölgesinin lokalizasyonu

30 günlük farelerde beyin sapında neutral red boyaması ile DRN bölgesinin lokalizasyonu bulunmaya çalışıldı. Bu işlem için 200 mikronluk beyin sapı kesitleri alındı ve kesitler jelatinlenmiş lamlara bırakıldı. Kuruma işleminden sonra %75, %95 ve %96'lık alkol solüsyonlarında onar saniye tespit edildikten sonra yıkama işlemi yapıldı

ve kesitler neutral red boyası (%1) içeren şalelere yerleştirildi. Burada 1 dakika bekletildikten sonra yıkama işlemi sonrası kesitler kurumaya alındı. Resim 3.2 A'da bu şekilde boyanan bir koronal mezensefalon kesiti görülmektedir. Paxinos atlasında DRN lokalizasyonu belirlenerek (113) ve daha önce DRN'de yapılmış olan bir immünohistokimya çalışmasındaki kesit görüntüsü baz alınarak (20) kayıt alınacak bölge seçilmiştir (Resim 3.2B).



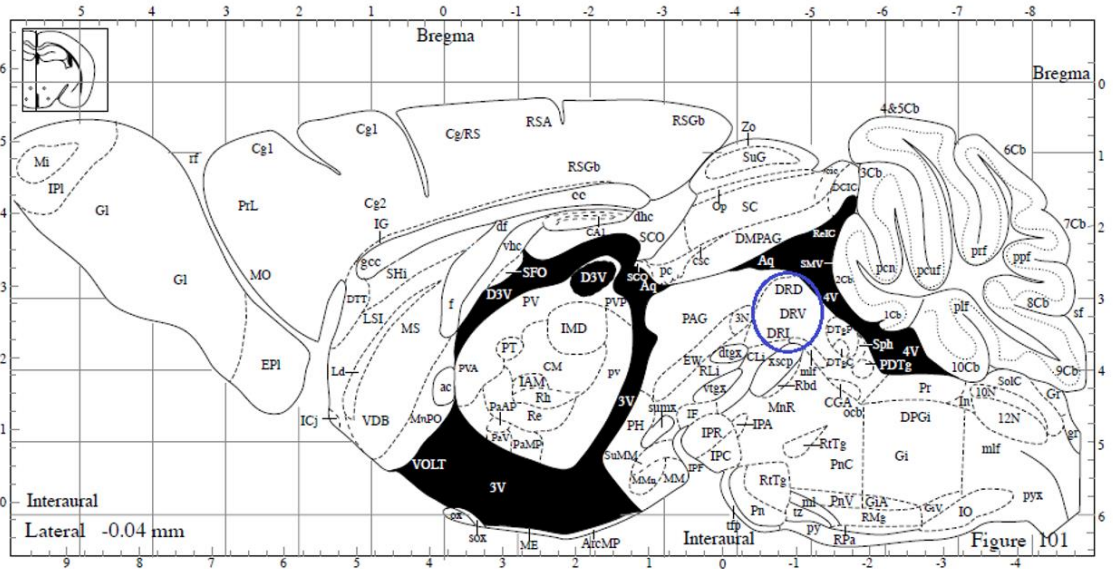




Resim 3.2: Mikroskop altında neutral red ile boyanmış DRN kesiti (A) ve DRN immünohistokimyasal boyama görüntüsü (B). **A:** Araştırmamızda neutral red ile boyanarak elde edilen DRN kesiti. Üçgen alan yama kenetleme deneyleri sırasında kayıt alınan DRD bölgesini temsil etmektedir. Bu bölgede serotonerjik nöronlar yoğun olarak bulunmaktadır. IC: inferior colliculus, DRD: Dorsal rafe çekirdeği dorsal altçekirdeği, Aq: Acquaductus **B:** Farede immün histokimyasal olarak triptofanhidroksilaz enzimi (kırmızı renk) içeren serotonerjik DRN nöronlarının görünümü. Resim 3.2-B (20) numaralı referanstan alınmıştır.

### 3.4. Beyin kesitlerinin alınması (diseksiyon)

Dorsal rafe çekirdeğinden üst düzey beyin bölgelerine gönderilen serotonerjik projeksiyonlar depresyon, anksiyete gibi duygudurum bozukluklarında önemli rol almaktadır (21,112,114–116). Bu nedenle planlanan çalışmada dorsal rafe çekirdeğinin dorsal altçekirdeği tercih edilmiştir. DRD, Şekil 3.1’de bulunan Paxinos atlasından sagittal düzlemde alınmış olan görüntüde 3. ve 4. ventrikülleri birleştiren Sylvius kanalının (aqueductus) hemen altında bulunmaktadır. Bölgeden koronal düzlemde kesitler alındığında DRD Sylvius kanalının önüne denk gelmektedir.

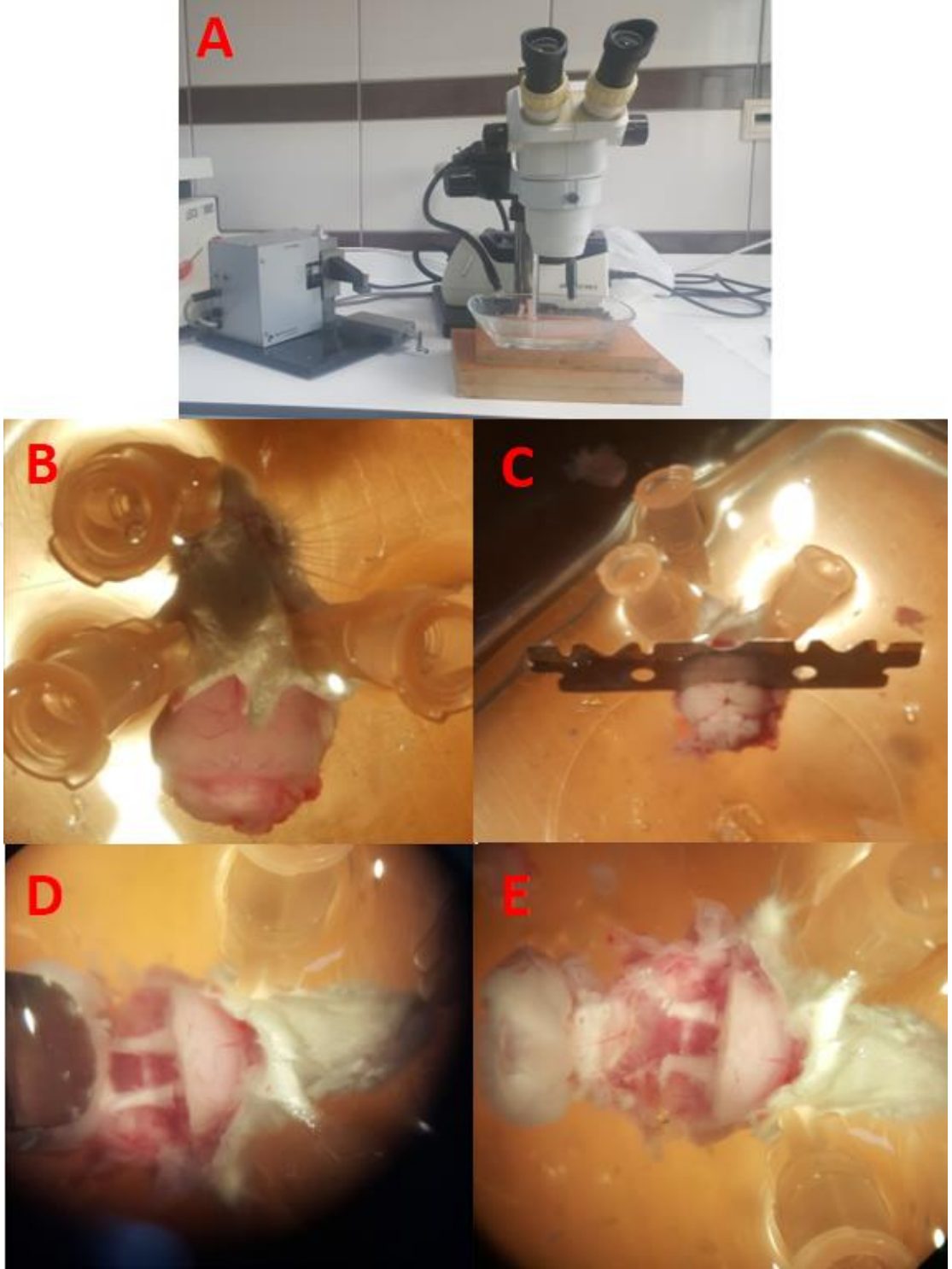


Şekil 3.1: Farede orta hattın 0.04 mm lateral hattından sagittal düzlemde alınmış olan kesit. 3. ve 4 ventrikülü birbirine bağlayan aquaduktusun altında dorsal rafe çekirdeği bulunmaktadır. İlgili alan mavi çemberle işaretlenmiştir. Çember içerisinde dorsal rafe çekirdeğinin DRD, DRI ve DRV altçekirdekleri görülmektedir (113).

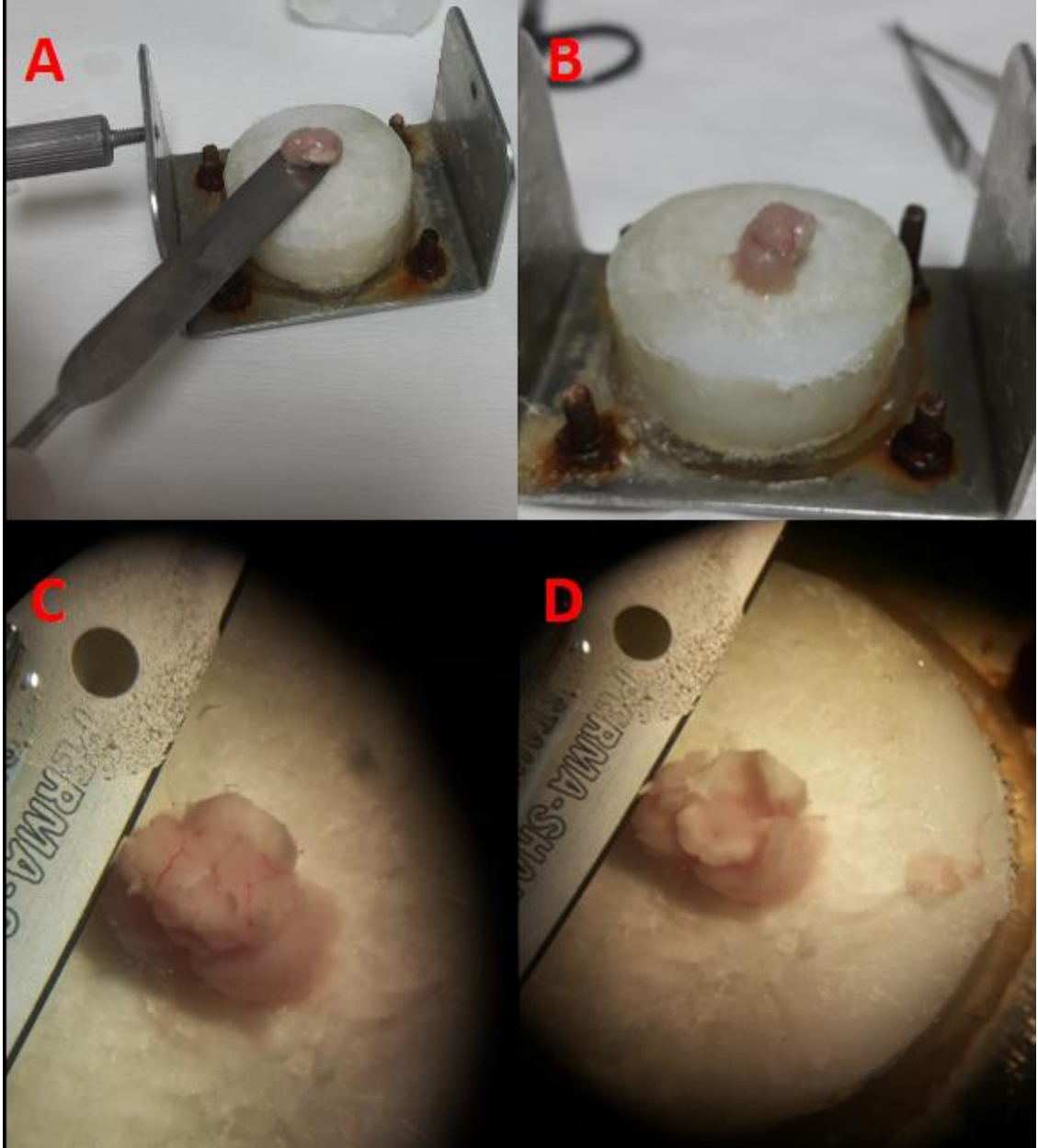
Hayvanlar, 0.1 g/kg ketamin (i.p.) ile anestezi edildikten sonra dekapite edildi. Hayvanın başı sürekli oksijenlenen yBOS’a daldırıldı, diseksiyon mikroskobu altında gözler ve burundan insülin iğnesi ile tabanı silikon kaplı diseksiyon odacığına sabitlendi (Resim 3.3 A-B). Beyin dokusu bir bütün olarak kafatasının dışına alındı ve daha sonra superior kollikulusun 2-3 mm rostralinden koronal düzlemde kesildi (Resim 3.3 C). Fiziki olarak hasar oluşturmadan ve beyin sapından çıkan kranial sinirler gerilmeden kesildi (Resim 3.3 D-E). Dorsal rafe çekirdeği bölgesini içerisine alacak şekilde ayrılan beyin sapı rostral ucundan teflon bloğa japon yapıştırıcısı (cyanoacrilat yapıştırıcı) ile yapıştırıldı (Resim 3.4 A-B). Bu blok içerisinde sürekli oksijenlenen yBOS’ un bulunduğu vibrotomdaki yerine yerleştirildi. Serebellum inferior kollikulusun kaudal seviyesinden

vibratomla kesilip çıkarıldıktan sonra DRN bölgesinden 200  $\mu\text{m}$ 'lik kesitler alındı (Resim 3.4 C-D). Bu kesitler ucu kesilmiş pastör pipeti yardımıyla içerisinde sürekli oksijenlenen yBOS sıvısının bulunduğu dinlenme odacığına alındı.





Resim 3.3: Dorsal rafe çekirdeği diseksiyonu. **A:** Sağda diseksiyon mikroskobu ve altında diseksiyon odacığı bulunmaktadır. Solda ise vibratom görülmektedir. **B:** Dekapitasyon sonrası baş, 1 adet burundan ve 2 adet gözlerden olmak üzere insülin iğnesi ile tabanı silikon kaplı diseksiyon odacığına iğnelendi. **C:** Superior kollikulusun rostralinden jilet ile koronal kesi yapıldı. **D:** Optik sinirler ve diğer kranial sinirler makas ile kesildi. **E:** Kranial sinirlerin kesilmesi sonrası beyin sapı çıkarıldı.



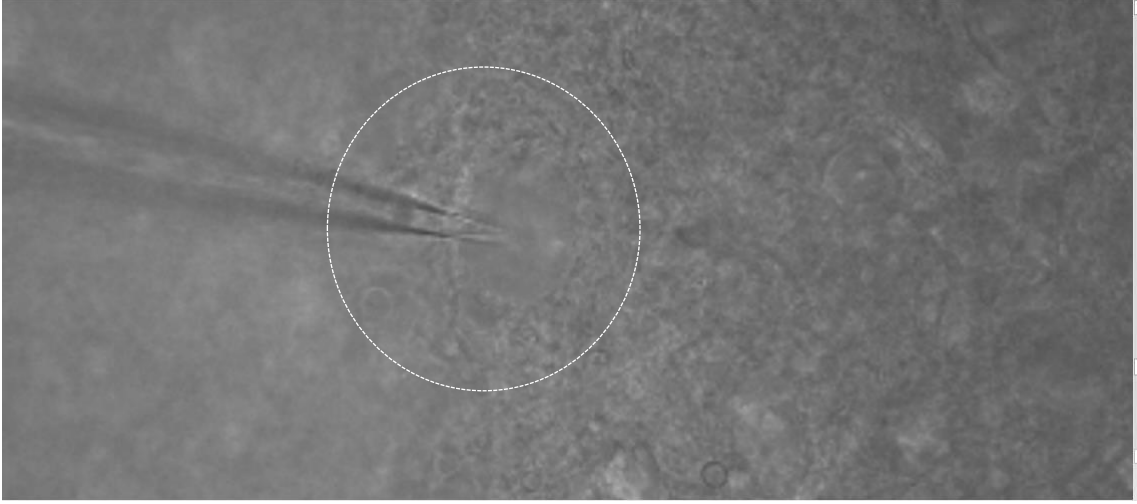
Resim 3.4: Dorsal rafe çekirdeği beyin kesitlerinin elde edilmesi. **A-B:** Serebellum üstte kalacak şekilde japon yapıştırıcısı ile beyin sapı teflon bloka yapıştırıldı **C-D:** Vibrotom ile DRN'den 200  $\mu$ m kalınlığında kesitler alındı ve hemen ardından bu kesitler dinlenme odacığına bırakıldı.

### 3.5. Yama kenetleme kayıtları

Brown-Flaming P-97 model Sutter puller ile borosilikat cam kapiller borulardan (dış çapı: 1.2 mm ve iç çapı: 0.68 mm) günlük yama kenetleme mikroelektrodları üretildi. Kayıtlarda sadece pipet uç direnci 7-10 M $\Omega$  olan mikroelektrotlar kullanıldı. Kapasitans ve seri direnç kompensasyonu cihaz üzerinde on-line olarak yapıldı. Seri direnç kompensasyonu % 75-80 oranında gerçekleştirildi. Deney sonunda pipet hücreden çıkarıldıktan sonra okunan voltaj değeri ( $V_{tip}$ ) 5 mV'dan küçük olduğu kayıtlar analizlere dahil edildi.

Analog veriler Axopatch 200B model yama kenetleme amplifikatörü ile elde edildi. Veriler 5-10 kHz bandında filtrelendikten sonra analog/dijital dönüştürücü Digidata 1440 serisi (Axon Instruments, Foster City, CA) ile bilgisayara aktarıldı. Uyarı oluşturulması, verilerin toplanması ve analiz için pClamp paket programı (Axon Instruments) kullanıldı. Şekillerin çizimi için OriginLab pro.10 programı kullanıldı.

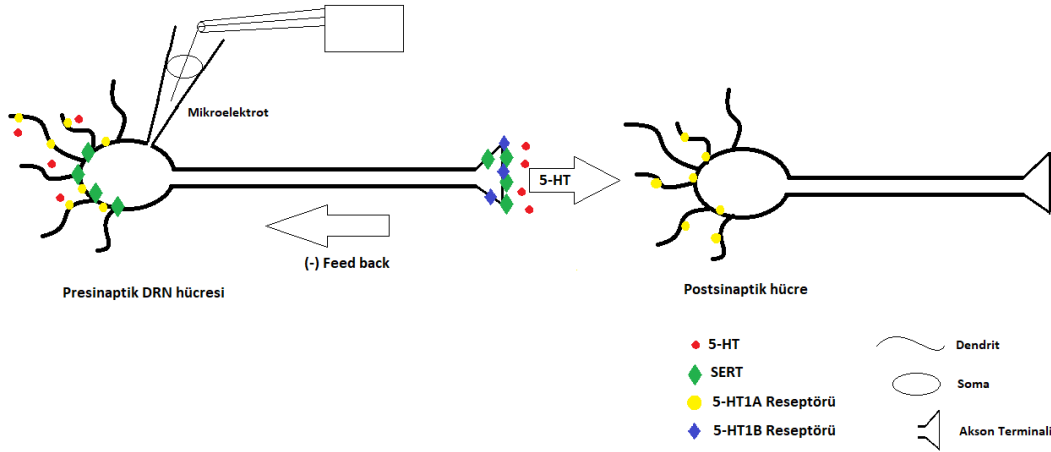
Kesitler en az 30 dakika dinlenme odacığında inkübe edildikten sonra 1.5 ml iç hacmindeki kayıt çemberine yerleştirildi ve 4 ml/dk hızında perfüze edildi. 30 dakika perfüzyondan sonra pipet puller cihazında üretilen mikrokapiller pipetin içerisine gümüş klorür (Ag-Cl) elektrot yerleştirildi. Makro manipülatörler ve mikro manipülatörler yardımıyla kesitlerde bulunan DRD nöronlarına suda immersiyon objektifi (63x) içeren DIC mikroskop (Resim 3.1) altında bakarak pipet ile yanaşıldı. Ardından insülin enjektörünün pistonu ile negatif basınç (vakum) uygulanarak pipet ucunun hücre zarına yapışması sağlandı, yani gigaseal pozisyonu elde edildi (Resim 3.5). Daha sonra daha büyük negatif basınç uygulanarak pipet ucundaki zarın delinmesi sağlandı. Bu şekilde nöron sitoplazması ile pipet solüsyonu arasında elektriksel iletkenlik kuruldu.



Resim 3.5: Serotonine duyarlı olan bir DRD nöronu ile mikrokapiller pipetin gigaseal pozisyonu (DIC mikroskop, 63x).

Hücre zarındaki tüm kanalları ve reseptörleri içerdiği ve dolayısıyla canlı hücreyi en iyi şekilde temsil ettiği için deneyler tüm-hücre konfigürasyonunda uygulandı. Bu konfigürasyonda akım kenetleme deneyleri ile hücrelerin istirahat zar potansiyeli ölçüldü ve ardından -56 pA ila +80 pA arasında akımlar verilerek aksiyon potansiyeli desenleri, pasif ve aktif zar özellikleri incelendi. Bu aşamadan sonra voltaj kenetleme kayıt modunda transmembran potansiyel ( $V_m$ ) -57 mV'da kenetlenerek zar akımlarının kayıtları alındı. Ayrıca akım izolasyonu için voltaj kenetleme protokolü yazıldı. Bu protokolde zar potansiyeli -120 mV ila -20 mV arasında 20 mV aralıklarla değişen adım potansiyellerde (step potential) kenetlenerek  $I_{5-HT}$  akımının karakteri incelendi.

Yama kenetleme deneylerinde Şekil 3.2'de gösterildiği üzere DRD nöronlarından kayıt alınması hedeflenmiştir. Kayıt alınan nöronlar şekilde presinaptik nöron olarak gösterilmiştir. Serotonin ve 8-OHDPAT uygulaması ile bu presinaptik nöronun somatodendritik bölgesinde bulunan serotonin reseptör tipi belirlenmiş ve bu nöronlarda ortaya çıkan iyon akımı karakterize edilmiş ve bu akımın pindolol ön uygulaması ile engellenmesi ve bunun mekanizmasının aydınlatılması amaçlanmıştır.



Şekil 3.2: Yama kenetleme tekniğinin dorsal rafe çekirdeği nöronu üzerine uygulamasının temsili çizimi. DRN'deki nöronların akson terminali ve somatodendritik bölgesinde bulunan SERT proteinleri serotonin geri alımını sağlamaktadır. Geri alım inhibitörü antidepresanlar ile bu proteinler inhibe olur ve nörosinaptik kavşakta olduğu gibi somatodendritik bölgede de serotonin miktarı artar. Bu durum somatodendritik 5-HT1A otoreseptörlerinin uyarılmasına neden olarak hücrelerin inhibisyonuna yol açmaktadır. Araştırmamızda presinaptik nöronların somatodendritik bölgelerinden kayıt alırken bu bölgeye serotonin (25  $\mu$ M) uygulanarak geri alım inhibitörü antidepresanların bölgede yol açtığı serotonin artışının bir benzeri modellenmeye çalışılmıştır.

### 3.6. Solüsyonların içeriği

Fizyolojik yBOS solüsyonu (mM olarak) 138 NaCl, 4.2 KCl, 2.4 CaCl<sub>2</sub>, 1.3 MgCl<sub>2</sub>, 10 Glikoz, 10 HEPES içermektedir. Bu solüsyon perfüzyon öncesi oksijen gazıyla (%100 O<sub>2</sub>) oksijenlendirildi ve pH'ı 1 M'lık NaOH ile 7.4'e ayarlandı. 20 mM potasyum klorür (KCl) içeren yBOS hazırlanırken potasyum, sodyum ile yer değiştirilerek osmolaritenin aynı kalması sağlanmıştır. Bu solüsyonda sodyum klorürün (NaCl) konsantrasyonu 122.2 mM olarak ayarlanmıştır. Kullanılan kimyasal maddelerden serotonin hidroklorid (25 $\mu$ M), kinin (Quinine, 1mM), WAY 100135 (21  $\mu$ M), pindolol (10  $\mu$ M) ve 8-OHDPAT (30  $\mu$ M) 100 mL'lik beherlerde yBOS çözeltisi içerisinde hazırlanmış ve solüsyonlar deneyler boyunca sürekli oksijenlendirilmiştir (Tablo 3.3).

Pipet solüsyonu ise (mM olarak) 110 potasyum glukonat, 9 EGTA, 4.5 MgCl<sub>2</sub>, 9 HEPES, 14 fosfokreatinin, 0.3 GTP, 4 ATP içermektedir. Solüsyonun pH'ı 7.35'e KOH ile ayarlanmıştır. Pipet solüsyonuna ATP, GTP ve fosfokreatinin eklenmesi sinir hücrelerinde uzun süre stabil kayıtların alınabilmesine olanak sağlamaktadır.

### 3.7. Perfüzyon sistemi

Yapılan deneylerde kullanılan pindolol dışındaki kimyasal maddeler Sigma Aldrich'ten satın alınmıştır. Pindolol Tocris Bioscience'tan temin edilmiştir. Akım kenetleme ve voltaj

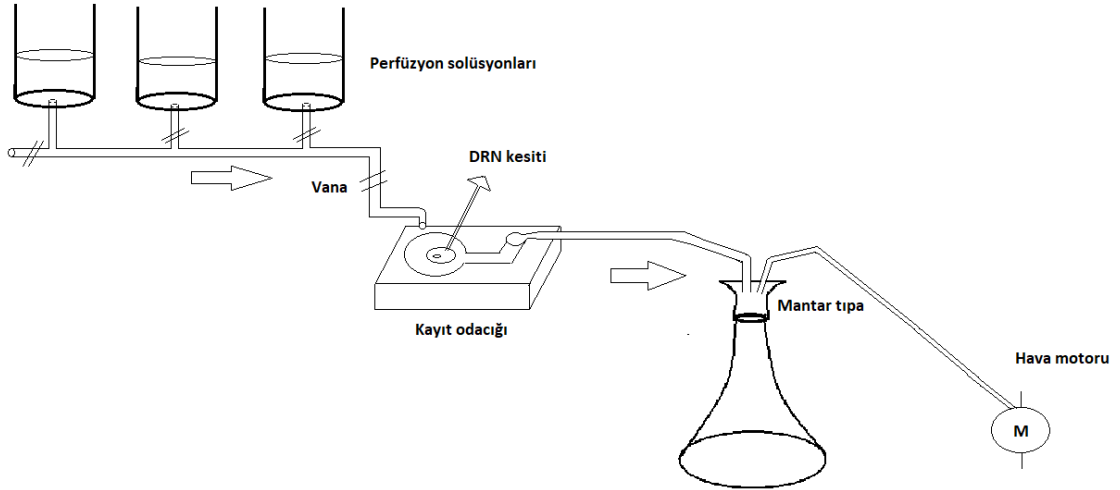


kenetleme deneyleri yapılırken serotonin hidroklorid, R(+)-8-Hydroxy-Dpat Hydrobromide (8-OHDPAT), WAY-100135, kinin ve pindolol gibi kimyasal ve farmakolojik maddeler yapay beyin omurilik sıvısı (yBOS) içeren perfüzyon solüsyonuna eklenerek DRD nöronları üzerine doğrudan etkisi incelenmiştir. Kayıt odacığına hedeflenen solüsyonun ulaşması için üç yol (3-way) vana sistemi kullanılmıştır (Resim 3.6). Kayıt odacığına gelen solüsyonun tahliyesi için mantar tıpa ile kapatılmış erlende hava pompasıyla negatif basınç oluşturularak bir vakum sistemi kurulmuştur. Vananın açılmasıyla kayıt odacığının bir ucuna taze oksijenlenmiş solüsyon gelirken ortasındaki olukta bulunan kesitin perfüzyonu sağlanmıştır. Kayıt odacığının diğer ucundan ise vakum sistemi ile bu solüsyon emilmektedir (Şekil 3.3). Akım kenetleme ve voltaj kenetleme deneyleri sırasında perfüzyon hızı 4 ml/dk olarak ayarlanmıştır.





Resim 3.6: Yama kenetleme deneylerinde kullanılan perfüzyon sisteminin fotoğrafı. Beherlerde standart yBOS, içerisinde serotonin çözülmüş olan yBOS ve içerisinde 8-OHDPAT çözülmüş olan yBOS bulunmaktadır. 8-OHDPAT ışıktan etkilendiği için bulunduğu beher ve bağlı bulunan boru sistemi alüminyum folyo ile kaplanmıştır. Beherde bulunan solüsyonlar sürekli olarak oksijenlendirilmiştir.



Şekil 3.3: Yama kenetleme deneylerinde kullanılan perfüzyon sisteminin şematik çizimi. Beherlerde hazırlanmış olan yBOS ve yBOS içerisine eklenen serotonin, pindolol vs. solüsyonları vana sistemi ile istenen zaman ve hızda kayıt odacığındaki kesite uygulanabilmektedir. Solüsyon kayıt odacığından geçtikten sonra negatif basınç ile emilmekte ve mantar tıpa ile kapatılmış erlenlerde biriktirilmektedir.

### 3.8. Hücrelerin tanımlanması

Rafe çekirdeğinde bulunan serotonerjik nöronları serotonerjik olmayanlardan ayıran belirli elektrofizyolojik özellikler bulunmaktadır (116). Serotonerjik nöronlarda aksiyon potansiyeli süresi daha uzundur. Ateşleme için aksiyon potansiyeli eşik değeri daha depolarize iken istirahat zar potansiyeli daha hiperpolarizedir. Serotonerjik nöronların aktivasyon aralığı (activation gap) daha geniştir. Ancak bu parametreler için standart hata oranı oldukça yüksektir. Bu hata oranı serotonerjik ve serotonerjik olmayan nöronlar arasında ayırım yapmayı zorlaştırmıştır (19, 110, 113). Sıçanlarda yapılan çalışmalarda membran zaman sabiti ve after hiperpolarizasyon (AHP) zaman sabiti değerleri serotonerjik nöronlarda daha büyük bulunmuştur (115). Ayrıca serotonerjik nöronların non-selektif 5-HT reseptör agonisti olan 5-CT (5-karboksiamidotriptamin)'ye serotonerjik olmayan nöronlara göre daha belirgin akım yanıtı verdiği gösterilmiştir (19, 110, 113). Bu tip özellikler elektrofizyolojik kayıt sırasında DRN hücrelerinin karakterize edilebilmesine yardımcı olabilmektedir. Bununla birlikte bir nöronun kesin olarak serotonerjik olup olmadığının ayırımına ancak immünohistokimya çalışmalarıyla hücrede triptofan hidroksilaz enziminin veya serotoninin varlığı gösterilerek ya da optogenetik teknikler yardımıyla immüno floresan görüntü altında varılabilir.

Sıçanlarda periaküaduktal gri cevher (PAG) bölgesindeki nöronlarda yapılan bir voltaj kenetleme çalışmasında nöronlar serotonine yanıt verip vermemelerine göre sınıflandırılmıştır (100). Yine sıçanlarda dorsal rafe çekirdeğindeki nöronlarda yapılan voltaj kenetleme çalışmalarında serotonine akım yanıt veren nöronlar belirlendikten sonra, bu nöronlarda ortaya çıkan akımın elektrofizyolojik ve farmakolojik özellikleri çalışılmıştır (118, 119).

Bu tez çalışmasında yama kenetleme deneylerinde; DRD nöronları, yama kenetleme deneyleri sırasında serotonin uygulamasına yanıt veren (serotonin reseptörü bulunduran) ve serotonin uygulamasına yanıt vermeyen (serotonin reseptörü bulundurmayan) nöronlar olarak sınıflandırılmıştır. Bu nöronların akım kenetleme şartlarında aktif ve pasif zar özellikleri incelenmiştir. Serotonine yanıt veren nöronlarda Tablo 3.3'de belirtilen deney düzenekleri uygulanmıştır.

Tablo 3.3: Serotonine yanıt veren nöronlarda uygulanan deney düzenekleri

Deney Formatı	Deney Grubu	Kullanılan madde	Araştırılan konu	
Akım kenetleme deneyleri		Serotonin	DRD nöronlarında bulunan somatodendritik serotonin reseptörlerinin varlığı 30 saniye süren serotonin (25 $\mu$ M) uygulaması ile araştırılmış ve istirahat zar potansiyeline olan etkisi incelenmiştir. Ayrıca serotonine yanıt veren ve vermeyen nöronların aktif ve pasif zar özellikleri araştırılmıştır (120,121).	
Voltaj kenetleme deneyleri	A.İyon kanalı düzeyindeki araştırmalar	A1.	Serotonin	İstirahat zar potansiyelinde değişikliğe yol açan akımın karakterize edilmesi için serotonin uygulaması sonucu farklı yBOS ortamlarında -57mV zar potansiyelinde ( $V_H$ ) ortaya çıkan zar akımı ölçülmüştür (120,121).
		A2.	Serotonin	Serotonin uygulaması ile zar akımına yol açan iyonun ortaya çıkarılması için voltaj kenetleme protokolü ile farklı adım potansiyellerinde standart yBOS ortamında serotonin ile indüklenen akım ( $I_{5-HT}$ ) ölçülmüştür. Aynı deneyler 20mM potasyum içeren yBOS ortamında da uygulanmıştır. $I_{5-HT}$ 'nin ters (reverse) potansiyeli ölçülmüş ve teorik olarak hesaplanan Nernst potansiyeli ile kıyaslanmıştır.
		A3.	Serotonin ve kinin	Serotonine cevap veren nöronlarda 200 saniye süre ile 1 mM kinin (GIRK kanal blokörü) uygulanarak $I_{5-HT}$ 'ye etkisi incelenmiştir (100).
	B.Reseptör düzeyindeki araştırmalar	B1.	Serotonin ve WAY-100135	Serotonine cevap veren nöronlarda 180 saniye süre ile WAY 100135 (21 $\mu$ M) uygulanarak $I_{5-HT}$ ' ye etkisi incelenmiştir (122,123).
		B2.	Serotonin ve pindolol	Serotonine cevap veren nöronlarda 150 saniye süre ile pindolol (10 $\mu$ M) uygulanarak $I_{5-HT}$ ' ye etkisi incelenmiştir (6).
		B3.	Serotonin ve 8-OHDPAT	Serotonine cevap veren nöronlarda 30 $\mu$ M 8-OHDPAT' ın (spesifik 5HT1A reseptör agonisti) etkisi araştırılmıştır (121,124).
		B4.	8-OHDPAT ve pindolol	Pindololün $I_{8-OHDPAT}$ 'a olan etkisi incelenmiştir (121,124).

Yama kenetleme deneylerinde kullanılan pindolol dışındaki kimyasal maddeler yBOS içerisinde çözülmüştür. Pindolol 0.1 M NaOH içerisinde çözülmüş ve ardından yBOS içerisine eklenmiştir. Solüsyonun pH değeri HCl ile 7.4'e tamponlandığı için NaOH bileşiminde bulunan OH<sup>-</sup> iyonunun kayıtlara etkisi olmayacaktır. NaOH bileşiminde yer alan Na<sup>+</sup> iyonu ise yBOS içerisinde 138 mM gibi yüksek konsantrasyonda sodyum içerdiği için çözücü olarak kullanılan NaOH içerisindeki Na<sup>+</sup> iyonunun konsantrasyonunun, yBOS'un Na<sup>+</sup> konsantrasyonu üzerine etkisi ihmal edilecek düzeyde kalmıştır. Burada çözücü olarak görev yapan NaOH etkisi elektrofizyolojik kayıt alınması sırasında solüsyon pH'ı kontrol altında tutulduğu için ve Na<sup>+</sup> konsantrasyonunda belirgin değişikliğe yol açmadığı için ihmal edilebilir.

### **3.9. Davranış deneyleri**

Pindololün serotonin reseptör blokör etkisi yama kenetleme çalışmalarıyla gösterildikten sonra antidepresan olan venlafaksini potansiyalize edebilme kapasitesi antidepresanların etkinliğinin test edilmesinde kullanılan kuyruk asma testi (KAT, tail suspension test), zorunlu yüzme testi (ZYT, forced swimming test) ve açık alan testi (AAT) ile araştırılmıştır. KAT ve ZYT testlerinde hayvanlar içinde buldukları durumdan kaçmayı dener ancak başarılı olamadıkları için umutsuz duygu durumuna (behavioral despair) kapılır ve hareketsiz kalmaya başlar. Hayvanların bu hareketsiz kaldığı süre immobilizasyon süresi olarak adlandırılır ve bu sürenin her hangi bir uygulama ile kısılması antidepresan etki olarak yorumlanmaktadır. KAT ve ZYT testlerinde antidepresan ajan ile ortaya çıkan immobilizasyon süresindeki değişikliğin lokomotor aktiviteden değil de duygudurumundan kaynaklandığının ispatlanması gerekir. Bu gerekçeyle KAT ve ZYT testi planlanan hayvan gruplarının lokomotor aktivitelerinin birbirine yakın değerde olması gerekmektedir. Bunun test edilmesi AAT ile mümkündür. AAT ile grupların lokomotor aktivitelerinin yakın değerde olduğu gösterilebilirse gruplar arasındaki immobilizasyon süresindeki farklılığın kaynağının lokomotor aktivitedeki değişikliğin değil de duygudurumdaki değişikliğin olduğu kabul edilebilir (125–127).

#### **3.9.1. İlaçların uygulanması**

KAT, ZYT ve AAT'yi içeren davranış deneylerinde hayvanlara venlafaksin, serum fizyolojik (SF) içerisinde çözüldükten sonra 20 mg/kg/gün dozunda subkutan (s.c.) yolla verildi. Pindolol, 0.1 M NaOH içerisinde çözdürüldükten sonra SF ile seyreltildi ve ardından 15

mg/kg/gün dozunda subkutan yolla verildi. Kontrol grubuna ise SF ve SF ile seyreltilmiş NaOH ayrı ayrı subkutan yolla verildi. Her gruba hem SF hem de NaOH içeren SF enjeksiyonunun yapılması sağlandı. Bu şekilde kontrol, venlafaksin, venlafaksin-pindolol ve pindolol grupları oluşturuldu.

### **3.9.2. Kuyruk asma testi**

Davranışsal umutsuzluğu (behavioural despair) tetiklemek için yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Antidepresan tedavi ile bu durum tersine çevrilebilmektedir. Fareler yapıştırıcı bant yardımıyla yerden 50 cm yükseklikte kuyruktan yapıştırılır (Resim 3.7). Hayvanlar kaçma davranışı gösterdikten sonra pasif bir şekilde hareketsiz kalır. Bu aşama immobilizasyon olarak kabul edilir. Farenin kabullendiği bu hareketsizlik süreci umutsuzluk safhasıdır ve mental depresyonu andırmaktadır. Hayvanlar pasif ve tamamen hareketsizken immobil olarak kabul edilir ve 6 dk uygulama içerisindeki immobilizasyon süresi ölçülür. Antidepresan ilaç uygulamaları tipik olarak immobilizasyon süresini düşürmektedir (128).

### **3.9.3. Zorunlu yüzme testi**

Zorunlu yüzme testi için 10 cm çapında 25 cm yüksekliğinde 19 cm derinlik oluşturacak kadar su ( $25 \pm 1$  °C) eklenen cam silindir kaplar hazırlandı (Resim 3.7) ve hayvanlar burada zorunlu yüzmeye tabi tutuldu (126,128). Testten 24 saat önce hayvanlar 15 dakika zorunlu yüzmeye tabi tutularak alışmaları sağlandı. Test günü 6 dakika süre ile zorunlu yüzme testi gerçekleştirildi. 6 dk sürenin son 4 dk'sındaki immobilizasyon süreleri ölçüldü (128).

ZYT testinde kaçma teşebbüslerinden sonra hayvan hareketsiz kalır. Bu hareketsizlik (immobilite) süreci umutsuzluk (despair) olarak adlandırılır. Hayvanlar bu aşamada kaçabilme umudunu kaybetmiştir. ZYT testi ilaçların antidepresan etkinliğinin test edilmesi için yaygın kullanıma sahiptir. Hayvanlar kaçma mücadelesini sonlandırıp hareketsiz bir şekilde başı yukarıda tutacak şekilde yüzdükleri sırada immobil olarak kabul edilir. Hayvan bu aşamada küçük hareketlerle başını yukarıda tutmaya çalışır. Antidepresan etkili ajanlar immobilite süresini anlamlı düzeyde düşürecektir (128).

KAT



ZYT



AAT



Resim 3.7: Kuyruk asma testi (solda), zorunlu yüzme testi (ortada) ve açık alan testi (sağda) örnekleri

#### 3.9.4. Açık alan testi

KAT ve ZYT testlerindeki immobilizasyon sürelerinin spesifik olmayan lokomotor aktivite değişikliklerinden kaynaklanmadığından emin olunması için açık alan testi ile hayvanların lokomotor aktivitelerinin ölçülmesi gerekmektedir. Bu kapsamda 50x50cm genişliğinde açık alan platformu (Resim 3.7) 16 kareye bölündü ve hayvanın bu kare alanlar arasındaki geçiş frekansı (crossing) ölçüldü (125,129). Aynı zamanda hayvanların orta alanda geçirdiği süre de ölçülerek lokomotor aktivite belirlendi. Hayvanlardan her kayıt alınmasından sonra açık alan platformu alkol solüsyonu ile temizlendi (127). AAT testinde grupların lokomotor aktivitelerinin birbirleriyle farklılık içermemesi; ZYT ve KAT testlerinde ortaya çıkan immobilizasyon sürelerindeki değişimin antidepresan etki ile ortaya çıktığını gösterecektir (125,127,128).

#### 3.10. İstatistiksel analiz

Yama kenetleme çalışmalarından elde edilen akım kenetleme ve voltaj kenetleme verileri pClamp paket programı kullanılarak elde edildi ve kayıt sonuçları istatistiksel olarak SPSS programı yardımı ile değerlendirildi. Elde edilen tüm veriler ortalama  $\pm$  standart hata formatında sunuldu. İstatistiksel anlamlı farklılık verilerin dağılımına göre parametrik (paired sample t testi, Student t testi) ve nonparametrik (Wilcoxon testi, Mann Witney U testi) testlerle test edildi. Gruplar arasında analiz sırasında  $p < 0.05$  şeklinde elde edilen sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı farklılık vardır şeklinde değerlendirildi. Grafikler Origin Pro. yazılım programı kullanılarak hazırlandı. Davranış deneylerinden

açık alan testinde veriler Ethovision programı kullanılarak elde edildi. KAT ve ZYT testlerinin verileri kamera kayıtları ve kronometre kullanılarak elde edildi. Elde edilen tüm veriler ortalama  $\pm$  standart hata formatında sunuldu. Verilerin istatistiksel analizi SPSS programı yardımıyla one way ANOVA testi ile yapıldı. Gruplar arasında analiz sırasında  $p < 0.05$  şeklinde elde edilen sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı farklılık vardır şeklinde değerlendirildi. Grafikler Origin Pro. yazılım programı kullanılarak hazırlandı.

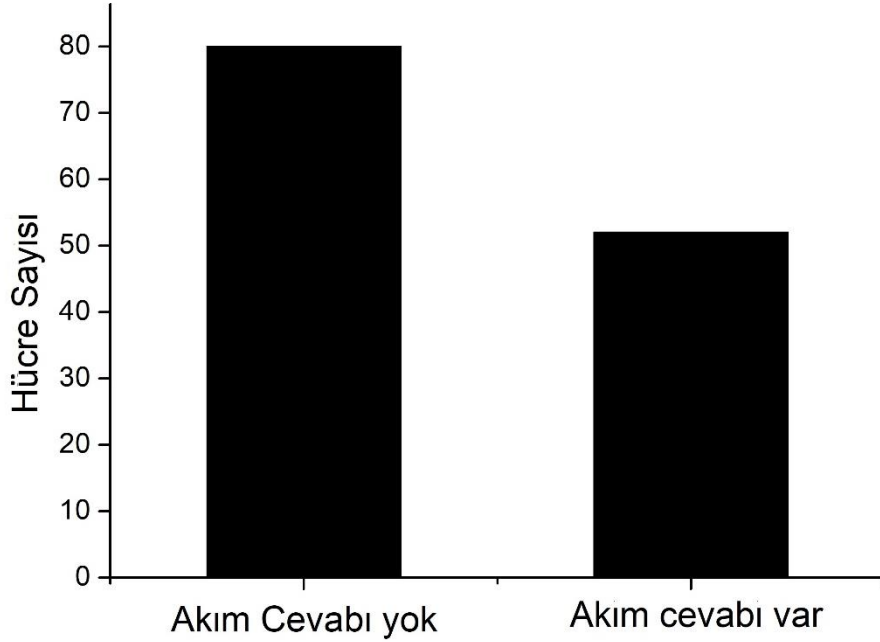




## 4. BULGULAR

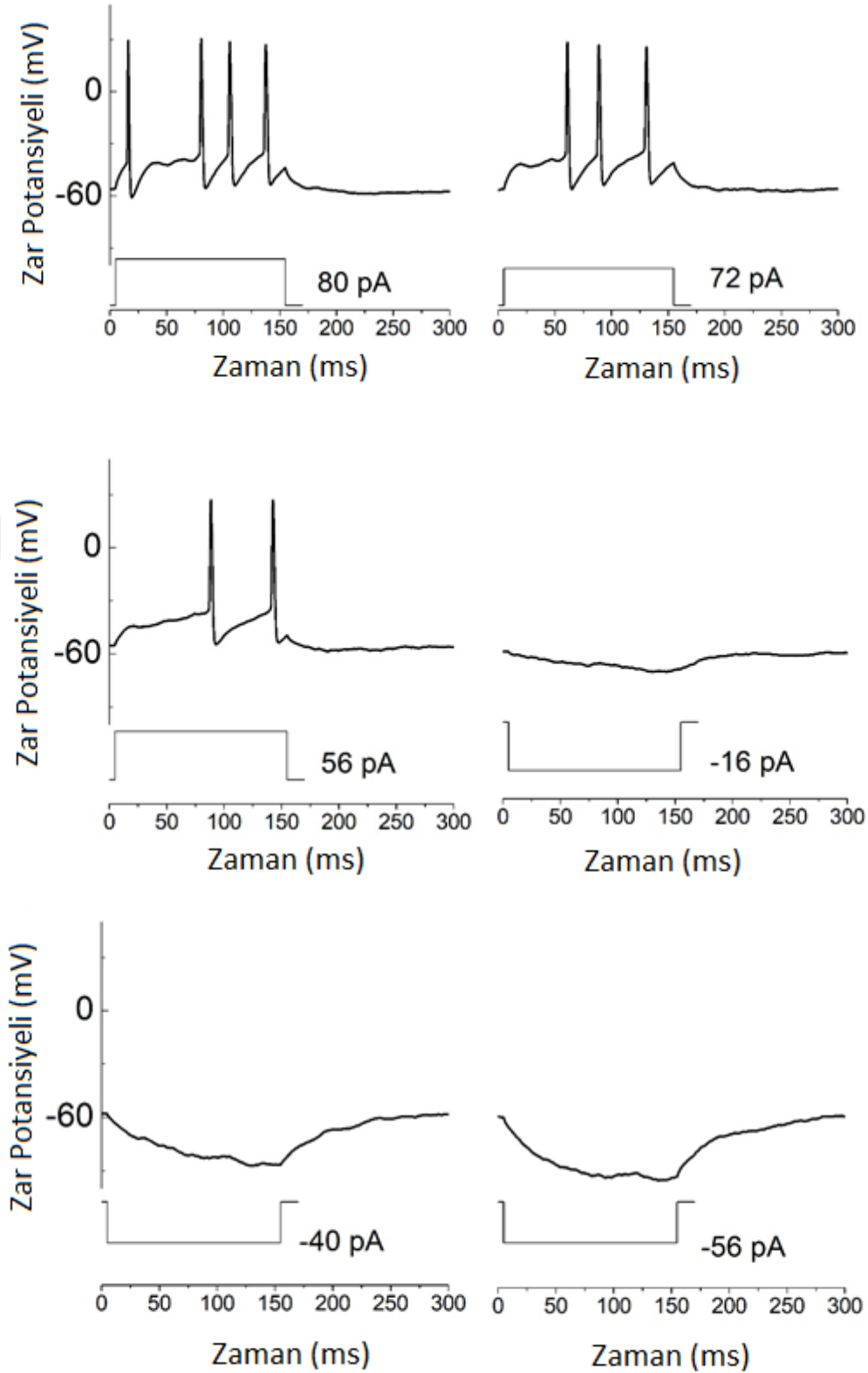
### 4.1. *İn vitro* yama kenetleme deneyleri

Yapılan araştırmada DRD nronları serotonin (25  $\mu$ M) uygulamasına akım kenetleme deneylerinde hiperpolarizasyon oluşturma veya voltaj kenetleme deneylerinde dışa doğru (outward) zar akımı oluşturmalarına g-re iki gruba ayrılmıştır. Bu amaçla yapılan deneylerde kayıt alınan 80 h-cre (%60.6) serotonin uygulamasına yanıt vermezken 52 h-cre (%39.4) serotonin uygulamasına yanıt vermiştir (şekil 4.1).



şekil 4.1: DRD nronlarının serotonine akım cevabı verme oranları.

**4.1.1. DRD nronlarının aksiyon potansiyeli desenleri, aktif ve pasif zar özellikleri**  
DRD nronlarından akım kenetleme şartlarında kayıt alınarak nronların aksiyon potansiyeli desenleri incelenip aktif ve pasif zar özellikleri belirlenmiştir. Bu h-crelere 80 pA'den başlayıp -56 pA'e kadar azalan akım enjeksiyonları uygulanmıştır. Verilen pozitif akımın şiddeti arttıkça meydana gelen aksiyon potansiyelinin sayısı artmaktadır. Negatif akım verildiği sırada ise zar potansiyeli hiperpolarize olmaktadır (şekil 4.2).



Şekil 4.2: Serotonin uygulamasına cevap veren bir nöronda kare puls akım enjeksiyonlarına (+80,+72,+56, -16,-40,-56 pA) verilen voltaj yanıtları. +80 pA akım enjeksiyonu 4 adet AP'ye neden olurken +72 pA enjeksiyon 3 adet AP'ye neden olmuştur.+56 pA enjeksiyon 2 adet AP'ye neden olurken daha düşük değerdeki enjeksiyonlar AP eşliğini aşmaya yeterli olamamıştır. Verilen negatif akım miktarı arttıkça zar potansiyelindeki hiperpolarizasyon miktarı derinleşmektedir.

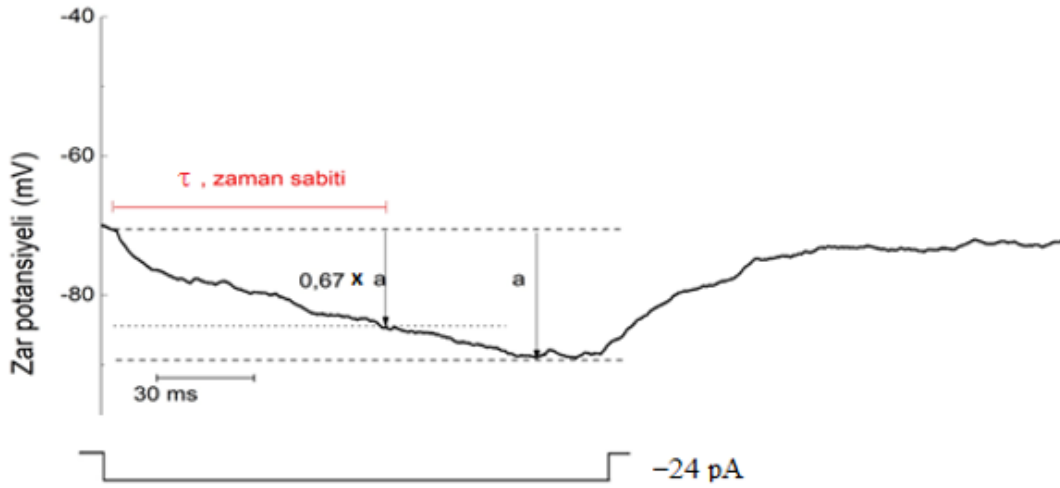
Pasif zar özellikleri arasında istirahat zar potansiyeli, zar kapasitansı, input direnci ve zaman sabiti ( $\tau$ ) yer alır. İstirahat zar potansiyeli, bir nöronun herhangi bir sinaptik input almadığı veya akım enjeksiyonunun yapılmadığı istirahat durumunda sahip olduğu zar potansiyelidir. Zar kapasitansı ( $C$ ), hücre zarının bünyesinde yük tutabilme kapasitesi olup hücrenin yüzey alanıyla orantılıdır. Zar kapasitansı sinaptik aktivitenin süresini etkiler ve aksiyon potansiyeli iletilme hızını belirler.

İnput direnci ( $R_{in}$ ), hücreye verilen akımın elde edilen voltaj değişimine oranıdır. Hücrenin büyüklüğü ve hücre zarında bulunan iyon kanallarının ne oranda açık olduğuna bağlıdır. Ohm denklemi ( $R= V/I$ ) ile hesaplanır. Bu denklemdeki “ $V$ ” hücrenin voltaj yanıtının büyüklüğünü, “ $I$ ” hücreye verilen akımın genliğini ve “ $R$ ” ise hücrenin input direncini ifade etmektedir. Hücrenin daha büyük olması yüzey alanının arttığı ve dolayısıyla açık haldeki iyon kanalları sayısının arttığı ve böylece hücrenin input direncinin küçük olması anlamına gelir. İnput direnci sinaptik inputa cevaben eşik değere ne kadar kolay veya zor ulaşacağını belirlediğinden dolayı fonksiyonel açıdan önemlidir.

Membran zaman sabiti ( $\tau$ ), zar potansiyelinin, negatif akım enjeksiyonu sonucu ortaya çıkan hiperpolarizasyonun genliğinin %67 seviyesine ulaşma süresidir. Zaman sabitinin küçük olması nöronun voltaj değişiminin hızlı gerçekleşmesi anlamına gelir. Kapasitans, input direnci ve membran zaman sabiti arasındaki ilişki aşağıdaki formülde verilmiştir.

$$\tau = C \times R_{in} \dots\dots\dots (1)$$

Formüldeki  $\tau$ , zaman sabiti;  $C$ , kapasitans ve  $R_{in}$ , input direncidir. Zaman sabitinin hesaplanması Şekil 4.3’te bir örnekle gösterilmiştir.



Şekil 4.3: Negatif akım enjeksiyonu yapılan bir hücrede membran zaman sabiti ( $\tau$ ) ölçümü. Öncelikle verilen negatif kare puls akımdan kaynaklanan hiperpolarizasyonun maksimum genliği ( $a$ ) ölçülür. Daha sonra bu maksimum değerın %67'sine ulaştığı zaman belirlenir. Zar potansiyelinin akım enjeksiyonunun başlangıcından bu noktaya ulaşmasına kadar geçen süre membran zaman sabitini vermektedir.

Serotonin uygulamasına voltaj yanıt veren ve vermeyen nöronların bahsedilen bu zar özellikleri Tablo 4.1'de verilmiştir.

Tablo 4.1: DRD nöronlarının pasif zar özellikleri

Serotonine yanıt	İstirahat zar potansiyeli (mV)	Kapasitans (pF)	İnput direnci (M $\Omega$ )	Zaman sabiti ( $\tau$ , ms)
Serotonin uygulamasına yanıt veren nöronlar (n=11)	-69.2 $\pm$ 3.5	70.1 $\pm$ 16.4	793.5 $\pm$ 102.9	45.2 $\pm$ 4.9
Serotonin uygulamasına yanıt vermeyen nöronlar (n=9)	-60.9 $\pm$ 1.9	69.4 $\pm$ 24.5	1452.3 $\pm$ 337,5	53.1 $\pm$ 7.1
İstatistiksel analiz	p = 0.069 Student t testi	p = 0.980 Mann-Witney U testi	p = 0.093 Student t testi	p = 0.359 Student t testi

Aktif zar özellikleri ise aksiyon potansiyeli (AP) genliği, aksiyon potansiyeli eşiği, AP yarı-yükseklik genişliği değeri ve geç hiperpolarizasyon (AHP) genliğidir. Yarı-yükseklik genişliği değeri zar potansiyeli AP genliğinin yarısına ulaştığındaki voltaj

değerleri arasındaki süredir. Serotonin uygulamasına voltaj cevabı veren ve vermeyen nöronların aktif zar özellikleri Tablo 4.2’de verilmiştir.

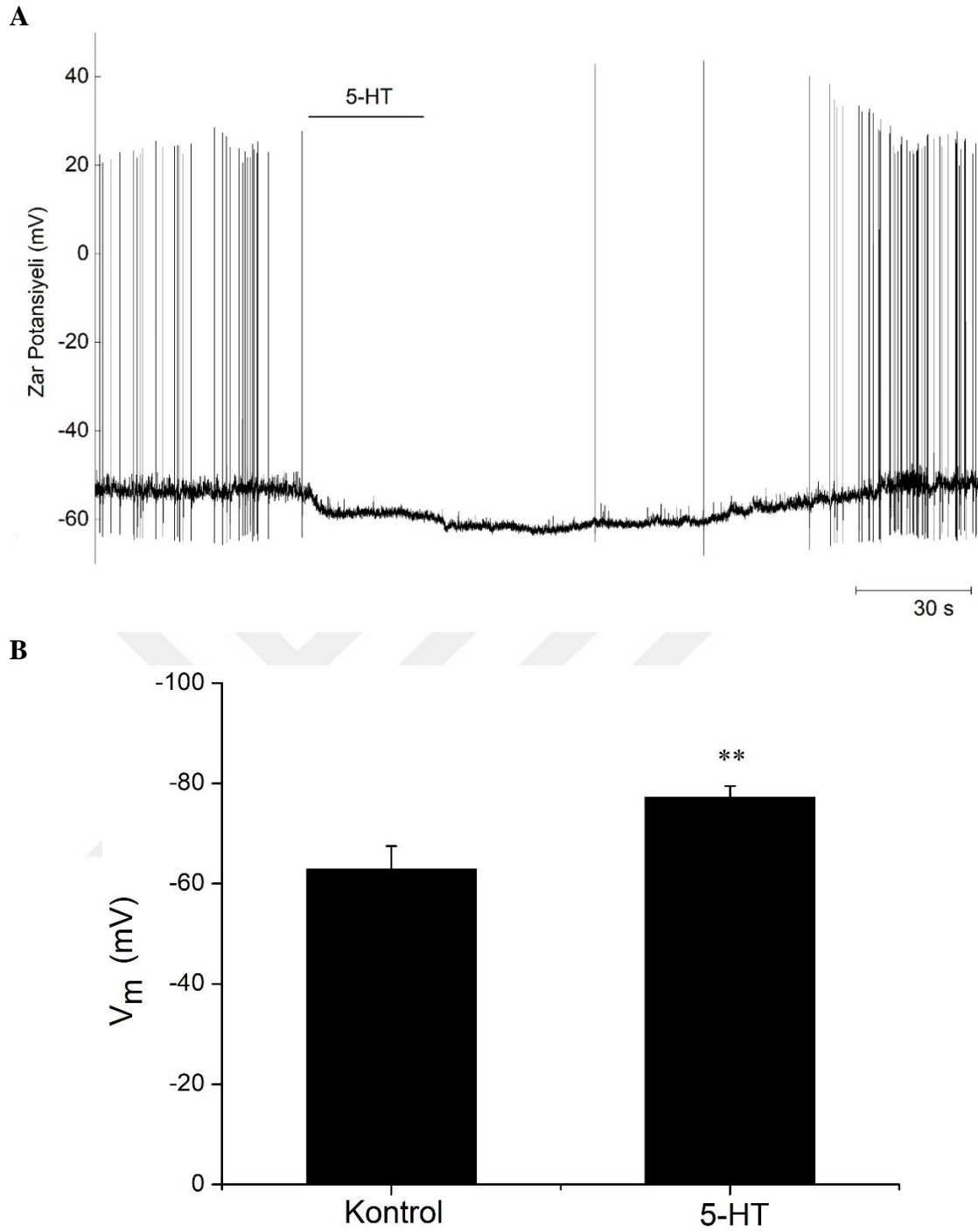
Tablo 4.2: DRD nöronlarının aktif zar özellikleri

Serotonine yanıt	AP genliği (mV)	AP eşiği (mV)	AP yarı-yükseklik genişliği (ms)	AHP (mV)
Serotonin uygulamasına yanıt veren nöronlar (n=11)	82.5 ± 3.9	-46.6 ± 2.1	1.6 ± 0.4	24.7 ± 3.5
Serotonin uygulamasına yanıt vermeyen nöronlar (n=9)	70.1 ± 5.0	-45.3 ± 1.6	1.6 ± 0.3	27.2 ± 5.4
İstatistiksel analiz	p =0.062 Student t testi	p =0.646 Student t testi	p =0.152 Mann-Witney U testi	p = 1.000 Mann-Witney U testi

DRD nöronlarında serotonine yanıt veren ve serotonine yanıt vermeyen nöronlar arasında pasif ve aktif zar özellikleri açısından istatistiksel anlamlı bir farklılık saptanmamıştır.

#### 4.1.2. Serotonin DRD nöronlarının zar potansiyeli üzerine etkisi

Bu aşamadan sonraki deneyler serotonin uygulamasına cevap veren dorsal rafe çekirdeği dorsal altçekirdek nöronları üzerinde uygulanmıştır. Akım kenetleme kayıtları sırasında spontan aksiyon potansiyeli olan nöronlarda serotonin uygulaması spontan aksiyon potansiyellerinin sonlanmasına yol açmıştır ve yıkama ile spontan aktivite tekrar ortaya çıkmıştır (n=4). Serotonin (25 µM) uygulaması ile nöronlarda 14.30 ± 3.14 mV (n=9) kadar hiperpolarizasyon ortaya çıkmıştır. Zar potansiyeli -62.9 ± 4,6 mV değerinden -77,2 ± 2,3 mV değerine kadar düşmüştür (n=9, p < 0.01, Paired sample test). Yıkama ile istirahat zar potansiyeli tekrar eski haline dönmüştür. Şekil 4.4A’da serotonin uygulaması ile normalde görülen spontan aksiyon potansiyellerinin oluşmadığı izlenmektedir. Şekil 4.4B’de ise dokuz adet nörondan alınan akım kenetleme kaydı sırasında serotonin uygulaması ile zar potansiyelinde ortaya çıkan değişiklik bar grafikte gösterilmiştir.



Şekil 4.4: Akım kenetleme şartlarında 5-HT uygulamasının etkisi. **A:** Akım kenetleme kaydı sırasında 30 s boyunca serotonin ( $25 \mu\text{m}$ ) uygulaması ile istirahat zar potansiyelinde hiperpolarizasyon meydana gelmiş ve spontan aksiyon potansiyelleri sona ermiştir. Serotonin uygulamasının sona ermesiyle birlikte istirahat zar potansiyeli tekrar eski haline gelmiş ve spontan aksiyon potansiyeli oluşması için gereken eşik değere yaklaşmıştır. Bu durum spontan aktivitenin tekrar ortaya çıkmasıyla sonuçlanmıştır. **B:** Kontrol grubu standart yBOS solüsyonu içerisinde ölçülen istirahat zar potansiyeli değerlerinin ortalamasını, 5-HT grubu ise serotonin uygulaması sırasında ölçülen istirahat zar potansiyeli değerlerinin ortalamasını temsil etmektedir. Serotonin uygulaması DRD hücrelerinin istirahat zar potansiyelinde hiperpolarizasyona yol açmıştır ( $n=9$ ,  $p < 0.01$ , Paired sample test).

### **4.1.3. Serotonin DRD nöronlarının zar akımları üzerine olan etkisi**

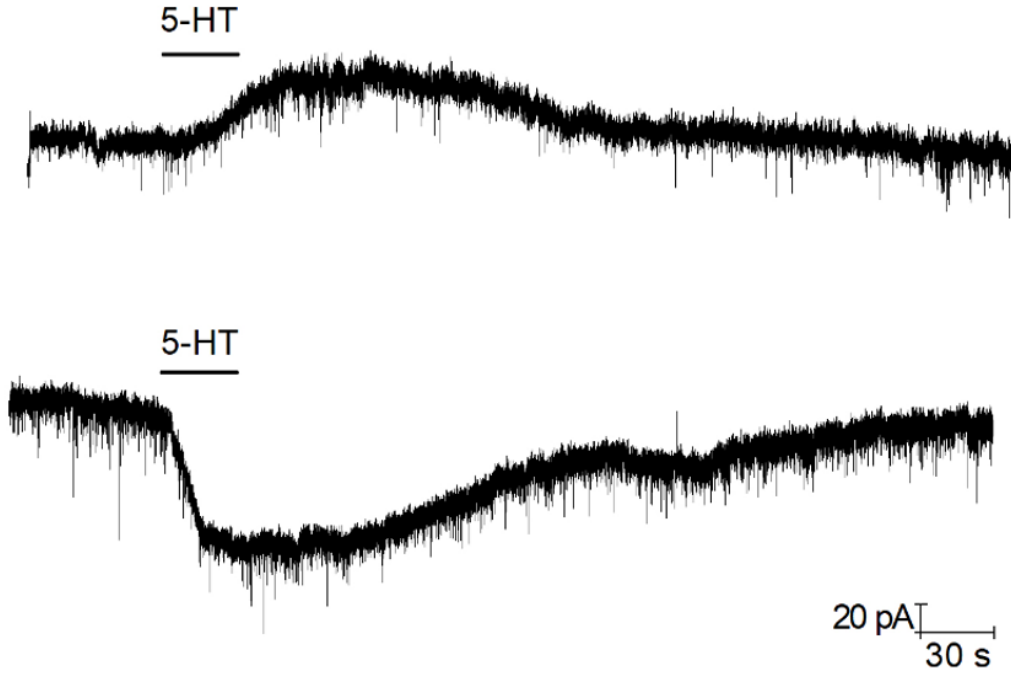
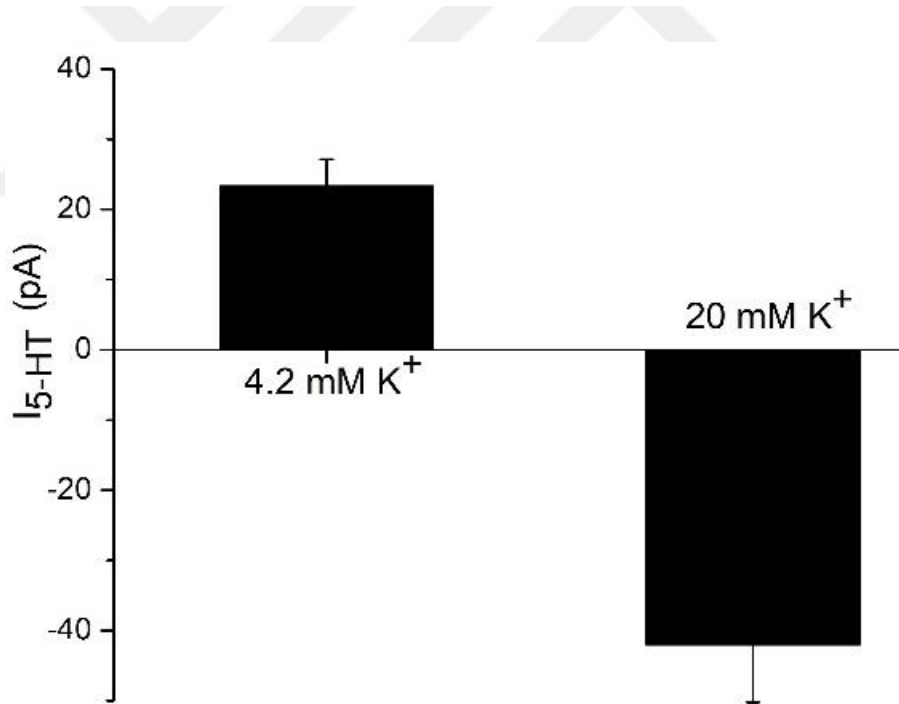
#### **A) Serotonin indüklediği iyon akımının karakterizasyonu**

##### **Standart yBOS içerisinde serotonin uygulaması ile ortaya çıkan akım cevabı**

Voltaj kenetleme deneyleri sırasında zar potansiyeli  $-57\text{mV}$ 'da tutulurken standart yBOS içerisinde serotonin uygulaması ile  $23.36 \pm 3.79 \text{ pA}$  ( $n= 27$ ) dışa doğru (outward) akım ortaya çıktı (Şekil 4.5B). Şekil 4.5A üstteki grafikte  $4.2 \text{ mM}$  potasyum içeren yBOS ortamında serotonin uygulaması ile DRD nöronlarında indüklenen dışa doğru akım gösterilmektedir.

##### **Potasyumdan zengin yBOS ortamında serotonin uygulaması ile ortaya çıkan akım cevabı**

DRD nöronları  $20 \text{ mM}$  potasyum içeren yBOS solüsyonu ortamında iken ve zar potansiyeli  $-57 \text{ mV}$  da tutulurken  $30$  saniye süre ile serotonin ( $25 \mu\text{M}$ ) uygulaması  $42 \pm 13.7 \text{ pA}$  ( $n=6$ ) içe doğru (inward) akıma yol açmıştır (Şekil 4.5B). Bu akımın genliği Şekil 4.5A'da alttaki grafikte de görüldüğü gibi standart yBOS ortamında ortaya çıkan dışa doğru akımın genliğinden daha büyüktür ve akımın yönü tersine dönmüştür. Diğer bir ifade ile akımın yönü hücre içinden dışına doğru değil hücre dışından içine doğru olmuştur. Hücre içi ile hücre dışı arasındaki potasyum iyonu konsantrasyon farkının azalması elektrokimyasal güçlerin dengesini değiştirdiği için akımın yönü değişmiştir. Bu durum serotonin uygulaması ile ortaya çıkan akımın iki yönlü ve içe doğru düzeltici tipte bir akım olduğunu göstermektedir.

**A****B**

Şekil 4.5: Voltaj kenetleme şartlarında serotoninin uygulaması. **A:** 4.2 mM potasyum içeren yBOS ortamında  $I_{5-HT}$  (üstte) ve 20 mM potasyum içeren yBOS ortamında  $I_{5-HT}$  (altta) gösterilmektedir. Her iki grafikte de serotonin (25  $\mu$ M) uygulama süresi 30 s,  $V_H = -57$  mV dır. **B:** Serotoninin uygulaması ile ortaya çıkan ortalama akım değerleri bar grafiği ile gösterilmektedir. 4.2 mM potasyum iyonu içeren yBOS ortamında serotoninin 23 pA'lık dışa doğru akım oluşmasına neden olmuştur. Diğer taraftan 20 mM potasyum iyonu içeren yBOS ortamında serotoninin 42 pA'lık içe doğru akıma yol açmıştır.



## DRD nöronlarında serotonin ile indüklenen akım-voltaj ilişkisi

Zardan geçen herhangi bir iyondan kaynaklanan akımın sıfırlandığı potansiyele ters (reverse) potansiyel denir. Ters potansiyel herhangi bir iyonun Nernst potansiyeli (equilibrium potansiyeli) ile yakın değerde ise bu zar akımı bu iyondan kaynaklanıyor demektir. Potasyum iyonu için Nernst potansiyelinin hesaplanmasında kullanılan formül aşağıda verilmiştir.

$$E_K = \frac{RT}{F} \ln \frac{[K]_o}{[K]_i} \dots\dots\dots 2$$

$E_K$ : Potasyumun Nernst potansiyeli (Volt)      R: Evrensel gaz sabiti  
T: Mutlak sıcaklık (Kelvin)      F: Faraday sabiti  
 $K_o$ : Potasyumun hücre dışı derişimi (M)       $K_i$ : Potasyumun hücre içi derişimi (M)

$I_{5-HT}$ 'nin ters potansiyelini belirlemek ve potasyumun Nernst potansiyeliyle kıyaslamak amacıyla voltaj kenetleme protokolü yazıldı. Bu protokol ile hücre -120 mV dan başlayıp -20 mV'a kadar yükselen farklı adım potansiyellerde kenetlenirken serotonin ile indüklenen akım ( $I_{5-HT}$ ) ölçüldü. Bu deney iki ayrı yBOS perfüzyon solüsyonu ortamında da (4.2mM  $K^+$  ve 20mM  $K^+$ ) gerçekleştirildi (Şekil 4.6A-4.7A). Serotonin kaynaklı akımın ( $I_{5-HT}$ ) ters potansiyelleri belirlendi. Her iki solüsyonun da potasyum için Nernst eşitliği formülünden yararlanılarak Nernst potansiyelleri hesaplandı.

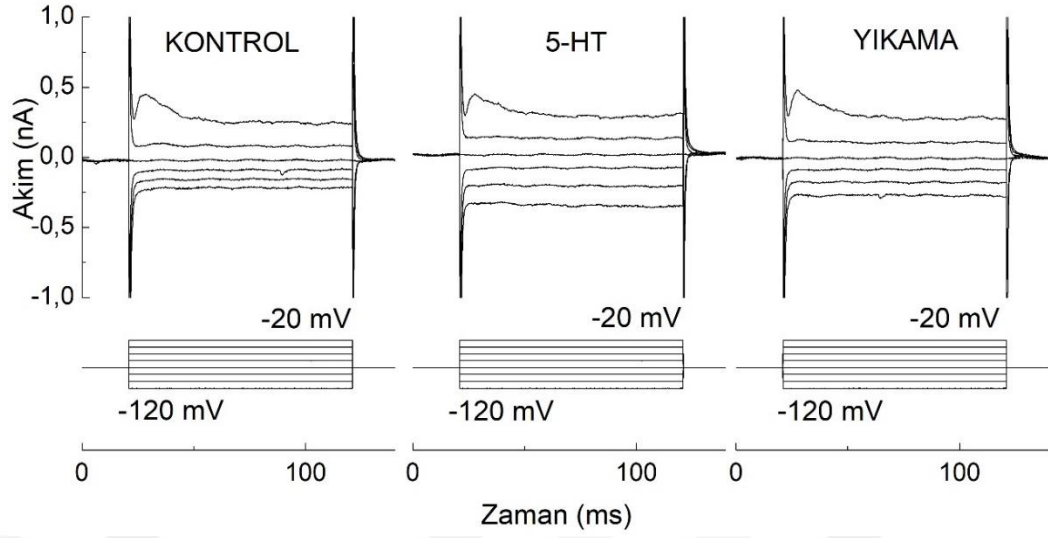
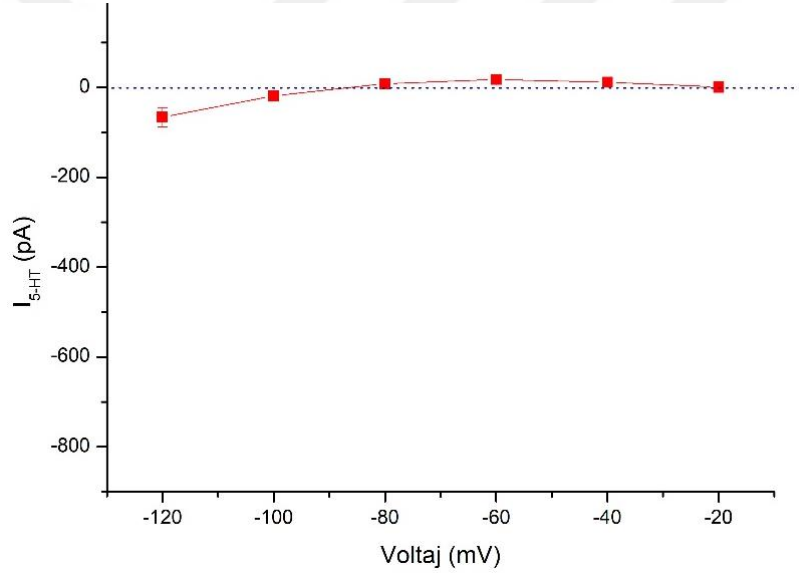
Standart yBOS solüsyonu ortamında (4.2 mM potasyum iyonu içerir) Nernst potansiyeli -82.4 mV olarak hesaplanmıştır (Formül 2). Deneysel olarak ters potansiyel ise -81.0 mV olarak ölçülmüştür (Şekil 4.8). Potasyumdan zengin yBOS solüsyonu ortamında (20 mM potasyum iyonu içerir) Nernst potansiyeli -43.0 mV olarak hesaplanmış (Formül 2) ve ters potansiyel -46.4 mV olarak ölçülmüştür (Şekil 4.8). Her iki durumda da hesaplanan Nernst potansiyelleri ile ölçülen ters potansiyellerin birbirine yakın değerlerde olduğu görülmektedir. Bu durum serotonin ile indüklenen akıma neden olan iyonun potasyum iyonu olduğunu göstermektedir (Şekil 4.8). Ayrıca içe doğru olan akımların genliğinin dışa doğru olan akımlardan daha büyük olması serotonin ile indüklenen akımın içe doğru düzeltici bir potasyum akımı olduğunu göstermektedir (Şekil 4.8). Tablo 4.3'de hesaplanan Nernst potansiyelleri ile ölçülen  $I_{5-HT}$  ters potansiyeli değerleri ve belirli adım potansiyellerinde ölçülen  $I_{5-HT}$  değerleri verilmektedir. Tabloda da görüldüğü gibi -120 mV'da ortaya çıkan içe doğru akım değerleri, standart yBOS ortamında -60 mV adım potansiyelinde ortaya çıkan dışa doğru akımdan ve potasyumdan zengin yBOS ortamında -40 mV adım potansiyelinde ortaya çıkan dışa doğru akım değerlerinden daha büyüktür.

Bu bulgular, DRD nöronlarında serotonin ( $25\mu\text{M}$ ) ile indüklenen akımın ( $I_{5\text{-HT}}$ ) içe doğru düzeltici potasyum akımı olduğunu göstermektedir.

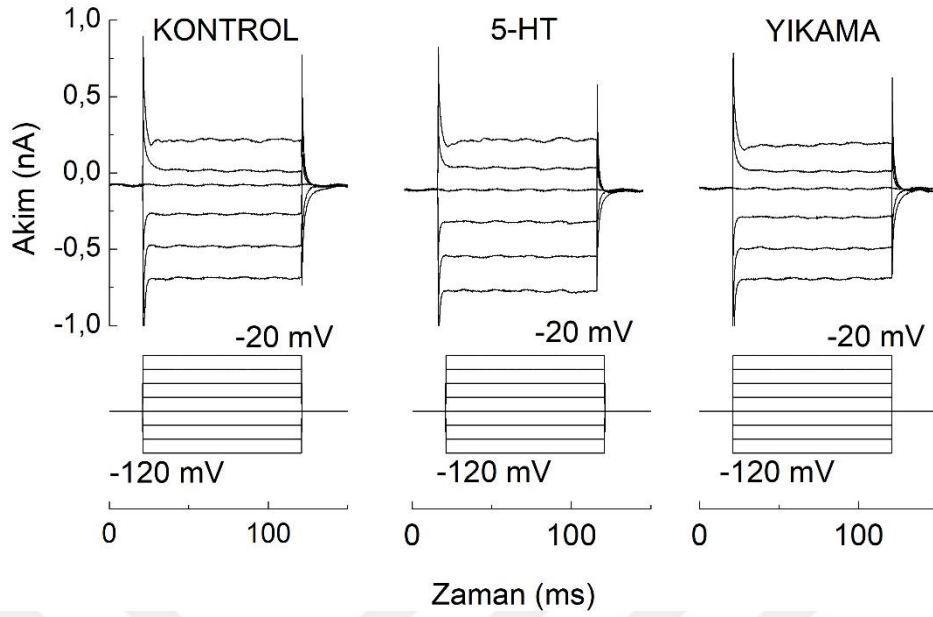
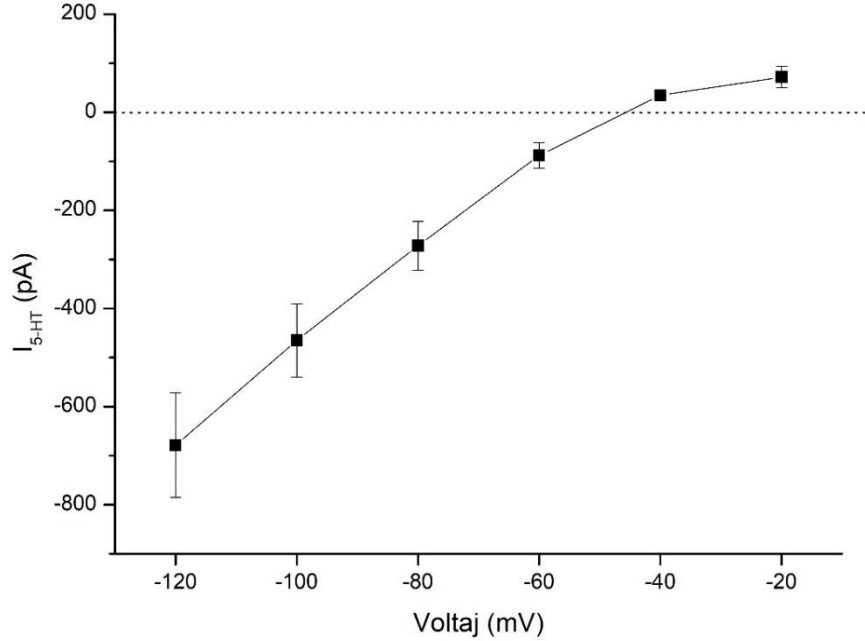
Tablo 4.3: DRD nöronlarında standart ve potasyumdan zengin yBOS solüsyonlarında  $I_{5\text{-HT}}$  için ölçülen ters potansiyeller ve hesaplanan Nernst potansiyellerinin karşılaştırılması

yBOS türü	Nernst potansiyeli (mV)	$I_{5\text{-HT}}$ ters potansiyeli (mV)	-120 mV da ölçülen akım (pA)	-60 mV da ölçülen akım (pA)	-40 mV da ölçülen akım (pA)
4.2mM $\text{K}^+$ içeren yBOS	-82.4	$-81.0 \pm 3.9$	$-65.8 \pm 21,3$	<b><math>17.3 \pm 6.5</math></b>	$11.5 \pm 6.0$
20 mM $\text{K}^+$ içeren yBOS	-43.0	$-46.4 \pm 1.8$	$-678.8 \pm 106,5$	$-88.2 \pm 26.1$	<b><math>34.3 \pm 7.0</math></b>

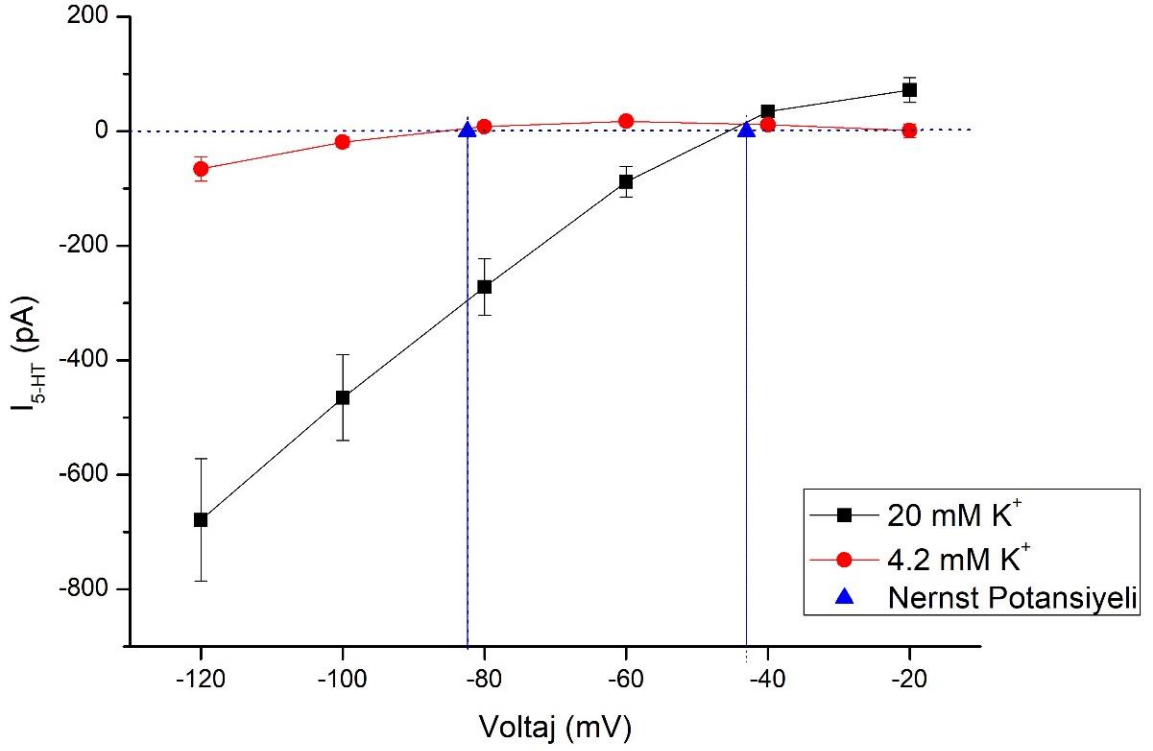
4.2 mM  $\text{K}^+$  içeren yBOS içerisinde potasyumun Nernst potansiyeli  $-82.40$  mV'dur. Bu solüsyon içerisinde ölçülen  $I_{5\text{-HT}}$  ters potansiyeli ise  $-81.0$  mV'dur. 20 mM  $\text{K}^+$  içeren yBOS içerisinde potasyumun Nernst potansiyeli  $-43,03$  mV'dur. Bu solüsyon içerisinde ölçülen  $I_{5\text{-HT}}$  ters potansiyeli ise  $-46.4$  mV'dur. Tabloda görüldüğü gibi  $I_{5\text{-HT}}$  ters potansiyelleri ile belirtilen solüsyonlar için potasyumun hesaplanan Nernst potansiyelleri birbirine yakındır. Bu durum serotoninin ortaya çıkardığı akımın potasyum iyonu kaynaklı olduğunu göstermektedir. Ayrıca farklı adım potansiyellerinde ölçülen akımlarda içe doğru olan akımlar dışa doğru olan akımlardan daha büyüktür. Bu durum bu akımın içe doğru düzeltici bir akım (inward rectifier) olduğunu göstermektedir. Standart yBOS solüsyonunda  $-60$  mV adım potansiyelinde ortaya çıkan akım  $-120$  mV da ortaya çıkan akımdan daha küçüktür. Potasyumdan zengin yBOS solüsyonunda  $-40$  mV adım potansiyelinde ortaya çıkan akım  $-120$  mV da ortaya çıkan akımdan daha küçüktür.

**A****B**

Şekil 4.6: Voltaj kenetleme protokolüyle  $I_{5-HT}$ 'nin karakterizasyonu (normal yBOS). **A:** 4.2 mM  $K^+$  içeren yBOS ortamında voltaj kenetleme protokolü sonucu standart yBOS, 5-HT içeren yBOS ve tekrar standart yBOS solüsyonu ortamında ortaya çıkan akım değerleri görülmektedir. Her grafiğin altında uygulanan voltaj kenetleme protokolü yer almaktadır. Perfüzyon solüsyonuna serotonin eklendiği sırada farklı adım potansiyellerinde ölçülen akım değerleri artmıştır. Her adım potansiyelinde serotonin uygulaması ile ölçülen akım değerlerinden sadece standart yBOS uygulaması sırasında ölçülen akım değerleri çıkarılarak  $I_{5-HT}$  elde edilmiş ve ortalama  $\pm$  standart hata formatında şekil B'deki grafikte verilmiştir. **B:** Farklı adım potansiyellerinde  $I_{5-HT}$ . Voltaj kenetleme protokolü uygulaması ile hem serotonin içermeyen hem de serotonin içeren iki ayrı yBOS ortamında hücre zarından geçen akım voltaj kenetleme şartlarında ölçüldü. Serotonin içeren solüsyondaki akım miktarından serotonin içermeyen solüsyonda elde edilen akım miktarı çıkarılarak farklı adım potansiyellerinde ortaya çıkan serotonin ile indüklenen akım hesaplandı. Grafikteki değerler bu akımın ortalama  $\pm$  standart hata değerlerini vermektedir. Akımın yön değiştirdiği -81.0 mV değeri ters potansiyel olarak belirlendi. Ters (reverse) potansiyelden daha pozitif adım potansiyellerinde ortaya çıkan dışa doğru akım ters potansiyelden daha negatif potansiyellerde ortaya çıkan içe doğru akımdan çok daha küçüktür. Elde edilen bu veriler  $I_{5-HT}$ 'nin içe doğru düzeltici (inward rectifier) bir akım olduğunu göstermektedir. Bu değerler altı adet ölçümün ortalama değeridir.

**A****B**

Şekil 4.7: Voltaj kenetleme protokolüyle  $I_{5-HT}$ 'nin karakterizasyonu (potasyumdan zengin yBOS). **A:** 20 mM  $K^+$  içeren yBOS ortamında voltaj kenetleme protokolü sonucu standart yBOS, 5-HT içeren potasyumdan zengin yBOS ve tekrar potasyumdan zengin yBOS solüsyonu ortamında ortaya çıkan akım değerleri görülmektedir. Her grafiğin altında uygulanan voltaj kenetleme protokolü yer almaktadır. Perfüzyon solüsyonuna serotonin eklendiği sırada farklı adım potansiyellerinde ölçülen akım değerleri artmıştır. **B:** Akım-voltaj ilişkisi. Serotonin içeren solüsyondaki akım miktarından serotonin içermeyen solüsyonda elde edilen akım miktarı çıkarılarak farklı adım potansiyellerinde ortaya çıkan serotonin ile indüklenen akım hesaplandı. Grafikteki değerler bu akımın ortalama  $\pm$  standart hata değerlerini vermektedir. Akımın yön değiştirdiği  $-46.4$  mV değeri ters potansiyel olarak belirlendi. Ters (reverse) potansiyelden daha pozitif adım potansiyellerinde ortaya çıkan dışa doğru akım ters potansiyelden daha negatif potansiyellerde ortaya çıkan içe doğru akımdan çok daha küçüktür. Elde edilen bu veriler  $I_{5-HT}$ 'nin içe doğru düzeltici (inward rectifier) bir akım olduğunu göstermiştir. Bu değerler beş adet ölçümün ortalama değeridir.



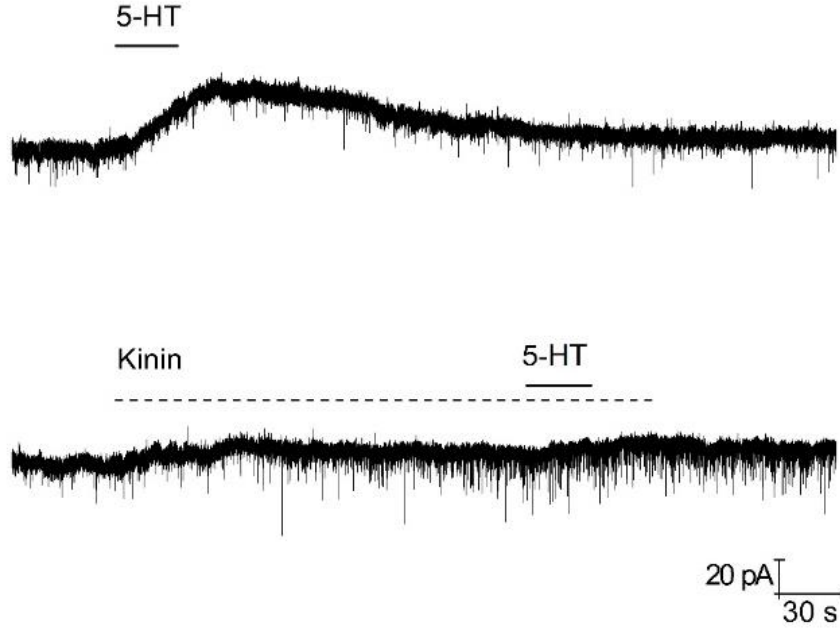
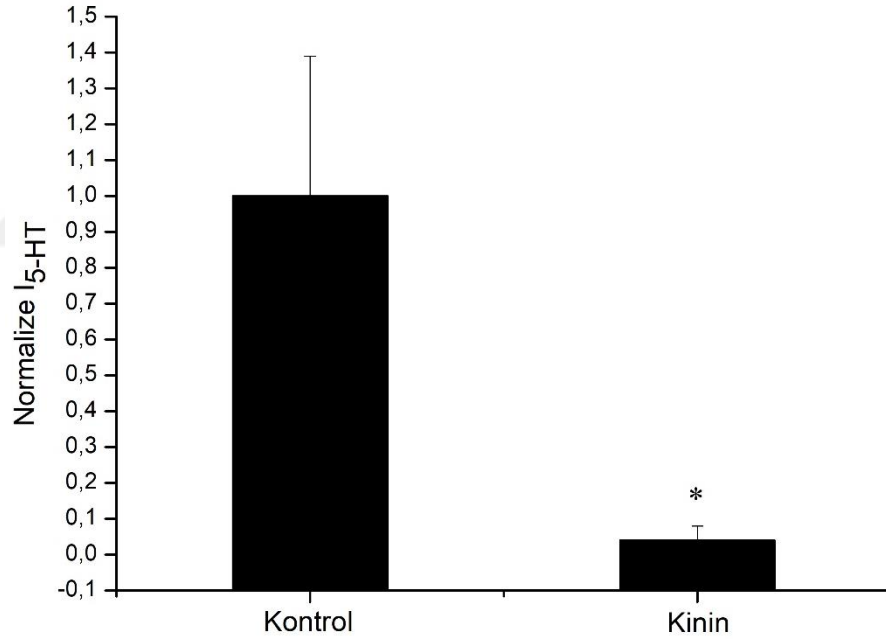
Şekil 4.8:  $I_{5-HT}$ 'nin akım-voltaj ilişkisi. Her iki yBOS ortamında uygulanan voltaj kenetleme protokolü sonucu elde edilen akım-voltaj ilişkisi görülmektedir. Grafikteki değerler ölçülen akımların ortalama  $\pm$  standart hatasını vermektedir. Her iki yBOS ortamında da potasyum için hesaplanan Nernst potansiyeli  $I_{5-HT}$ 'nin sıfırlandığı ters potansiyel ile yakın değerdedir. Bu durum  $I_{5-HT}$ 'nin potasyum iyonu kaynaklı olduğunu göstermektedir. Potasyumdan zengin yBOS solüsyonunda ölçülen  $I_{5-HT}$  standart yBOS ortamında ölçülen değerlere göre daha fazladır. Ters (reverse) potansiyelden daha pozitif adım potansiyellerinde ortaya çıkan dışa doğru akım ters potansiyelden daha negatif potansiyellerde ortaya çıkan içe doğru akımdan çok daha küçüktür. Elde edilen bu veriler  $I_{5-HT}$ 'nin içe doğru düzeltici (inward rectifier) bir akım olduğunu göstermiştir. Kırmızı nokta, standart yBOS ortamında ölçülen  $I_{5-HT}$  ortalamasını (n=6); siyah kare, potasyumdan zengin yBOS ortamında ölçülen  $I_{5-HT}$  ortalamasını (n=5); mavi çizgi, sırasıyla standart ve potasyumdan zengin yBOS ortamında potasyum için hesaplanan Nernst potansiyellerini temsil etmektedir. Hesaplanan potasyum iyonu Nernst potansiyelleri ile akım değerlerinin sıfırlandığı  $I_{5-HT}$  ters potansiyellerinin yakın değerde oldukları görülmektedir. Bu bulgulardan hareketle DRD nöronlarında serotoninin ile indüklenen akımın içe doğru düzeltici karakterde bir potasyum akımı olduğu sonucuna varılabilir.

### Serotonin ile indüklenen akımın farmakolojik olarak izolasyonu

Serotonin ile indüklenen akımın içe doğru düzeltici bir potasyum akımı olduğu ortaya çıktıktan sonra bu akımın içe doğru düzeltici bir potasyum kanalı olan GIRK kanalları kaynaklı olabileceği düşünüldü. Bu önermeyi desteklemek amacıyla voltaj kenetleme deneyleri sırasında bir spesifik GIRK kanal blokörü olan kinin (1 mM) kullanıldı. Serotonin ile indüklenen akım, kinin uygulaması ile bloke edilebilirse, bu durum GIRK kanalları bloke edildiğinde  $I_{5-HT}$ 'nin ortaya çıkamayacağını, dolayısıyla serotoninin DRD nöronlarında hiperpolarize edici etkisini GIRK kanallarının açılmasına neden olarak ortaya çıkardığını gösterecekti.

Voltaj kenetleme şartlarında 30 sn süren serotonin ( $25 \mu\text{M}$ ) uygulamasına akım yanıtı veren nöronlarda 200 sn süre ile kinin ( $1\text{mM}$ ) ön uygulaması sonrası tekrar 30 sn boyunca serotonin ( $25 \mu\text{M}$ ) uygulandığında her hangi bir akım ortaya çıkmadı. Kinin ön uygulaması  $I_{5\text{-HT}}$ 'nin bloke olmasına neden oldu ( $p=0.043$ ,  $n = 5$ , Wilcoxon testi). Şekil 4.9A'da serotonin uygulaması ile ortaya çıkan dışa doğru akım (üstte) ve aynı nöronda kinin ön uygulaması sonrası tekrar serotonin uygulaması ile herhangi bir dışa doğru akımın ortaya çıkmadığı (altta) görülmektedir. Şekil 4.9B'de beş adet nörondan alınan kayıtlarda ölçülen  $I_{5\text{-HT}}$  genliklerinin normalize edilmiş ortalama değerlerinin bar grafiği bulunmaktadır.



**A****B**

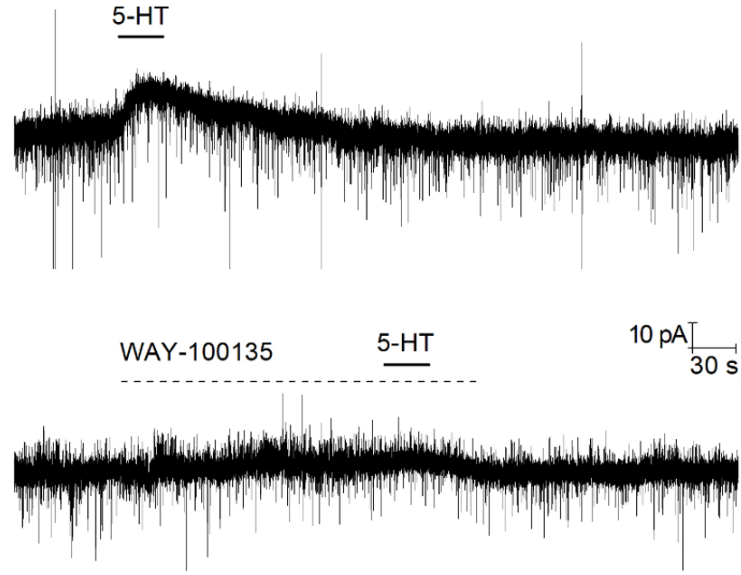
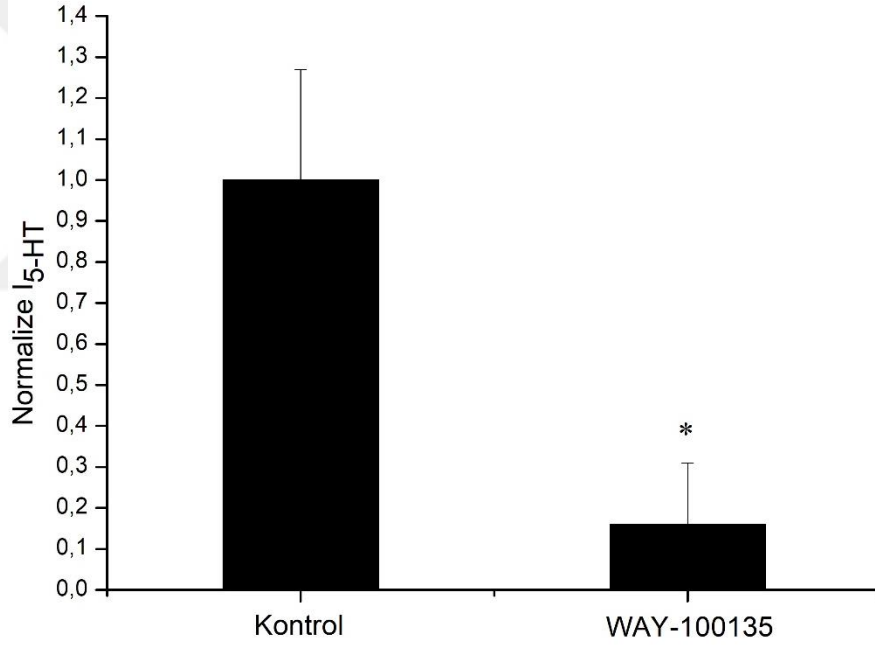
Şekil 4.9: Kinin ön uygulması ile  $I_{5-HT}$ 'de ortaya çıkan değişim. **A:**  $I_{5-HT}$ 'ye kinin etkisi. Serotonin (25  $\mu$ M) uygulama süresi 30 sn, kinin uygulama süresi 200 saniye,  $V_H = -57$  mV, kesik çizgi: Kinin uygulaması, düz çizgi: Serotonin uygulaması **B:** Kontrol grubu, serotonin uygulaması sırasında ortaya çıkan normalize akım değerleri ortalamasını; kinin grubu ise kinin ön uygulaması sonrası serotonin uygulaması ile ölçülen normalize ortalama akım değerlerini temsil etmektedir ( $p=0.043$ ,  $n = 5$ , Wilcoxon testi).

## **B) Serotonin etkisine aracı olan reseptörün karakterizasyonu**

### **Serotonin ile indüklenen akımda rol alan somatodendritik serotonin reseptör tipinin belirlenmesi**

Serotonin uygulaması ile ortaya çıkan akım cevabının hangi serotonin reseptörü üzerinden gerçekleştiğini ortaya koymak amacıyla spesifik 5-HT<sub>1A</sub> reseptör blokörü olan WAY 100135 (21  $\mu$ M) 180 sn süre ile uygulandı ve ardından tekrar serotonin uygulanarak I<sub>5-HT</sub> ölçüldü. Serotonin uygulaması sırasında ve bir süre sonrasında da WAY-100135 uygulanmaya devam edildi. WAY-100135 ön uygulaması ile I<sub>5-HT</sub> bloke edildi (p= 0.028, n=6, Wilcoxon testi). 5-HT<sub>1A</sub> blokörü ile serotonin akımının bloke edilmesi, serotoninin DRD hücrelerinde inhibitör etkisini somatodendritik 5-HT<sub>1A</sub> reseptörleri üzerinden ortaya çıkardığını gösterdi. Şekil 4.10A'da voltaj kenetleme şartlarında bir nöronda serotonin uygulamasının, akım yanıtı neden olduğu gösterilmiştir (üstte). Fakat aynı nöronda WAY-100135 ön uygulaması ardından serotonin uygulamasının her hangi bir akım yanıtı neden olamadığı (altta) gösterilmiştir. Şekil 4.10B'de altı adet nörondan alınan kayıtlardaki normalize I<sub>5-HT</sub> akım değerlerinin ortalamaları bar grafiğinde gösterilmiştir.

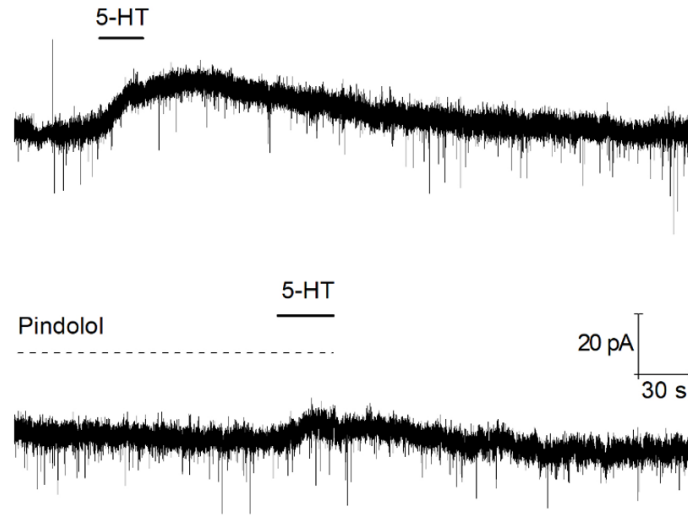
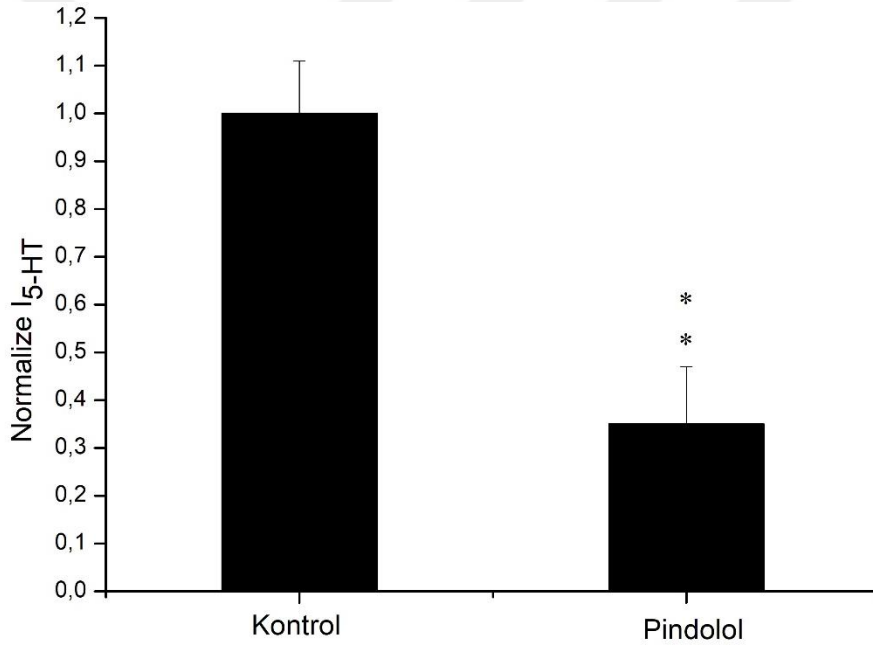


**A****B**

Şekil 4.10: I<sub>5-HT</sub>'ye WAY-100135 etkisi. **A:** voltaj kenetleme kaydı sırasında zardan geçen akım ölçülmektedir. Serotonin uygulaması ile birlikte dışa doğru bir akım görülmektedir (üstte). Aynı nöronda WAY-100135 (21 μM) ön uygulamasının ardından serotonin uygulaması dışa doğru akımın oluşmasına yol açmamıştır (altta). Bu akım WAY-100135 tarafından bloke edilmiştir. Serotonin (25 μM) uygulama süresi 30 s (üstte ve altta) WAY-100135 uygulama süresi 180 s (altta), V<sub>H</sub> = -57 mV, kesik çizgi: WAY-100135 uygulaması, düz çizgi: 5-HT uygulaması. **B:** Normalize akım değerleri bar grafiği olarak verilmiştir (p= 0.028, n=6, Wilcoxon testi).

### **Pindololün I<sub>5-HT</sub> üzerine etkisi**

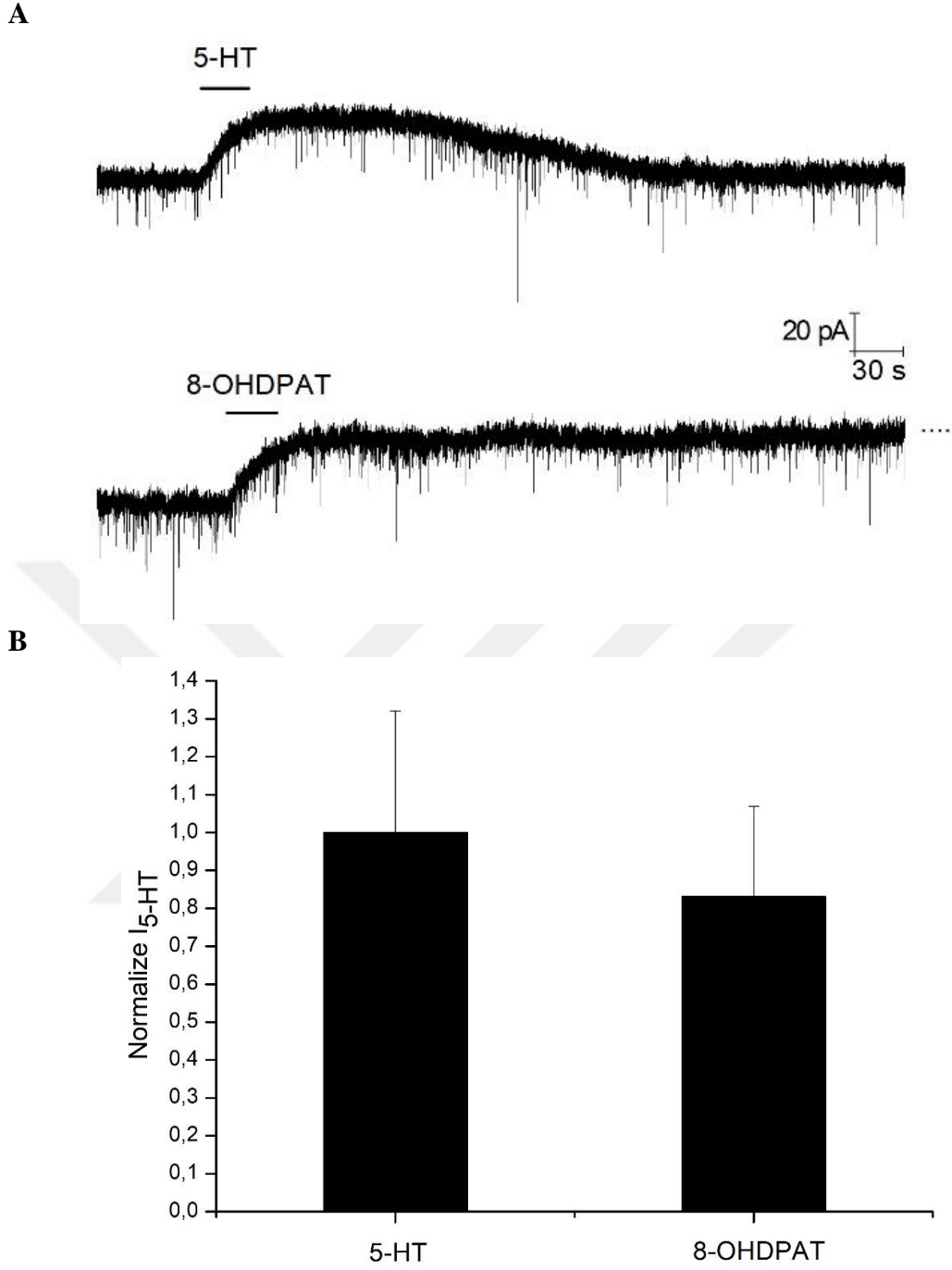
Daha önceki araştırmalarda parsiyel agonistik etki ile serotonin reseptörlerini bloke ettiği raporlanan pindololün voltaj kenetleme deneyleri sırasında serotonin ile indüklenen akıma olan etkisi araştırıldı. Öncelikle nöronlarda voltaj kenetleme şartlarında 30 sn süren serotonin (25 µM) uygulaması ile I<sub>5-HT</sub> genliği ölçüldü. Daha sonra 150 sn süren pindolol (10µM) ön uygulaması ardından serotonin ve pindolol birlikte uygulandı. Pindolol ön uygulaması ile I<sub>5-HT</sub> bloke edildi (p= 0.007, n= 5, paired sample test). Bu bulgu sonucunda serotoninin DRD nöronları üzerinde oluşturduğu akım yanıtının pindolol tarafından bloke edilebildiği gösterilmiştir. şekil 4.11A'da voltaj kenetleme şartlarında kayıt alınan bir nöronda serotonin uygulaması, dışa doğru akım cevabına yol açmıştır (üstte). Aynı nöronda pindolol ön uygulaması sonrası serotonin tekrar uygulandığında herhangi bir akım cevabı ortaya çıkmamıştır (altta). şekil 4.11B'de beş adet nörondan alınan kayıtlardaki normalize akım değerleri bar grafiği olarak verilmiştir.

**A****B**

Şekil 4.11:  $I_{5-HT}$ 'ye pindolol etkisi. **A:** Voltaj kenetleme şartlarında zardan geçen akım ölçülmektedir. Serotonin uygulaması ile birlikte dışa doğru bir akım ortaya çıktı (üstte). Aynı hücrede pindolol ön uygulaması ardından serotonin ve pindolol birlikte uygulandı. Pindolol ön uygulamasının ardından serotonin uygulaması ile bir önceki deneyde ortaya çıkan dışa doğru akım meydana gelmedi (altta).  $I_{5-HT}$  pindolol tarafından bloke edildi. Serotonin ( $25 \mu\text{M}$ ) uygulama süresi 30 sn (üstte ve altta), pindolol uygulama süresi 150 sn (altta),  $V_H = -57 \text{ mV}$ . **B:** Sadece serotonin uygulandığında ve pindolol ön uygulaması sonrası serotonin uygulandığında ortaya çıkan normalize akım değerleri verilmiştir ( $p= 0.007$ ,  $n= 5$ , Paired sample test).

### **8-OHDPAT ile 5-HT'nin imitasyonu**

Serotonin ile ortaya çıkan akımın önceki deney düzeneğinde WAY-100135 ile bloke edilerek bu akımın 5-HT<sub>1A</sub> reseptörü üzerinden ortaya çıktığı gösterilmiş olsa da spesifik bir 5-HT<sub>1A</sub> reseptör agonisti olan 8-OHDPAT ile de serotonin akımının benzeri oluşturularak bu bulgu desteklenmek istendi. Bu kapsamda 30 sn süreli serotonin (25µM) uygulamasına cevap veren DRD nöronlarında 30 sn süreli 8-OHDPAT (30 µM) uygulamasının etkisi incelendi. 8-OHDPAT benzer ölçüde serotonin uygulamasının yol açtığı kadar dışa doğru akım meydana getirdi (p= 0.397, n=7, Wilcoxon test,). İki grup arasında akım genlikleri açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır. Bununla birlikte 8-OHDPAT ile ortaya çıkan akım sürekliydi ve yıkama ile eski haline dönmedi. Şekil 4.12A'da voltaj kenetleme şartlarında kayıt alınan bir nöron dışa doğru akım cevabına yol açmıştır (üstte). Aynı nöronda 8-OHDPAT uygulandığında aynı şiddette bir akım cevabı ortaya çıkmıştır (altta) ancak bu akım yıkama ile ortadan kalkmamış ve sürekli olarak devam etmiştir. Şekil 4.12B'de yedi adet nörondan alınan kayıtlardaki serotonin uygulaması ve 8-OHDPAT uygulaması ile ortaya çıkan normalize akım değerleri bar grafiği olarak verilmiştir.

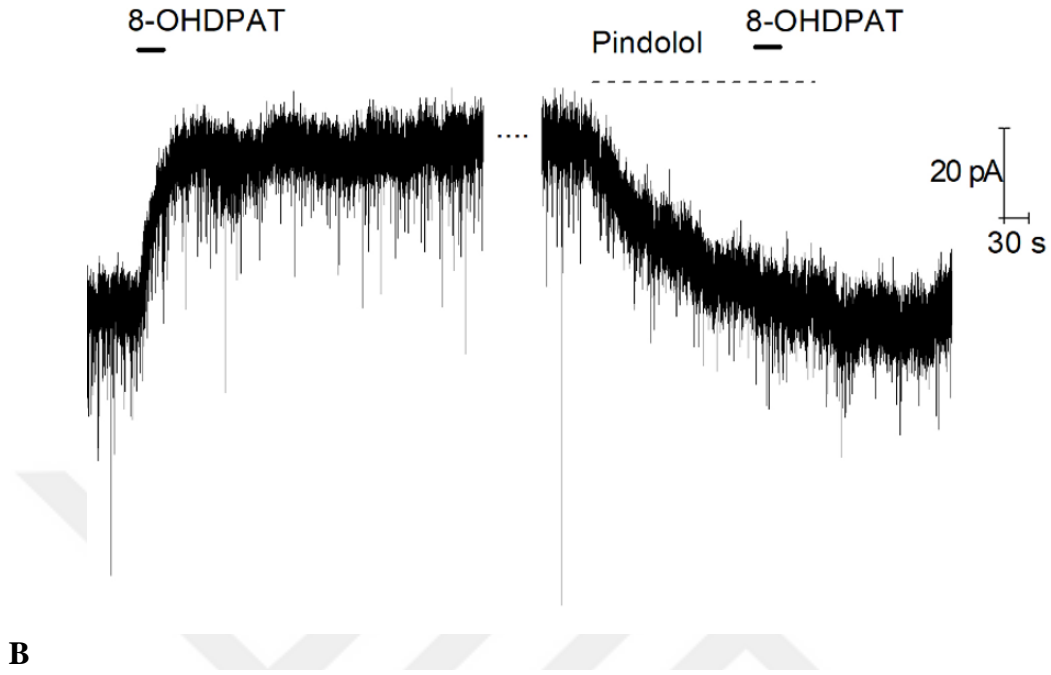


Şekil 4.12: 8-OHDPAT ile  $I_{5-HT}$  imitasyonu. **A:** 30 sn süre ile serotonin uygulaması yaklaşık 20 pA dışa doğru akıma neden olmuştur (üstte). Aynı hücrede 8-OHDPAT aynı genlikte dışa doğru akıma neden olmuştur (altta). Ancak bu akım yıkama ile eski haline dönmemiştir. Serotonin (üstte) ve 8-OHDPAT (altta) uygulama süresi 30 s,  $V_H = -57$  mV. **B:** Serotonin uygulaması ve 8-OHDPAT uygulaması sonucu ortaya çıkan normalize akım değeri ortalamaları gösterilmiştir. ( $p = 0.397$ ,  $n = 7$ , Wilcoxon test).

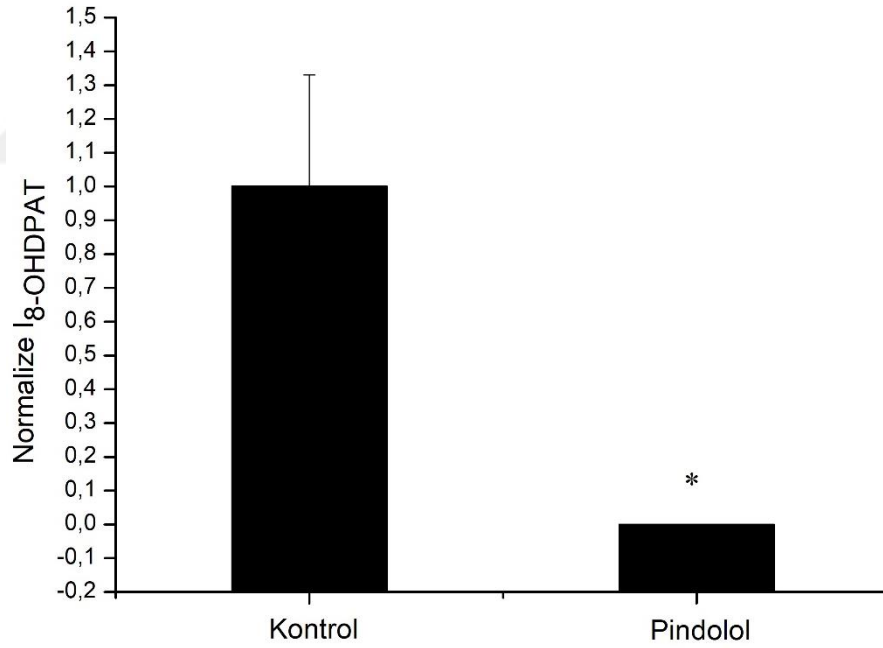
### **Pindolol uygulamasının 8-OHDPAT üzerine etkisi**

Pindololün serotonin akımını bloke edici etkisinin hangi reseptör üzerinden gerçekleştiğinin tam olarak anlaşılabilmesi amacıyla spesifik 5-HT1A reseptörü agonisti olan 8-OHDPAT uygulaması sonrası ortaya çıkan sürekli dışa doğru akım sırasında pindolol uygulandı. Pindolol (10 $\mu$ M) uygulaması ile bu dışa doğru akım tamamen ortadan kalktı (n=5). Ayrıca pindolol uygulaması sonrası tekrar 8-OHDPAT uygulandığında herhangi bir dışa doğru akım gözlenemedi (p = 0,039, n=5, paired sample test) . Bu bulgular pindololün saf 5-HT1A reseptör aktivitesini de bloke edebildiğini göstermektedir. Şekil 4.13A'da voltaj kenetleme şartlarında 8-OHDPAT bir nöronda sürekli bir dışa doğru akıma yol açmıştır (solda). Aynı nöronda pindolol uygulaması ile birlikte bu sürekli dışa doğru akım bloke edilmiştir (sağda). Aynı nöronda pindolol uygulaması sonrası 8-OHDPAT tekrar uygulandığında herhangi bir akım cevabı ortaya çıkmamıştır (sağda). Şekil 4.13B'de beş adet nörondan alınan kayıtlardaki normalize akım değerleri bar grafiği olarak verilmiştir.

A



B



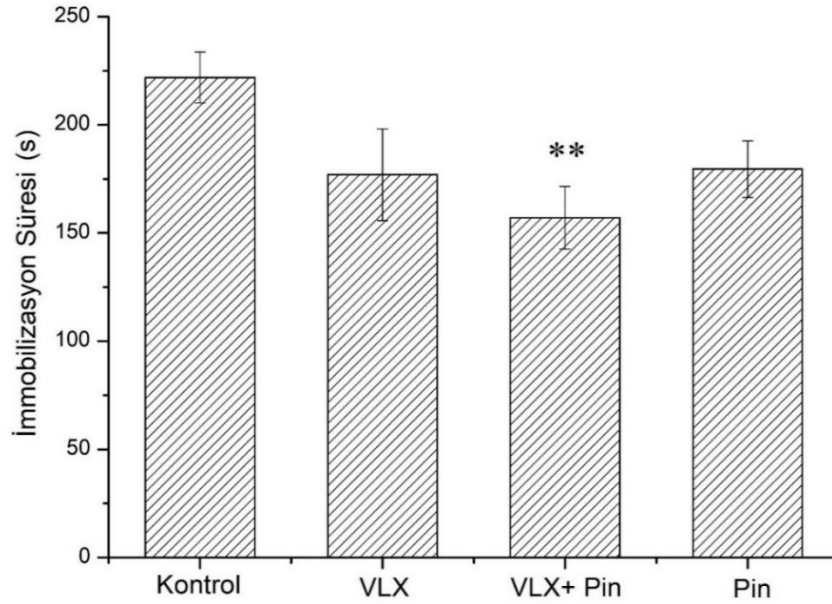
Şekil 4.13: Pindololün  $I_{8\text{-OHDPAT}}$ 'a etkisi. **A:** Solda 8-OHDPAT uygulaması ile ortaya çıkan sürekli dışa doğru akım görülmektedir. Sağda ise aynı hücrede pindolol uygulaması ile ortaya çıkan bu sürekli dışa doğru akımın blokajı görülmektedir. Pindolol uygulaması sonrasında tekrar 8-OHDPAT uygulaması dışa doğru akımı ortaya çıkaramamıştır. Düz çizgi: 8-OHDPAT uygulaması, kesikli çizgi: Pindolol uygulaması, 8-OHDPAT (30  $\mu\text{M}$ ) uygulama süresi 30 s (solda ve sağda), pindolol uygulama süresi 180 saniye (sağda),  $V_H = -57$  mV. **B:** Kontrol grubunda sadece 8-OHDPAT uygulanmıştır. Pindolol grubunda pindolol ön uygulaması ardından 8-OHDPAT tekrar uygulanmıştır. Her iki grupta 8-OHDPAT uygulaması sırasında ölçülen normalize akım değeri ortalamaları gösterilmiştir ( $p = 0,039$ ,  $n=5$ , Paired sample test).

## 4.2. *İn vivo* davranış deneyleri

Antidepresan etkinliğin değerlendirilebilmesi için 4 adet grup oluşturuldu. Bunlardan birinci gruba (kontrol) iki gün boyunca SF ve NaOH içeren SF enjeksiyonu yapıldı. İkinci gruba (VLX) iki gün boyunca 20 mg/kg/gün venlafaksin (s.c.) verildi. Üçüncü gruba (VLX-Pin) iki gün boyunca sırasıyla 20 ve 15 mg/kg/gün dozlarında venlafaksin (s.c.) ve pindolol (s.c.) verildi. Dördüncü gruba (Pin) ise iki gün boyunca 15mg/kg/gün dozunda pindolol (s.c.) verildi.

### 4.2.1. Kuyruk asma testi

İlaçların antidepresan etkinliğinin test edilmesi amacıyla ilaç uygulamalarının ardından yapılan KAT testinde altı dk süre içerisinde hayvanların immobilizasyon süreleri ölçüldü. Immobilizasyon süresinin düşük olması antidepresan etkinlik olarak değerlendirilirken immobilizasyon süresinin uzun olması depresif duygu durumu olarak değerlendirildi. Ortalama immobilizasyon süresi kontrol grubunda  $221.9 \pm 11.8$  s, venlafaksin grubunda  $176.9 \pm 21.2$  s, venlafaksin-pindolol grubunda  $157.0 \pm 14.5$  s ve pindolol grubunda  $179.5 \pm 13.1$  s olarak ölçülmüştür (Şekil 4.14).

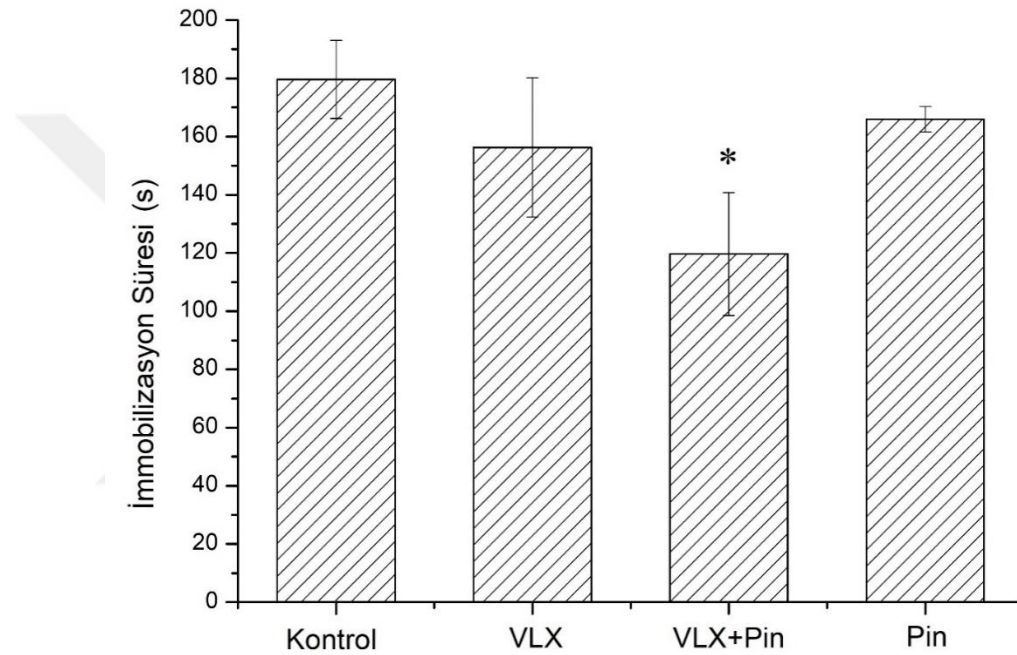


Şekil 4.14: Kuyruk asma testinde grupların altı dk içerisindeki immobilizasyon süresi. Her grupta 8 adet hayvan kullanılmıştır. One way ANOVA istatistik analiz testi kullanılmıştır. \*\*: Kontrol grubu ile VLX-Pin grubu arasında  $p < 0.01$ . VLX - Pin kombinasyonu uygulanan grupta kontrol grubuna göre immobilizasyon süresi istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşmüştür. Sadece venlafaksin ya da sadece pindolol uygulanan gruplarda ise immobilizasyon süresi kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşmemiştir. Venlafaksin - pindolol kombinasyonu kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde antidepresan etki göstermiştir. Venlafaksin - pindolol grubunda hayvanlar daha az umutsuzluğa kapılmış ve daha fazla kurtulma çabası göstermiştir. Bu bulgu Pindololün venlafaksini potansiyalize ettiğini göstermektedir. VLX: Venlafaksin, Pin: Pindolol.



#### 4.2.2. Zorunlu yüzme testi

İlaçların antidepresan etkinliğinin test edilmesi amacıyla ilaç uygulamalarının ardından yapılan altı dk süreli ZYT testinde altı dk'nın son dört dk'sı içerisinde hayvanların immobilizasyon süreleri ölçüldü. İmmobilizasyon süresinin düşük olması antidepresan etkinlik olarak değerlendirilirken immobilizasyon süresinin uzun olması depresif duygu durumu olarak değerlendirildi. Ortalama immobilizasyon süresi kontrol grubunda  $179.6 \pm 13.4$  s, venlafaksin grubunda  $156.3 \pm 23.9$  s, venlafaksin-pindolol grubunda  $119.6 \pm 21.2$  s ve pindolol grubunda  $166 \pm 4.4$  s olarak ölçülmüştür (Şekil 4.15).

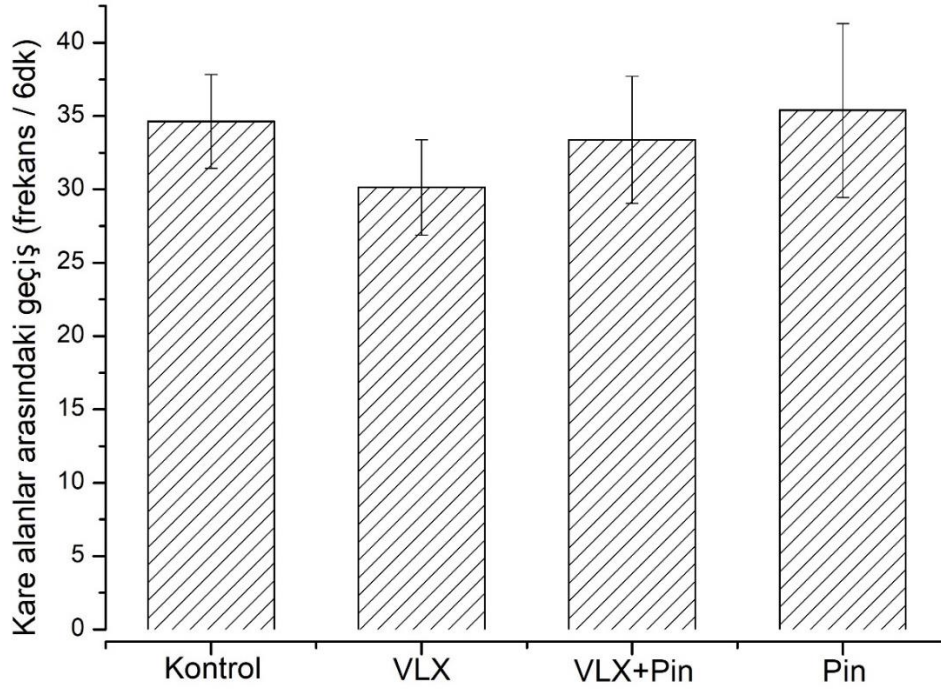


Şekil 4.15: Zorunlu yüzme testinin son dört dk'sı boyunca ölçülen immobilizasyon süresi. Her grupta 8 adet hayvan kullanılmıştır. One way ANOVA istatistik analiz testi kullanılmıştır. \*: Kontrol grubu ile VLX-Pin grubu arasında  $p < 0.05$ . Venlafaksin - pindolol kombinasyonu uygulanan grupta kontrol grubuna göre immobilizasyon süresi istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşmüştür. Sadece venlafaksin ya da sadece pindolol uygulanan grupta immobilizasyon süresi kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşmemiştir. Venlafaksin - pindolol kombinasyonu kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde antidepresan etki göstermiştir. Venlafaksin-pindolol grubunda hayvanlar daha az umutsuzluğa kapılmış ve daha fazla kurtulma çabası göstermiştir. Bu bulgu pindololün venlafaksini potansiyalize ettiğini göstermektedir. VLX: Venlafaksin, Pin: Pindolol.

#### 4.2.3. Açık alan testi

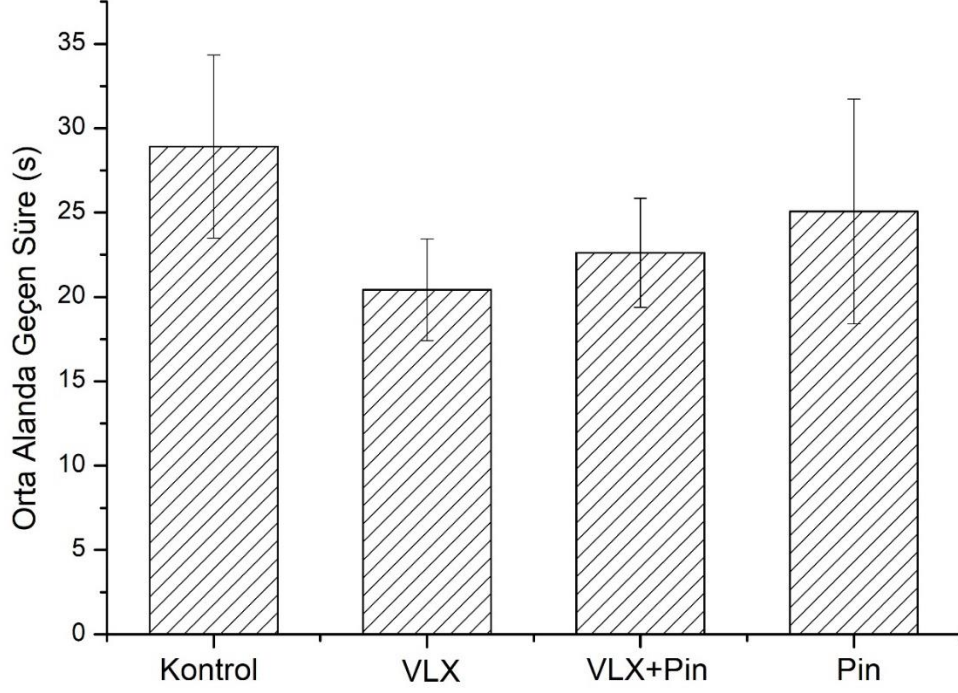
Oluşturulan grupların lokomotor aktivitelerinin birbirine yakın olması gerektiğinden dolayı, bunu doğrulamak amacıyla altı dk süreli açık alan testi uygulandı. Bu testte hayvanların kare alanlar arasındaki geçiş frekansı ve orta alanda geçirdikleri süreler ölçüldü. Bu ölçümlerin birbirine yakın olması, grupların lokomotor aktivitelerinin birbirine benzer olduğu şeklinde yorumlandı. Altı dk içerisinde kare alanlar arasındaki

geçiş frekansı ortalaması kontrol grubunda  $34.6 \pm 3.2$ , venlafaksin grubunda  $30.1 \pm 3.2$ , venlafaksin-pindolol grubunda  $33.4 \pm 4.3$  ve pindolol grubunda  $35.4 \pm 5.9$  olarak ölçülmüştür (Şekil 4.16).



Şekil 4.16: Açık alan testinde bölünmüş olan 16 kare alan arasındaki geçiş frekansı. Her grupta 8 adet hayvan kullanılmıştır. One way ANOVA istatistik analiz testi kullanılmıştır. Gruplar arasında istatistiksel açıdan anlamlı farklılığa rastlanmamıştır ( $p>0.05$ ). Bu bulgu lokomotor aktivitenin gruplar arasında benzer olduğu şeklinde yorumlanmıştır. VLX: Venlafaksin, Pin: Pindolol.

Altı dk içerisinde orta alanda geçirilen süre ortalaması ise kontrol grubunda  $28.9 \pm 5.4$  s, venlafaksin grubunda  $20.4 \pm 3.0$  s, venlafaksin-pindolol grubunda  $22.6 \pm 3.2$  s ve pindolol grubunda  $25.1 \pm 6.7$  s olarak ölçülmüştür (Şekil 4.17).



Şekil 4.17: Açık alan testinde hayvanların orta alan içerisinde geçirdiği süre. Her grupta 8 adet hayvan kullanılmıştır. One way ANOVA istatistik analiz testi kullanılmıştır. Gruplar arasında istatistiksel açıdan anlamlı farklılığa rastlanmamıştır ( $p>0.05$ ). Bu bulgu lokomotor aktivitenin gruplar arasında benzer olduğu şeklinde yorumlanmıştır. VLX: Venlafaksin, Pin: Pindolol.

Davranış testlerinde elde edilen bulgular hep birlikte değerlendirildiğinde KAT ve ZYT testlerinde umutsuz duygudurumunun temsili olan immobilizasyon süresi VLX - Pin kombinasyonu ile istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşmüştür. Venlafaksin ya da pindolol tek başına immobilizasyon süresini düşürmekte yeterli olamamıştır. Açık alan testi ile lokomotor aktivitenin gruplar arasında farklı olmadığı belirlenmiştir. Bu durum yapılan KAT ve ZYT testlerinin sonuçlarının gerçekten de gruplar arasındaki duygudurumdaki farklılıklardan kaynaklandığını, spesifik olmayan hareket kabiliyetindeki farklılıklardan kaynaklanmadığını göstermektedir.

## 5. TARTIŞMA VE SONUÇ

### 5.1. Yama kenetleme çalışmaları

*İn vitro* yama kenetleme tekniği kullanılarak uygulanan akım kenetleme ve voltaj kenetleme deneyleriyle serotoninin DRD nöronlarında iyon kanalı ve membran reseptörü düzeyinde etki mekanizması ve bu mekanizmaya pindololün etkisi araştırılmıştır.

#### 5.1.1. Akım kenetleme çalışmaları

Bayliss ve arkadaşlarının sıçan kaudal rafe çekirdeklerinde tüm-hücre konfigürasyonunda uyguladıkları akım kenetleme çalışmalarında serotonin ( $5\mu\text{M}$ ) uygulaması rafe obskurus ve rafe pallidus çekirdeklerinde bulunan serotonerjik nöronlarda  $13.8 \pm 1.6$  mV değerinde hiperpolarizasyona yol açmıştır. Benzer şekilde serotonerjik olmayan nöronların yarısında da hiperpolarizasyona yol açmıştır (130). Yine Corradetti ve arkadaşları tarafından sıçanlarda dorsal rafe çekirdeğinde yapılan bir başka çalışmada serotonerjik nöronlar üzerinde serotonin ( $15\ \mu\text{M}$ ) ve 5-CT ( $100\ \text{nM}$ ) hiperpolarizasyona yol açmıştır. 5-CT nin bu etkisi o dönem 5-HT<sub>1A</sub> reseptör blokörü olarak kullanılan WAY-100635 ( $4.9\ \text{nM}$ ) uygulaması ile bloke edilebilmiştir (6).

Araştırmamızda benzer şekilde serotoninin fare dorsal rafe çekirdeği nöronlarının transmembran potansiyeli üzerine olan etkisi incelenmiştir. Serotonin ( $25\ \mu\text{M}$ ) uygulaması geçmişte yapılan araştırmalara benzer şekilde dorsal rafe çekirdeği nöronlarında  $14.3 \pm 3.1$  mV değerinde hiperpolarizasyona ( $n=9$ ) yol açmıştır. Bu bulgu farede de dorsal rafe çekirdeğinde somatodendritik serotonin reseptörleri bulunduğunu göstermektedir.

#### Pasif zar özellikleri

Calizo ve arkadaşları tarafından sıçanlarda yapılan DRN dorsomedyal alt çekirdeğinde bulunan serotonerjik nöronlarda istirahat zar potansiyeli  $-70$  mV, input direnci  $0.6\ \text{G}\Omega$ , zaman sabiti  $50\ \text{msn}$  olarak ölçüldü. Serotonerjik olmayan nöronlarda bu parametrelerden sadece istirahat zar potansiyeli istatistiksel olarak farklı bulundu ve  $-60$  mV olarak ölçüldü (117).

Beck ve arkadaşları tarafından sıçanlarda DRN serotonerjik nöronlarında istirahat zar potansiyeli -63 mV, input direnci 0.6 GΩ ve zaman sabiti değeri 51 ms olarak ölçüldü. Aynı çalışmada serotonerjik nöronlarla serotonerjik olmayan nöronlar arasında sadece zaman sabitinde anlamlı fark saptandı. Zaman sabiti serotonerjik olmayan nöronlarda 42 ms idi (22).

Bayliss ve arkadaşları sıçanlarda kaudal rafe çekirdeklerinde (rafe obskurus ve rafe pallidus) yaptıkları çalışmada serotonine hiperpolarizasyon ile cevap veren nöronlarda istirahat zar potansiyelini -49.7 mV, kapasitans değerini 26.6 pF, input direnci değerini 1.6 GΩ olarak saptadı (130). Bu çalışmada, serotonine cevap vermeyen nöronlar ile hiperpolarizasyonla yanıt veren nöronlar arasında pasif zar özellikleri açısından anlamlı bir fark saptanmadığı raporlandı.

Araştırmamızda serotonin uygulamasına yanıt veren DRD nöronlarında istirahat zar potansiyeli -69.2 mV, kapasitans değeri 70.1 pF, input direnci değeri 0.79 GΩ, zaman sabiti değeri 45.2 ms olarak ölçülmüştür. Gruplar arasında yapılan istatistiksel analizde serotonine yanıt veren ve serotonine yanıt vermeyen nöronlarda pasif zar özellikleri açısından istatistiksel anlamlı bir farklılığa rastlanmamıştır.

### **Aktif zar özellikleri**

Calizo ve arkadaşları tarafından dorsomedyal dorsal rafe çekirdeğinde AP genliği 85 mV, AP eşik değeri -25 mV ve AHP genliği 15 mV olarak ölçülmüştür. Bu çalışmada, aktif zar özellikleri açısından serotonerjik nöronlar ile serotonerjik olmayan nöronlar arasında anlamlı bir fark bulunamadığı raporlanmıştır (117).

Beck ve arkadaşları tarafından sıçanlarda DRN serotonerjik nöronlarında yapılan çalışmada AP genliği 69 mV, AP eşığı -22 mV, AHP genliği 16 mV olarak saptanmıştır. Bu parametreler açısından serotonerjik nöronlar ile serotonerjik olmayan nöronlar arasında anlamlı bir fark bulunamadığı raporlanmıştır (22).

Araştırmamızda DRD bölgesinde serotonine yanıt veren nöronlarda AP genliği 82.5 mV, AP eşik değeri -46.6 mV, AP yarı yükseklik genişliği 1.6 ms, AHP genliği 24.7 mV değerlerinde ölçüldü. Gruplar arasında yapılan istatistiksel analizde serotonine yanıt

veren ve serotonine yanıt vermeyen nöronlarda aktif zar özellikleri açısından istatistiksel anlamlı bir farklılığa rastlanmamıştır.

Literatürde rafe çekirdeklerinde nöronların pasif ve aktif zar özellikleri hakkındaki araştırmalar ve tarafımızca elde edilen bulgular birlikte değerlendirildiğinde; sadece pasif ve aktif zar özelliklerine bakılarak nöronların serotonerjik olup olmamaları ya da serotonine yanıt verip vermemeleri hakkında herhangi bir fikir edinilmesinin mümkün olamayacağı sonucuna varılabilir (22,114).

### **5.1.2. Voltaj kenetleme çalışmaları**

#### **İyon kanalı düzeyinde yapılan araştırmalar**

DRN bölgesinde serotonin etkisi ilk olarak 1993 yılında Nicholas J. Penington ve arkadaşları tarafından tüm hücre konfigürasyonunda sıçanlarda çalışılmıştır. Burada voltaj kenetleme tekniği ile serotoninin zar da yol açtığı akımın ters potansiyeli potasyumun Nernst potansiyeli ile denk bulunmuş ve serotonerjik akımın potasyum iyonu kaynaklı olduğu ortaya konulmuştur. Bu akım GIRK kanallarının spesifik olmayan bir blokörü olan baryumla bloke edilmiştir. Bu durum serotoninin GIRK kanallarını aktive ederek etkisini ortaya çıkardığı şeklinde yorumlanmıştır. Ayrıca bu akım 5-HT1A reseptör agonisti olan 8-OHDPAT ile de taklit edilebilmiştir. Bu bulgu, serotoninin dorsal rafe çekirdeği nöronlarında inhibitör etkisinin 5-HT1A reseptörü üzerinden gerçekleştiği şeklinde yorumlanmıştır (119).

Geçmişte yapılan çalışmalarda 5-HT1A reseptörünün intrasellüler sinyal ileti mekanizmalarının anlaşılması amacıyla bir takım ikincil habercilerin inhibitörleri kullanılmıştır (118,119). Penington ve arkadaşları tarafından serotoninin (1 $\mu$ M) sıçanlarda DRN nöronlarında indüklediği zar akımı cevabına G<sub>i/o</sub> protein blokörü olan boğmaca toksininin (pertusis toksini, PTX, 1 $\mu$ g/ml) etkisi araştırılmıştır (119). Bu çalışmada, voltaj kenetleme şartlarında boğmaca toksini ile serotonin ile indüklenen akım yanıtı inhibe edilebilmiştir (119). Bununla birlikte PTX yerine uygulanan cAMP ya da glibenklamid (ATP bağımlı potasyum kanal blokörü, 1  $\mu$ M) bu akımı etkileyememiştir (119). Bu durum 5-HT1A reseptörlerinin hücre içerisindeki etkisini G<sub>i/o</sub> proteinini (PTX selektif G protein) aktive ederek gösterdiği şeklinde yorumlanmıştır (119).

Katayama ve arkadaşları sıçanlarda dorsal rafe çekirdeği nöronlarında voltaj kenetleme şartlarında pipet solüsyonuna sülfidril alkilleyici ajan (N-ethylmaleimide, NEM) eklediğinde serotonin ile indüklenen akım bloke olmuştur (118). Fakat  $Ca^{+2}$  şelatörü olan BAPTA (1,2-bis\_2-aminophenoxy. ethane-N,N,NX, NX-tetraacetic acid) ya da fosfolipaz C inhibitörü olan neomisin uygulaması bu akımı bloke etmemiştir. NEM,  $G_{i/o}$  proteinlerinin sistein (cystein) rezidülerinin alkilleyicisi (blokörü) olarak bilinmektedir. Bu bulgular ışığında Katayama ve arkadaşları NEM'e duyarlı G proteininin (NEM sensitif G protein) içe doğru düzeltici (inward rectifier) kanalları aktive ettiği ancak kalsiyum ya da protein kinaz C'nin bu kanalların aktivasyounda bir etkisinin olmadığı sonucuna varmışlardır (118). Aynı çalışmada, kayıt alınan nöron sitoplazmasına, yama kenetleme pipeti ile  $GTP_{\gamma\sigma}$  (guanozin 5X-O-3-thiotrifosfat) eklendiğinde ise bu akım sürekli hale (irreversible) gelmiştir ( $GTP_{\gamma\sigma}$ ;  $G_{i/o}$  proteininin aktifleştğinde ayrılan beta ve gama alt birimidir). Bu bulgu 5-HT<sub>1A</sub> reseptör aktivasyonunun ardından ikincil haberci kullanmadan  $G_{i/o}$  proteini ile potasyum kanallarının doğrudan aktive edildiği şeklinde yorumlanmıştır (118).

### **Fare DRD nöronlarında serotonin ile indüklenen akıma GIRK kanalları aracılık etmektedir**

Jeong ve arkadaşları tarafından sıçanlarda PAG bölgesinde voltaj kenetleme şartlarında serotoninin etki mekanizması araştırıldı. Bu çalışmada, PAG nöronlarında serotonin cevabına yol açan iyon kanalını bulmak amacıyla 5, 20 ve 30 mM  $K^+$  içeren yBOS ortamlarında -120 mV ile +20 mV arasında değişen adım potansiyellerindeki serotonin ile indüklenen akımlar ölçüldü ve bu akımın içe doğru düzeltici potasyum akımı olduğu saptandı. Daha sonra GIRK kanal blokörlerinden baryum ve kinin kullanılarak  $I_{5-HT}$ 'nin bloke edildiği gösterildi. Bu bulgular serotoninin PAG bölgesinde etkisini GIRK kanalları üzerinden gösterdiği şeklinde yorumlanmıştır (100).

Sıçan dorsal rafe çekirdeğinde (118,119) ve kaudal rafe çekirdeğinde (130) yapılan çalışmalarda serotonin ile indüklenen akım, baryum ve kinin ile bloke edilmiş ve bu bulgu, bu akımın içe doğru düzeltici bir potasyum kanalı olan GIRK kanalları üzerinden gerçekleştiği şeklinde yorumlanmıştır. Loucif ve arkadaşları tarafından farelerde DRN nöronları üzerinde tüm-hücre konfigürasyonunda yapılan bir yama kenetleme çalışmasında 5-CT ve 8-OHDPAT kaynaklı AP deşarjı inhibisyonu, GIRK akımı ile ilişkilendirilmiştir (131).

Çalışmamızda serotoninin DRD nöronlarında hiperpolarize edici etkisinin voltaj kenetleme kayıtlarında dışa doğru akımdan kaynaklanmakta olduğu sonucuna varıldıktan sonra bu akımın hangi iyondan kaynaklandığının bulunması amacıyla standart ve potasyumdan zengin yBOS solüsyon ortamlarında uygulanan deneylerde voltaj kenetleme protokolü kullanıldı. Bu deney sonuçlarında her iki solüsyon ortamında hesaplanan potasyum Nernst potansiyellerinin ölçülen ters potansiyel ile birbirine yakın değerde olduğu ortaya çıktı. Bu bulgu, hücre zarında serotonin ile indüklenen akımın  $K^+$  iyonlarının hücre zarından geçişinden dolayı kaynaklandığını gösterdi.

Araştırmamızda 4.2 mM ve 20 mM  $K^+$  içeren yBOS ortamlarında uygulanan voltaj kenetleme protokolü ile serotonin ile indüklenen akımın içe doğru düzeltici potasyum akımı özellikleri gösterdiği ortaya çıktı (100,132). Bu özellikler arasında nöronlar ters potansiyelden daha düşük potansiyellerde kenetlendiğinde ortaya çıkan içe doğru akımların  $I_{5-HT}$ 'nin ters potansiyelinden daha yüksek potansiyellerde kenetlendiğinde ortaya çıkan dışa doğru akımlardan daha büyük genlikte olması ve potasyum iyonu konsantrasyonu arttırıldığında içe doğru akımların anlamlı düzeyde yükselmesi bulunmaktadır.

Araştırmamızda içe doğru düzeltici potasyum akımına neden olan potasyum kanalının belirlenmesi için voltaj kenetleme şartlarında  $I_{5-HT}$  ölçüldükten sonra spesifik GIRK kanal blokörü olan kinin kullanıldı (100,118) ve ardından serotonin tekrar uygulandığında herhangi bir akım gözlenemedi. Kininin  $I_{5-HT}$ 'yi bloke etmesi serotoninin GIRK kanalları üzerinden etkisini ortaya çıkardığını gösterdi. Elde edilen bu sonuçlar sıçanlarda GIRK kanal blokörü olarak kinin veya baryumun kullanıldığı geçmişteki voltaj kenetleme çalışmalarının sonuçlarıyla uyumludur (100,118).

### **Reseptör düzeyindeki araştırmalar**

#### **Serotonin fare DRN nöronlarında somatodendritik 5-HT1A reseptörlerini aktive ederek hiperpolarizasyona yol açmaktadır.**

Geçmişte yapılmış olan *in vivo* ekstraselüler elektrofizyolojik çalışmalarda DRN bölgesine mikroiyontoforezis ile verilen serotoninin bu bölgedeki nöronlarda ateşleme sayısının azalmasına yol açtığı saptandı. DRN nöronlarında bu yanıtın ortaya çıkmasına aracı olan serotonin reseptörünün belirlenmesi için 5-HT1A reseptör blokörü olarak



bilinen WAY-100635 kullanıldı (5,7,91). WAY-100635 uygulaması ardından tekrar serotonin verildiğinde ateşleme sayısında azalma olmadı. Bu bulgu bu nöronlarda 5-HT1A reseptörlerinin bulunduğu ve fonksiyonel olduğu şeklinde yorumlandı (5,7,91).

Bayliss ve arkadaşları kaudal rafe çekirdeğinde yapılan voltaj kenetleme çalışmasında serotonin cevabının reseptörünü belirleyebilmek için bir selektif 5-HT1A reseptör blokörü olan WAY-100135 kullanarak bu bölgedeki serotonin cevabının blokajını sağlayarak 5-HT1A reseptör varlığını gösterdi (130). Bu çalışmaya benzer şekilde araştırmamızda DRD nöronlarında serotonin cevabının hangi reseptör üzerinden gerçekleştiğini araştırmak amacıyla 5-HT akımına, selektif 5-HT1A reseptör blokörü olan WAY-100135'in etkisi incelendi. WAY-100135 önuygulaması ardından 5-HT akımı tamamen bloke oldu. Bu bulgu DRD nöronlarında 5-HT cevabının doğrudan somatodendritik 5HT1A otoreseptörleri üzerinden gerçekleştiğini gösterdi.

#### **Pindolol 5-HT1A reseptörlerini bloke etmektedir.**

Corradetti ve arkadaşlarının ipsapiron (ipsapirone, parsiyel 5-HT1A reseptör agonisti) kullanarak yapmış oldukları bir elektrofizyoloji çalışmasında spontan ateşleme sayısının inhibe edildiği ekstrasellüler sıçan DRN kayıtlarında pindolol ile bu inhibisyon bloke edilebilmiştir (6). Yine bu çalışmada, alınan intrasellüler kayıtlar sırasında, serotonin reseptör analogu olan 5-CT'nin hiperpolarize edici etkisi pindolol uygulaması ile bloke edilmiştir (6). Pindolol 5-HT1A reseptörlerine parsiyel agonistik etki göstererek serotonin varlığında serotoninin etkisinin azalmasına neden olmaktadır (5-7,88).

Jean-Claude Beique ve arkadaşları 2000 yılında sıçanların DRN ve hipokampus CA3 bölgesi nöronlarından ekstrasellüler *in vivo* elektrofizyolojik kayıtlar alarak venlafaksin - S (-) pindolol kombinasyonunun etkinliğini test etmiştir (7). Hipokampus CA3 bölgesindeki nöronlarda venlafaksin, 1 mg/kg dozunda (i.v.) uygulandığında supresyona yol açamamışken aynı dozda pindolol (15 mg/kg, i.p.) ile birlikte uygulandığında ise anlamlı düzeyde supresyona yol açabilmiştir (7). Pindolol, venlafaksin tek başına etkili olmadığı dozda venlafaksini potansiyalize ederek etkili olmasını sağlamıştır. Yani DRN'de bulunan serotonerjik nöronlarla hipokampus CA3 nöronları arasındaki nörosinaptik kavşakta bulunan serotonin artışı ancak venlafaksin, pindolol ile birlikte kullanıldığında hipokampus CA3 nöronlarında ateşleme frekansında supresyona yol açabilecek seviyeye ulaşabilmiştir (7). Aynı çalışmada, venlafaksin uygulaması ile serotonerjik DRN nöronlarının ateşleme frekansının düştüğü fakat venlafaksin ile birlikte

kullanıldığında pindolol ön uygulamasının bu supresyonu ortadan kaldırdığı da raporlanmıştır (7). Bu iki bulgu pindololün; DRN’de bulunan serotonerjik nöronların 5-HT1A reseptörlerini bloke ederek DRN’de venlafaksin kaynaklı somatodendritik bölgedeki serotonin artışından kaynaklanan serotonerjik nöron inhibisyonunu engellediği, böylece venlafaksin postsinaptik nöronlarda daha etkili olmasını sağladığı şeklinde yorumlanmıştır (7). S (-) pindolol, presinaptik nöronlarda bulunan somatodendritik 5-HT1A otoreseptörlerini bloke edebiliyorken hipokampus CA3 bölgesinde bulunan postsinaptik 5-HT1A reseptörlerini bloke edememiştir. Bu özellik sayesinde de pindolol venlafaksini potansiyalize edebilmiştir. Arborelius ve arkadaşları benzer bir çalışmada sitalopram ile pindololün DRN nöronları üzerinde benzer etkileşimini göstermiştir (5).

Araştırmamızda sonraki adımda pindololün, serotonin akımına ( $I_{5-HT}$ ) olan etkisi araştırıldı ve pindololün literatürdeki çalışmalarla uyumlu şekilde serotonin ile indüklenen akımı bloke ettiği gözlemlendi (5–7,88). Bu bulgu; SNRI grubu antidepresan ilaçların DRN nöronlarında somatodendritik bölgede serotonin artışına yol açarak somatodendritik otoreseptörler aracılığıyla ortaya çıkardığı istenmeyen inhibitör etkinin pindolol aracılığıyla engellenebileceğine dair destekleyici niteliktedir.

Corradetti ve arkadaşları sıçanlarda dorsal rafe çekirdeği nöronlarında yaptıkları akım kenetleme çalışmalarında pindololün 5-CT’den kaynaklanan hiperpolarizasyon cevabını bloke ettiğini gösterdiler (6). Ancak 5-CT tüm serotonin reseptörlerinin agonisti olması nedeniyle bu çalışma 5-HT1A reseptörü üzerinden pindolol blokajını yeterince kanıtlayamamaktaydı. Bu muğlaklığı gidermek amacıyla çalışmamızda, voltaj kenetleme şartlarında serotonine cevap veren DRD nöronlarına spesifik 5-HT1A reseptör agonisti olan 8-OHDPAT (30  $\mu$ M) uygulandı. Sıçanlarda DRN ve PAG gibi beyin bölgelerinde yapılmış olan daha önceki çalışmalarda serotonin cevabının reseptör kaynağı araştırılırken 8-OHDPAT kullanılarak serotonin cevabına benzer bir etki elde edilmişti ve bu bulgu, bu cevabın doğrudan 5-HT1A reseptörü kaynaklı olduğu şeklinde yorumlanmıştır (100,118-119).

Araştırmamızda kullanılan 8-OHDPAT, DRD nöronlarında serotonin ile ortaya çıkan dışa doğru akıma yakın genlikte dışa doğru akıma yol açtı. Ancak bu etki yıkama ile eski haline dönmedi ve sürekli devam etmekteydi. Daha sonra 8-OHDPAT’ın yol açtığı

sürekli dışa doğru (irreversible outward) akım pindolol uygulaması ile bloke edildi. Yıkama ile ortadan kalkmayan dışa doğru akım pindolol ile bloke edilebilmişti. Pindolol öny uygulaması sonrası 8-OHDPAT tekrar uygulandığında dışa doğru akım tekrar ortaya çıkmadı. Pindolol 8-OHDPAT'ın neden olduğu doğrudan saf 5-HT1A reseptörü kaynaklı dışa doğru akımı bloke etti. Bu bulgular, pindololün doğrudan 5-HT1A reseptörlerini bloke ederek DRD bölgesi nöronlarında antidepresan ilaçların inhibitör etkisini engelleyebileceğini göstermektedir.

## **5.2. Davranış deneyleri**

### **ZYT, KAT ve AAT davranış testlerinin, ilaçların antidepresan etkisinin gösterilmesi için kullanımı**

Porsolt ve arkadaşları 1977 yılında dar bir silindir içerisinde kemirgenleri yüzmeye zorlamanın depresif duygu durumunu tetikleyebileceğini belirtmiştir ve böylelikle ZYT testi ortaya çıkmıştır. Bu çalışmada immobilizasyon süresinin antidepresan tedavi ve elektrokonvülsiv terapi ile düşürülebildiği raporlanmıştır (128,133).

Steru ve arkadaşları 1985 yılında fareleri kuyruğundan asarak 6 dakika boyunca davranışlarını gözlemlemiştir. Kuyruklarından asılı farelerin davranışlarını immobilitate ve ajitasyon periyotları şeklinde sınıflandırmışlardır. İmmobil periyotları umutsuz davranış (behavioral despair) olarak tanımlamıştır. Bu çalışmada antidepresan tedavi ile immobilizasyon süresinin kısaldığı raporlanmıştır. Lokomotor aktivitede değişiklik olmaksızın immobilizasyon süresinin kısılması antidepresan etki olarak belirtilmiştir (134).

Kawai ve arkadaşları tarafından sıçanlarda yapılan bir çalışmada imipramin uygulaması sonrası ZYT testinde immobilizasyon süresi istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşmüştür ve tırmanma hareketi süresi yükselmiştir (135).

Günümüzde KAT, ZYT ve AAT testleri birlikte uygulanarak antidepresan ilaçların etkinliği test edilmektedir. Machado ve arkadaşları tarafından farelerde yapılan bir çalışmada Rosmarinus ekstraktı KAT ve ZYT testlerinde immobilizasyon süresini kısaltmıştır. Ancak AAT'de lokomotor aktivitede herhangi bir değişikliğe yol açmamıştır. Bu bulgular Rosmarinus ekstraktının antidepresan benzeri etki gösterdiği şeklinde yorumlanmıştır (126).

Amin ve arkadaşları tarafından farelerde yapılan bir çalışmada krokin ve kroketin ekstraktlarının, akut uygulamaları sonrası KAT ve ZYT testlerinde fluoksetine benzer şekilde immobilizasyon süresinin kısaldığı ve böylelikle antidepresan benzeri etki gösterdiği raporlanmıştır (127).

Wang ve arkadaşları tarafından farelerde yapılan bir çalışmada doğal bir polifenol olan resveratrolün 21 gün boyunca süren kronik uygulaması ardından yapılan KAT ve ZYT testlerinde fluoksetine benzer şekilde immobilizasyon süresi kısalmıştır (125).

Zhong ve arkadaşları tarafından farelerde yapılan bir çalışmada Baihe-Zhimu bitki özünün antidepresan etkisi KAT ve ZYT testleriyle araştırılmış ve bu özün uygulanması bu testlerde immobilizasyon süresini kısaltmıştır. Bu etki antidepresan etki olarak değerlendirilmiştir (136).

#### **Venlafaksin ve pindololün ZYT ve KAT testlerindeki etkileri**

Yamada ve arkadaşları tarafından ddY suşu farelerde yapılan bir çalışmada venlafaksin (20 mg/kg) uygulaması, uygulamadan 60 dk sonra ZYT'de immobilizasyon süresini istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azaltmamıştır (137). Bununla birlikte aynı çalışmada venlafaksin 80 mg/kg dozunda uygulandığında immobilizasyon süresi istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşmüştür (137).

Ratajczak ve arkadaşları tarafından sıçanlarda yapılan bir çalışmada ise sadece venlafaksin uygulaması (20 mg/kg) 60 dk sonra ZYT'de immobilizasyon süresini düşürmüştür. Ancak venlafaksin-aripiprazol kombinasyonu immobilizasyon süresini sadece venlafaksin uygulamasındaki kadar düşürememiştir (138).

Malikowska ve arkadaşları tarafından İsviçre farelerinde yapılan bir başka çalışmada venlafaksin uygulaması (10 mg/kg) 60 dk sonra ZYT'de immobilizasyon süresini istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşürmüştür (139).

Singh ve arkadaşları tarafından İsviçre farelerinde yapılan bir diğer çalışmada venlafaksin uygulaması (15.7 mg/kg), ZYT ve KAT'de immobilizasyon süresini uygulamadan 30 dk sonra düşürmüştür (140).

Poleszak ve arkadaşları tarafından İsviçre farelerinde yapılan çalışmada venlafaksin (1mg/kg) uygulandıktan 60 dk sonra ZYT'de tek başına etkisiz iken, kafein (5 mg/kg) ile birlikte uygulandığında immobilizasyon süresini istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşürmüştür. Bununla birlikte kafein de (5mg/kg) tek başına uygulandıktan sonra immobilizasyon süresinde anlamlı bir değişime yol açmamıştır (141).

Araştırmamızda, Balb/c ırkı farelerde ZYT ve KAT'de venlafaksin (20 mg/kg) uygulaması farelerde tek başına immobilizasyon süresini uygulamadan 24 saat sonra yeterince düşürememiş ancak pindolol (15 mg/kg) ile kombine edildiğinde istatistiksel olarak anlamlı düzeyde bir düşme sağlanabilmiştir. Araştırmamızda venlafaksin (20 mg/kg) tek başına kullanıldığında ortaya çıkan antidepresan etkisine dair bulgular Yamada ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmadaki bulgularla uyumludur. Ratajczak, Malikowska ve Singh'in çalışmalarında venlafaksin, immobilizasyon süresi üzerine etkisi ile araştırmamızdaki venlafaksin etkisi arasındaki farklılıkların nedeni araştırmalarda kullanılan hayvanların cins ve ırklarındaki farklılık olabilir.

Kedzierska ve arkadaşları tarafından İsviçre farelerinde yapılan bir çalışmada ZYT'de pindolol uygulaması, immobilizasyon süresinde anlamlı düzeyde bir değişime yol açmamıştır (142). Yine Barauna ve arkadaşları tarafından İsviçre farelerinde yapılan bir başka çalışmada pindolol, ZYT'de immobilizasyon süresinde anlamlı bir değişikliğe yol açmamıştır (143). Bu çalışmalarla uyumlu olarak kendi araştırmamızda da pindolol immobilizasyon süresinde tek başına anlamlı bir değişime yol açmamıştır.

### **Venlafaksin pindolol ile potansiyasyonu**

Beique ve arkadaşları tarafından sıçanlarda yapılan bir *in vivo* elektrofizyolojik çalışmada iki gün süren venlafaksin (20mg/kg/gün) ya da venlafaksin-pindolol (20-15 mg/kg/gün) uygulamasından sonra dorsal rafe çekirdeği nöronlarındaki aksiyon potansiyeli frekansı ölçülmüştür. Venlafaksin uygulanan grupta AP sayısı istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşerken venlafaksin-pindolol kombinasyonunda AP sayısı yükselmiş ve kontrol değerleri ile yakın olarak saptanmıştır. Venlafaksin, pindolol ile birlikte kullanıldığında DRN bölgesindeki nöronlarda yol açtığı inhibisyon ortadan kalkmıştır (7). Yine Arborelius ve arkadaşları tarafından yapılan benzer bir başka çalışmada pindolol, sitalopramın yol açtığı DRN inhibisyonunu engellemiştir (5). Bu araştırmalarla uyumlu

olarak çalışmamızda ZYT ve KAT testlerinde pindolol-venlafaksin kombinasyonu sadece venlafaksine göre daha etkili antidepresan yanıtı yol açmıştır.

### 5.3. Sonuç

Bu çalışmada, serotoninin Balb/c ırkı farelerde DRD nöronları üzerine etkisi ilk defa incelenmiştir. Bu araştırma içerisinde elde edilen bulgular;

1. Akım kenetleme deneylerinde serotonin, transmembran potansiyelinde hiperpolarizasyona neden olmuştur.

2. Bu hiperpolarizasyonun nedeni araştırılırken voltaj kenetleme deneylerinde hücreler istirahat zar potansiyeline yakın bir değerde kenetlenirken serotonin dışı doğru akıma neden olmuştur. Bu durum serotonin uygulaması sırasında hücre dışına pozitif iyon geçişi olduğunu göstermektedir.

3. Serotonin ile indüklenen akımın hücre zarında hangi iyon geçişinden kaynaklandığı ve hangi iyon kanalının burada etkili olduğu sorusuna cevap aramak için nöron transmembran potansiyeli farklı adım potansiyellerinde kenetlenerek serotonin ile indüklenen akım karakterize edilmiştir. Bu karakterizasyon sonucu bir akım-voltaj ilişkisi ortaya çıkarılmıştır (Şekil 4.8). Akım-Voltaj ilişkisi incelendiğinde;  $I_{5-HT}$ 'nin ters potansiyelinin potasyumun Nernst potansiyeli ile yakın değerinde olduğu yani bu akımın potasyum iyonu geçişinden kaynaklandığı ve içe doğru düzeltici akım özelliği gösterdiği anlaşılmıştır. Bunun ardından GIRK kanallarının spesifik blokörü olarak bilinen kinin uygulanarak serotonin ile indüklenen akım bloke edilmiştir. Böylelikle serotoninin, DRD nöronlarında ortaya çıkardığı içe doğru düzeltici potasyum akımını, GIRK kanalı üzerinden gerçekleştirdiği gösterilmiştir.

4. Serotoninin etkisini hangi reseptör üzerinden gerçekleştirdiğinin anlaşılması amacıyla  $I_{5-HT}$ , WAY-100135 ile bloke edilmiştir ve ayrıca 8-OHDPAT ile  $I_{5-HT}$ 'nin imitasyonu sağlanmıştır. Böylelikle DRD'de ortaya çıkan serotonin yanıtının 5-HT<sub>1A</sub> reseptörü kaynaklı olduğu anlaşılmıştır.

5. Parsiyel 5-HT<sub>1A</sub> reseptör agonisti olarak raporlanmış olan pindololün bu etkisinin fare DRD nöronlarında da test edilmesi amaçlanmıştır. Bu kapsamda önce pindololün

serotonin ile indüklenen akımı bloke etmesi gösterilmiştir. Ardından 8-OHDPAT ile elde edilen saf 5-HT1A reseptörü kaynaklı akım, pindolol önuygulaması ile bloke edilmiştir.

6. Davranış deneyleriyle KAT ve ZYT testlerinde venlafaksin (20mg/kg) – pindolol (15 mg/kg) ilaç kombinasyonu grubu kontrol grubuna göre immobilizasyon süresini istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azaltarak antidepresan etki göstermiştir. Sadece venlafaksin (20 mg/kg) ya da sadece pindolol (15 mg/kg) uygulanan gruplarda ise kontrol grubuna göre immobilizasyon süresinde istatistiksel olarak anlamlı düzeyde bir azalma gözlenmemiştir. Bu durum pindololün venlafaksin antidepresan etkisini potansiyalize edici etkisini göstermektedir. Bu bulgular, araştırmamızda *in vitro* yama kenetleme deneylerindeki pindololün DRD nöronlarında serotonin ve 8-OHDPAT cevabı üzerine olan etkisine dair bulgular ile uyumludur.

Sonuç olarak, bu doktora tezi çalışmasında pindololün 5-HT1A reseptörü üzerine antagonistik etkisi voltaj kenetleme şartlarında fonksiyonel olarak ilk defa gösterilmiştir. Bu özelliğinden yararlanılarak pindolol, antidepresanların neden olduğu rafe çekirdeklerinin somatodendritik bölgesinde serotonin artışından kaynaklanan serotonerjik nöronların inhibisyonunu engellemek için kullanılabilir. Bu kapsamda özellikle SSRI direnci bulunan duygudurum bozukluğu hastalarında antidepresan ilaçlarla pindolol kombinasyonunu içeren ilave klinik çalışmalar önerilmektedir.

## KAYNAKLAR

1. Tamam L, Zeren T. Depresyonda Serotonerjik Düzenekler. *J Clin Psy.* 2002;5(4):11–18.
2. Twarkowski H, Hagen H, Manahan-Vaughan D. The 5-hydroxytryptamine<sub>4</sub> receptor enables differentiation of informational content and encoding in the hippocampus. *Hippocampus.* 2016;26(7):875–891.
3. Dedic N, Walser SM, Deussing JM. *Mouse Models of Depression.* Intechopen 2011.
4. Mendez-David I, David DJ, Darcet F, Wu M V, Kerdine-Römer S, Gardier AM, Hen R. Rapid anxiolytic effects of a 5-HT<sub>4</sub> receptor agonist are mediated by a neurogenesis-independent mechanism. *Neuropsychopharmacology.* 2014;39(6):1366–1378.
5. Arborelius L, Linner L, Wallsten C, Ahlenius S, Svensson TH. Partial 5-HT(1A) receptor agonist properties of (-)pindolol in combination with citalopram on serotonergic dorsal raphe cell firing in vivo. *Psychopharmacology (Berl).* 2000;151(1):77–84.
6. Corradetti R, Laaris N, Hanoun N, Laporte AM, Le Poul E, Hamon M, Lanfumey L. Antagonist properties of (-)-pindolol and WAY 100635 at somatodendritic and postsynaptic 5-HT(1A) receptors in the rat brain. *Br J Pharmacol.* 1998;123(3):449–462.
7. Jean-Claude, Blier P, De Montigny C, Debonnel G. Potentiation by (-)pindolol of the activation of postsynaptic 5-HT(1A) receptors induced by venlafaxine. *Neuropsychopharmacology.* 2000;23(3):294–306.
8. Portella MJ, de Diego-Adeliño J, Ballesteros J, Puigdemont D, Oller S, Santos B, Alvarez E, Artigas F, Perez V. Can We Really Accelerate and Enhance the Selective Serotonin Reuptake Inhibitor Antidepressant Effect? *J Clin Psychiatry.* 2011 ;72(07):962–969.
9. Martiny K, Lunde M, Bech P, Plenge P. A short-term double-blind randomized controlled pilot trial with active or placebo pindolol in patients treated with venlafaxine for major depression. *Nord J Psychiatry.* 2012 Jun;66(3):147–54.
10. Hornung JP. The human raphe nuclei and the serotonergic system. *J Chem Neuroanat.* 2003;26(4):331–343.
11. Törk I. Anatomy of the Serotonergic System. *Ann N Y Acad Sci.* 1990;600(1):9–34.
12. Underwood MD, Mann JJ, Arango V. Morphometry of Dorsal Raphe Nucleus Serotonergic Neurons in Alcoholism. *Alcohol Clin Exp Res.* 2007;31(5):837–45.
13. Schematic drawing depicting the location of the serotonergic cell body groups in a sagittal section of the rat central nervous system and their major projections, <http://neuronbank.org/wiki/index.php/File:Ch13f2.gif>, Erişim tarihi: 17 Nisan 2019
14. Waterhouse BD, Mihailoff GA, Baack JC, Woodward DJ. Serotonergic and non-serotonergic projections from the raphe nuclei to the piriform cortex in the rat: a cholera toxin B subunit (CTb) and 5-HT immunohistochemical study. *1986;249(4):460–476.*
15. Datiche F, Luppi PH, Cattarelli M. Serotonergic and non-serotonergic projections from the raphe nuclei to the piriform cortex in the rat: a cholera toxin B subunit (CTb) and 5-HT immunohistochemical study. *Brain Res.* 1995;671(1):27–37.



16. Albert PR, Le François B, Millar AM. Transcriptional dysregulation of 5-HT1A autoreceptors in mental illness. *Mol Brain*. 2011;4(1):21.
17. Zhou L, Liu M-Z, Li Q, Deng J, Mu D, Sun Y-G. Organization of Functional Long-Range Circuits Controlling the Activity of Serotonergic Neurons in the Dorsal Raphe Nucleus. *Cell Rep*. 2017;18(12):3018–3032.
18. Varga V, Kocsis B, Sharp T. Electrophysiological evidence for convergence of inputs from the medial prefrontal cortex and lateral habenula on single neurons in the dorsal raphe nucleus. *Eur J Neurosci*. 2003;17(2):280–286.
19. Monti JM. The structure of the dorsal raphe nucleus and its relevance to the regulation of sleep and wakefulness. *Sleep Med Rev*. 2010;14(5):307–317.
20. Andrade R, Haj-Dahmane S. Serotonin neuron diversity in the dorsal raphe. 2013; 4(1): 22–25
21. Weber T. Inducible gene manipulations in serotonergic neurons. *Front Mol Neurosci*. 2009;2(2):1–8.
22. Beck SG, Pan Y-Z, Akanwa AC, Kirby LG. Median and dorsal raphe neurons are not electrophysiologically identical. *J Neurophysiol*. 2004;91(2):994–1005.
23. Hasegawa E, Maejima T, Yoshida T, Masseck OA, Herlitze S, Yoshioka M, Sakurai T, Mieda M. Serotonin neurons in the dorsal raphe mediate the anticataplectic action of orexin neurons by reducing amygdala activity. *Proc Natl Acad Sci*. 2017;114(17):E3526–3535.
24. Riad M, Rbah L, Verdurand M, Aznavour N, Zimmer L, Descarries L. Unchanged density of 5-HT(1A) autoreceptors on the plasma membrane of nucleus raphe dorsalis neurons in rats chronically treated with fluoxetine. *Neuroscience*. 2008;151(3):692–700.
25. Lau T, Schneidt T, Heimann F, Gundelfinger ED, Schloss P. Somatodendritic serotonin release and re-uptake in mouse embryonic stem cell-derived serotonergic neurons. *Neurochem Int*. 2010;57(8):969–978.
26. Quentin E, Belmer A, Maroteaux L. Somato-Dendritic Regulation of Raphe Serotonin Neurons; A Key to Antidepressant Action. *Front Neurosci*. 2018;12:982.
27. D Muck-Seler. Serotonin. *Period Biol*. 2011;113(1):29-41.
28. Savelieva K V., Zhao S, Pogorelov VM, Rajan I, Yang Q, Cullinan E, Lanthorn TH. Genetic disruption of both tryptophan hydroxylase genes dramatically reduces serotonin and affects behavior in models sensitive to antidepressants. Bartolomucci A, editor. *PLoS One*. 2008;3(10):e3301.
29. Walther DJ, Peter JU, Bashammakh S, Hörtnagl H, Voits M, Fink H, Bader M. Synthesis of serotonin by a second tryptophan hydroxylase isoform. *Science*. 2003;299(5603):76.
30. Zhang X, Gainetdinov RR, Beaulieu J-M, Sotnikova TD, Burch LH, Williams RB, Schwartz DA, Krishnan KR, Caron MG. Loss-of-Function Mutation in Tryptophan Hydroxylase-2 Identified in Unipolar Major Depression. *Neuron*. 2005;45(1):11-16.
31. Kılıç N. *Lehninger Biyokimyanın İlkeleri - 3. Baskı*. 3rd ed. Michael M. Cox - David L. Nelson (Editor). Palme Yayıncılık; 2005. p.420–445
32. Frazer A, Hensler JG. Serotonin Receptors. *Basic Neurochem Bookshelf* <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK28234/>. 1999;1–8.
33. Palacios JM. Serotonin receptors in brain revisited. *Brain Res*. 2016;1645:46–49.
34. Stiedl O, Pappa E, Konradsson-Geuken A, Ögren SO. The role of the serotonin receptor subtypes 5-HT1A and 5-HT7 and its interaction in emotional learning and memory. *Front Pharmacol*. 2015;6:162.
35. Schatzberg AF, Nemeroff CB. *The American Psychiatric Publishing Textbook of*

- Psychopharmacology, Fifth Edition, USA: American Psychiatric Publishing, 2017
36. Palchadhuri M, Flügge G. 5-HT<sub>1A</sub> receptor expression in pyramidal neurons of cortical and limbic brain regions. *Cell Tissue Res.* 2005;321(2):159–72.
  37. Pompeiano M, Palacios JM, Mengod G. Distribution and cellular localization of mRNA coding for 5-HT<sub>1A</sub> receptor in the rat brain: correlation with receptor binding. *J Neurosci.* 1992;12(2):440–453.
  38. Chalmers DT, Watson SJ. Comparative anatomical distribution of 5-HT<sub>1A</sub> receptor mRNA and 5-HT<sub>1A</sub> binding in rat brain: A combined in situ hybridisation/in vitro receptor autoradiographic study. *Brain Res.* 1991;561(1):51–60.
  39. Albert PR, Zhou QY, Van Tol HH, Bunzow JR, Civelli O. Cloning, functional expression, and mRNA tissue distribution of the rat 5-hydroxytryptamine<sub>1A</sub> receptor gene. *J Biol Chem.* 1990;265(10):5825–5832.
  40. Hoyer D, Clarke DE, Fozard JR, Hartig PR, Martin GR, Mylecharane EJ, Saxena PR, Humphrey PP. International Union of Pharmacology classification of receptors for 5-hydroxytryptamine (Serotonin). *Pharmacol Rev.* 1994;46(2):157–203.
  41. Riad M, Garcia S, Watkins KC, Jodoin N, Doucet E, Langlois X, Mestikawy S, Hamon M, Descarries L. Somatodendritic localization of 5-HT<sub>1A</sub> and preterminal axonal localization of 5-HT<sub>1B</sub> serotonin receptors in adult rat brain. *J Comp Neurol.* 2000;417(2):181–194.
  42. Sotelo C, Cholley B, El Mestikawy S, Gozlan H, Hamon M. Direct Immunohistochemical Evidence of the Existence of 5-HT<sub>1A</sub> Autoreceptors on Serotonergic Neurons in the Midbrain Raphe Nuclei. *Eur J Neurosci.* 1990;2(12):1144–1154.
  43. Verge D, Daval G, Patey A, Gozlan H, el Mestikawy S, Hamon M. Presynaptic 5-HT autoreceptors on serotonergic cell bodies and/or dendrites but not terminals are of the 5-HT<sub>1A</sub> subtype. *Eur J Pharmacol.* 1985;113(3):463–464.
  44. Hjorth S, Auerbach SB. Further evidence for the importance of 5-HT<sub>1A</sub> autoreceptors in the action of selective serotonin reuptake inhibitors. *Eur J Pharmacol.* 1994;260(2–3):251–255.
  45. Hjorth S, Bengtsson HJ, Milano S. Raphe 5-HT<sub>1A</sub> autoreceptors, but not postsynaptic 5-HT<sub>1A</sub> receptors or beta-adrenoceptors, restrain the citalopram-induced increase in extracellular 5-hydroxytryptamine in vivo. *Eur J Pharmacol.* 1996;316(1):43–47.
  46. Romero L, Artigas F. Preferential potentiation of the effects of serotonin uptake inhibitors by 5-HT<sub>1A</sub> receptor antagonists in the dorsal raphe pathway: role of somatodendritic autoreceptors. *J Neurochem.* 1997;68(6):2593–2603.
  47. Liu R-J, Lambe EK, Aghajanian GK. Somatodendritic autoreceptor regulation of serotonergic neurons: dependence on l-tryptophan and tryptophan hydroxylase-activating kinases. *Eur J Neurosci.* 2005;21(4):945–958.
  48. Bortolozzi A, Amargós-Bosch M, Toth M, Artigas F, Adell A. In vivo efflux of serotonin in the dorsal raphe nucleus of 5-HT<sub>1A</sub> receptor knockout mice. *J Neurochem.* 2004;88(6):1373–1379.
  49. Frey BN, Rosa-Neto P, Lubarsky S, Diksic M. Correlation between serotonin synthesis and 5-HT<sub>1A</sub> receptor binding in the living human brain: A combined  $\alpha$ -[<sup>11</sup>C]MT and [<sup>18</sup>F]MPPF positron emission tomography study. *Neuroimage.* 2008;42(2):850–857.
  50. Richer M, Hen R, Blier P. Modification of serotonin neuron properties in mice lacking 5-HT<sub>1A</sub> receptors. *Eur J Pharmacol.* 2002;435(2–3):195–203.

51. Albert PR, François B Le. Modifying 5-HT<sub>1A</sub> receptor gene expression as a new target for antidepressant therapy. *Front Neurosci.* 2010;4:35.
52. Saulin A, Savli M, Lanzenberger R. Serotonin and molecular neuroimaging in humans using PET. *Amino Acids.* 2012;42(6):2039–2057.
53. Ramboz S, Oosting R, Amara DA, Kung HF, Blier P, Mendelsohn M, Mann JJ, Brunner D, Hen R. Serotonin receptor 1A knockout: An animal model of anxiety-related disorder. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95(24):14476–14481.
54. Parks CL, Robinson PS, Sibille E, Shenk T, Toth M. Increased anxiety of mice lacking the serotonin<sub>1A</sub> receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95(18):10734–10739.
55. Heisler LK, Chu HM, Brennan TJ, Danao JA, Bajwa P, Parsons LH, Tecott LH. Elevated anxiety and antidepressant-like responses in serotonin 5-HT<sub>1A</sub> receptor mutant mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95(25):15049–15054.
56. Santarelli L, Saxe M, Gross C, Surget A, Battaglia F, Dulawa S, Weisstaub N, Lee J, Duman R, Arancio O, Belzung C, Hen R. Requirement of Hippocampal Neurogenesis for the Behavioral Effects of Antidepressants. *Science.* 2003;301(5634):805–809.
57. Fava M, Kendler KS. Major depressive disorder. *Neuron.* 2000;28(2):335–41.
58. Doris A, Ebmeier K, Shajahan P. Depressive illness. *Lancet.* 1999;354(9187):1369–1375.
59. Ustün TB, Ayuso-Mateos JL, Chatterji S, Mathers C, Murray CJL. Global burden of depressive disorders in the year 2000. *Br J Psychiatry.* 2004;184:386–392.
60. WHO | World health report 2001 press kit. WHO. 2013.
61. Mathers CD, Loncar D. Projections of Global Mortality and Burden of Disease from 2002 to 2030. Samet J, editor. *PLoS Med.* 2006;3(11):e442.
62. Mann JJ, Arango VA, Avenevoli S, Brent DA, Champagne FA, Clayton P, Currier D, Dougherty DM, Haghghi F, Hodge SE, Kleinman J, Lehner T, McMahon F, Moscicki EK, Okuendo MA, Pandey GN, Pearson J, Stanley B, Terwilliger J, Wenzel A. Candidate Endophenotypes for Genetic Studies of Suicidal Behavior. *Biol Psychiatry.* 2009;65(7):556–563.
63. Bhagwagar Z, Cowen PJ. ‘It’s not over when it’s over’: persistent neurobiological abnormalities in recovered depressed patients. *Psychol Med.* 2008;38(03):307–313.
64. Jans LAW, Riedel WJ, Markus CR, Blokland A. Serotonergic vulnerability and depression: assumptions, experimental evidence and implications. *Mol Psychiatry.* 2007;12(6):522–543.
65. Tremblay P, Blier P. Catecholaminergic strategies for the treatment of major depression. *Curr Drug Targets.* 2006;7(2):149–158.
66. Hamani C, Diwan M, Macedo CE, Brandão ML, Shumake J, Gonzalez-Lima F, Raymond R, Lozano AM, Fletcher PJ, Nobrega JN. Antidepressant-Like Effects of Medial Prefrontal Cortex Deep Brain Stimulation in Rats. *Biol Psychiatry.* 2010;67(2):117–124.
67. Berton O, Nestler EJ. New approaches to antidepressant drug discovery: beyond monoamines. *Nat Rev Neurosci.* 2006;7(2):137–151.
68. Blier P, Ward NM. Is there a role for 5-HT<sub>1A</sub> agonists in the treatment of depression? *Biol Psychiatry.* 2003;53(3):193–203.
69. Piñeyro G, Blier P. Autoregulation of serotonin neurons: role in antidepressant drug action. *Pharmacol Rev.* 1999;51(3):533–591.
70. Blier P. The pharmacology of putative early-onset antidepressant strategies. *Eur Neuropsychopharmacol.* 2003;13(2):57–66.

71. Covington HE, Vialou V, Nestler EJ. From synapse to nucleus: novel targets for treating depression. Vol. 58, *Neuropharmacology*. 2010;58(4-5): 683–593.
72. Skolnick P, Popik P, Trullas R. Glutamate-based antidepressants: 20 years on. *Trends Pharmacol Sci*. 2009;30(11):563–569.
73. Bhagwagar Z, Rabiner EA, Sargent PA, Grasby PM, Cowen PJ. Persistent reduction in brain serotonin1A receptor binding in recovered depressed men measured by positron emission tomography with [<sup>11</sup>C]WAY-100635. *Mol Psychiatry*. 2004;9(4):386–392.
74. Stockmeier CA, Howley E, Shi X, Sobanska A, Clarke G, Friedman L, Rajkowska G. Antagonist but not agonist labeling of serotonin-1A receptors is decreased in major depressive disorder. *J Psychiatr Res*. 2009;43(10):887–894.
75. Moses-Kolko EL, Wisner KL, Price JC, Berga SL, Drevets WC, Hanusa BH, Loucks TL, Meltzer CC. Serotonin 1A receptor reductions in postpartum depression: a positron emission tomography study. *Fertil Steril*. 2008;89(3):685–692.
76. Sargent PA, Kjaer KH, Bench CJ, Rabiner EA, Messa C, Meyer J, Gunn RN, Grasby PM, Cowen PJ. Brain serotonin1A receptor binding measured by positron emission tomography with [<sup>11</sup>C]WAY-100635: effects of depression and antidepressant treatment. *Arch Gen Psychiatry*. 2000;57(2):174–80.
77. Shively CA, Friedman DP, Gage HD, Bounds MC, Brown-Proctor C, Blair JB, Handerson JA, Smith MA, Buccheimer N. Behavioral Depression and Positron Emission Tomography–Determined Serotonin 1A Receptor Binding Potential in Cynomolgus Monkeys. *Arch Gen Psychiatry*. 2006;63(4):396.
78. Neumeister A, Bain E, Nugent AC, Carson RE, Bonne O, Luckenbaugh DA, Eckelman W, Herskowitz P, Charney DS, Drevets WC. Reduced Serotonin Type 1A Receptor Binding in Panic Disorder. *J Neurosci*. 2004;24(3):589–591.
79. Sullivan GM, Oquendo MA, Simpson N, Van Heertum RL, Mann JJ, Parsey R V. Brain Serotonin 1A Receptor Binding in Major Depression Is Related to Psychiatric and Somatic Anxiety. *Biol Psychiatry*. 2005;58(12):947–954.
80. Lanzenberger RR, Mitterhauser M, Spindelegger C, Wadsak W, Klein N, Mien LK, Holik A, Attarbaschi T, Mossaheb N, Sacher J, Geiss-Granadia T, Kletter K, Kasper S, Tauscher J. Reduced Serotonin-1A Receptor Binding in Social Anxiety Disorder. *Biol Psychiatry*. 2007;61(9):1081–1089.
81. Akimova E, Lanzenberger R, Kasper S. The Serotonin-1A Receptor in Anxiety Disorders. *Biol Psychiatry*. 2009;66(7):627–635.
82. Nash JR, Sargent PA, Rabiner EA, Hood SD, Argyropoulos S V., Potokar JP, Grasby PM, Nutt DJ. Serotonin 5-HT1A receptor binding in people with panic disorder: positron emission tomography study. *Br J Psychiatry*. 2008;193(03):229–234.
83. Tauscher J, Bagby RM, Javanmard M, Christensen BK, Kasper S, Kapur S. Inverse Relationship Between Serotonin 5-HT1A Receptor Binding and Anxiety: A [<sup>11</sup>C]WAY-100635 PET Investigation in Healthy Volunteers. *Am J Psychiatry*. 2001;158(8):1326–1328.
84. Stockmeier CA, Shapiro LA, Dilley GE, Kolli TN, Friedman L, Rajkowska G. Increase in serotonin-1A autoreceptors in the midbrain of suicide victims with major depression—postmortem evidence for decreased serotonin activity. *J Neurosci*. 1998;18(18):7394–7401.
85. Boldrini M, Underwood MD, Mann JJ, Arango V. Serotonin-1A autoreceptor binding in the dorsal raphe nucleus of depressed suicides. *J Psychiatr Res*. 2008;42(6):433–442.

86. Drevets WC, Thase ME, Moses-Kolko EL, Price J, Frank E, Kupfer DJ, Mathis C. Serotonin-1A receptor imaging in recurrent depression: replication and literature review. *Nucl Med Biol.* 2007;34(7):865–877.
87. O'Connor EA, Whitlock EP, Gaynes B, Beil TL. Screening for Depression in Adults and Older Adults in Primary Care: An Updated Systematic Review. Department of health and human services, US: AHRQ publication, 2009.
88. Newman-Tancredi A, Chaput C, Gavaudan S, Verri le L, Millan MJ. Agonist and antagonist actions of (-)pindolol at recombinant, human serotonin(1A) (5-HT(1A)) receptors. *Neuropsychopharmacology.* 1998;18(5):395–398.
89. Portella MJ, De Diego-Adeli o J, Ballesteros J, Puigdemont D, Oller S, Santos B,  lvarez E, Artigas F, P rez V. Can we really accelerate and enhance the selective serotonin reuptake inhibitor antidepressant effect? A randomized clinical trial and a meta-analysis of pindolol in nonresistant depression. *J Clin Psychiatry.* 2011;72(7):962–969.
90. Clifford EM, Gartside SE, Umbers V, Cowen PJ, Ly Hajo  M, Sharp T. Electrophysiological and neurochemical evidence that pindolol has agonist properties at the 5-HT 1A autoreceptor in vivo. 1998;124(1):206-212
91. Sprouse J, Braselton J, Reynolds L. 5-HT(1A) agonist potential of pindolol: Electrophysiologic studies in the dorsal raphe nucleus and hippocampus. *Biol Psychiatry.* 2000;47(12):1050–1055.
92. FDA.Venlafaxine hydrochloride.  
[https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda\\_docs/label/2006/020151s044,020699s0711bl.pdf](https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2006/020151s044,020699s0711bl.pdf), Erişim tarihi: 16/10/2019
93. Visken  (pindolol).  
[https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda\\_docs/label/2007/018285s0341bl.pdf](https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2007/018285s0341bl.pdf), Erişim tarihi: 19/03/2019
94. Hille B. Ionic channels: molecular pores of excitable membranes. *Harvey Lect.* 1986;82:47–69.
95. A. L. Hodgkin A. F. Huxley. A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *J Physiol.* 1952;117:500–544.
96. A. L. Hodgkin And A. F. Huxley. Currents carried by sodium and potassium ions through the membrane of the giant axon of loligo. *J Physiol.* 1952;116(4):449–472.
97. Sakmann B, Neher E. Patch clamp techniques for studying ionic channels in excitable membranes. *Ann Rev Physiol.* 1984;46:455–472.
98. B. Hille. *Ion Channels Of Excitable Membranes.* 3<sup>rd</sup> ed. Sinauer Associates,INC; 2001.
99. Lippiat JD, editor. *Potassium Channels.* Totowa, NJ: Humana Press; 2008. p.166–167
100. Jeong HJ, Han SH, Min BI, Cho YW. 5-HT1A receptor-mediated activation of G-protein-gated inwardly rectifying K<sup>+</sup> current in rat periaqueductal gray neurons. *Neuropharmacology.* 2001;41(2):175–185.
101. File:Ion channel.png - Wikimedia Commons  
[https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Ion\\_channel.png](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Ion_channel.png), Erişim tarihi: 31/05/19
102. G hwiler BH, Brown DA. GABAB-receptor-activated K<sup>+</sup> current in voltage-clamped CA3 pyramidal cells in hippocampal cultures. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1985;82(5):1558–1562.
103. Lacey MG, Mercuri NB, North RA. On the potassium conductance increase activated by GABAB and dopamine D2 receptors in rat substantia nigra neurones. *J Physiol.* 1988;401:437–453.

104. Andrade R, Nicoll RA. Pharmacologically distinct actions of serotonin on single pyramidal neurones of the rat hippocampus recorded in vitro. *J Physiol.* 1987;394:99–124.
105. Trussell LO, Jackson MB. Adenosine-activated potassium conductance in cultured striatal neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1985;82(14):4857–4861.
106. Egan TM, North RA. Acetylcholine hyperpolarizes central neurones by acting on an M2 muscarinic receptor. *Nature.* 1986;319(6052):405–407.
107. Williams JT, Henderson G, North RA. Characterization of alpha 2-adrenoceptors which increase potassium conductance in rat locus coeruleus neurones. *Neuroscience.* 1985;14(1):95–101.
108. Rifkin RA, Moss SJ, Slesinger PA. G Protein-Gated Potassium Channels: A Link to Drug Addiction. *Trends in Pharmacological Sciences.* 2017;38:378–392.
109. Lüscher C, Slesinger PA. Emerging roles for G protein-gated inwardly rectifying potassium (GIRK) channels in health and disease. *Nat Rev Neurosci.* 2010;11(5):301–315.
110. Mengod G, Montaña M, Cortés R, Sallés J, García del Caño G, Saenz del Burgo L. Chronic effects of corticosterone on GIRK1-3 subunits and 5-HT1A receptor expression in rat brain and their reversal by concurrent fluoxetine treatment. *Eur Neuropsychopharmacol.* 2012;23(3):229–239.
111. Corey S, Krapivinsky G, Krapivinsky L, Clapham DE. Number and stoichiometry of subunits in the native atrial G-protein-gated K<sup>+</sup> channel, I(KACh). *J Biol Chem.* 1998;273(9):5271–5278.
112. Rood BD, Calizo LH, Piel D, Spangler ZP, Campbell K, Beck SG. Dorsal Raphe Serotonin Neurons in Mice: Immature Hyperexcitability Transitions to Adult State during First Three Postnatal Weeks Suggesting Sensitive Period for Environmental Perturbation. *J Neurosci.* 2014;34(14):4809–4821.
113. Paxinos G, Franklin KBJ, Franklin KBJ. *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates.* Academic Press; 2001.
114. Morton RA, Yanagawa Y, Valenzuela CF. Electrophysiological assessment of serotonin and gaba neuron function in the dorsal raphe during the third trimester equivalent developmental period in mice. *eNeuro.* 2015;2(6):0079-15.2015.
115. Kirby LG, Pernar L, Valentino RJ, Beck SG. Distinguishing characteristics of serotonin and non-serotonin-containing cells in the dorsal raphe nucleus: Electrophysiological and immunohistochemical studies. *Neuroscience.* 2003;116(3):669–683.
116. VanderMaelen CP, Aghajanian GK. Electrophysiological and pharmacological characterization of serotonergic dorsal raphe neurons recorded extracellularly and intracellularly in rat brain slices. *Brain Res.* 1983;289:109–119.
117. Calizo LH, Akanwa A, Ma X, Pan YZ, Lemos JC, Craige C, Heemstra LA, Beck SG. Raphe serotonin neurons are not homogenous: Electrophysiological, morphological and neurochemical evidence. *Neuropharmacology.* 2011;61(3):524–543.
118. Katayama J, Yakushiji T, Akaike N. Characterization of the K<sup>+</sup>current mediated by 5-HT(1A) receptors in the acutely dissociated rat dorsal raphe neurons. *Brain Res.* 1997;745(1–2):283–292.
119. Penington NJ, Kellyt JS, Fox AP. Whole-cell recordings of inwardly rectifying K<sup>+</sup> currents activated by 5-HT1A receptors on dorsal raphe neurones of the adult rat. *J Physiol.* 1993;387–405.
120. Bhattarai JP, Roa J, Herbison AE, Han SK. Serotonin Acts Through 5-HT1 and 5-HT2 Receptors to Exert Biphasic Actions on GnRH Neuron Excitability in the

- Mouse. *Endocrinology*. 2014;155(2):513–524.
121. Chen X, Sun Y, Mao L, Li L, Cui G, Bai W, Lihua Q. 5-Hydroxytryptamine inhibits neuronal high-voltage-activated calcium currents in the preoptic anterior hypothalamus via 5-hydroxytryptamine 1A and 7 receptors. *Int J Clin Exp Med*. 2017;10(9):13089-13099
  122. Shen K-Z, Kozell LB, Johnson SW. Multiple conductances are modulated by 5-HT receptor subtypes in rat subthalamic nucleus neurons. *Neuroscience*. 2007;148(4):996–1003.
  123. Cotel F, Exley R, Cragg SJ, Perrier J-F. Serotonin spillover onto the axon initial segment of motoneurons induces central fatigue by inhibiting action potential initiation. *Proc Natl Acad Sci*. 2013;110(12):4774–4779.
  124. Behbehani MM, Liu H, Jiang M, Pun RYK, Shipley MT. Activation of serotonin1A receptors inhibits midbrain periaqueductal gray neurons of the rat. *Brain Res*. 1993;612(1–2):56–60.
  125. Wang Z, Gu J, Wang X, Xie K, Luan Q, Wan N, Zhang Q, Jiang H, Liu D. Antidepressant-like activity of resveratrol treatment in the forced swim test and tail suspension test in mice: The HPA axis, BDNF expression and phosphorylation of ERK. *Pharmacol Biochem Behav*. 2013;112:104–110.
  126. Machado DG, Bettio LEB, Cunha MP, Capra JC, Dalmarco JB, Pizzolatti MG, Rodrigues AL. Antidepressant-like effect of the extract of *Rosmarinus officinalis* in mice: Involvement of the monoaminergic system. *Prog Neuro-Psychopharmacology Biol Psychiatry*. 2009;33(4):642–650.
  127. Amin B, Nakhsaz A, Hosseinzadeh H. Evaluation of the antidepressant-like effects of acute and sub-acute administration of crocin and crocetin in mice. 2015;5(5):458-468.
  128. Kobessy FH. *Psychiatric Disorders: Methods and Protocols*. Psychiatry, USA, Humana Press, 2012: p.103-144
  129. Leibrock CB, Voelkl J, Kuro-O M, Lang F, Lang UE. 1,25(OH)2D3 dependent overt hyperactivity phenotype in *klotho*-hypomorphic mice. 2016;6:24879.
  130. Bayliss D a., Li YW, Talley EM. Effects of serotonin on caudal raphe neurons: Activation of an inwardly rectifying potassium conductance. *J Neurophysiol*. 1997;77(3):1349–1361.
  131. Loucif AJC, Bonnavion P, Macri B, Golmard J-L, Boni C, Melfort M, Leonard G, Lesch KP, Adrien J, Jacquin TD. Gender-dependent regulation of G-protein-gated inwardly rectifying potassium current in dorsal raphe neurons in knock-out mice devoid of the 5-hydroxytryptamine transporter. *J Neurobiol*. 2006;66(13):1475–1488.
  132. Santi CM, Orta G, Salkoff L, Visconti PE, Darszon A, Treviño CL. K<sup>+</sup> and Cl<sup>-</sup> Channels and Transporters in Sperm Function. *Curr Top Dev Biol*. 2013;102:385–421.
  133. Porsolt RD, Bertin A, Jalfre M. Behavioral despair in mice: a primary screening test for antidepressants. *Arch Int Pharmacodyn Ther*. 1977;229(2):327–336.
  134. Steru L, Chermat R, Thierry B, Simon P. The tail suspension test: a new method for screening antidepressants in mice. *Psychopharmacology (Berl)*. 1985;85(3):367–370.
  135. Kawai H, Kodaira N, Tanaka C, Ishibashi T, Kudo N, Kawashima Y, et al. Time of Administration of Acute or Chronic Doses of Imipramine Affects its Antidepressant Action in Rats. *J Circadian Rhythms*. 2018;16(1):5.
  136. Zhong M, Tian X, Chen S, Chen M, Guo Z, Zhang M, Zheng G, Li Z, Shi Z, Wang G, Gao H, Liu F, Huang C. Identifying the active components of Baihe-Zhimu

- decoction that ameliorate depressive disease by an effective integrated strategy: a systemic pharmacokinetics study combined with classical depression model tests. *Chin Med.* 2019;14:37.
137. Yamada K, Kobayashi M, Mori A, Jenner P, Kanda T. Antidepressant-like activity of the adenosine A<sub>2A</sub> receptor antagonist, istradefylline (KW-6002), in the forced swim test and the tail suspension test in rodents. *Pharmacol Biochem Behav.* 2013;114–115:23–30.
  138. Ratajczak P, Kus K, Skurzyńska M, Nowakowska E. The influence of aripiprazole and venlafaxine on the antidepressant-like effect observed in prenatally stressed rats (animal model of depression). *Hum Exp Toxicol.* 2018;37(9):972–982.
  139. Malikowska N, Fijałkowski Ł, Nowaczyk A, Popik P, Sałat K. Antidepressant-like activity of venlafaxine and clonidine in mice exposed to single prolonged stress – A model of post-traumatic stress disorder. Pharmacodynamic and molecular docking studies. *Brain Res.* 2017;1673:1–10.
  140. Singh P, Singh TG. Modulation of muscarinic system with serotonin-norepinephrine reuptake inhibitor antidepressant attenuates depression in mice. *Indian J Pharmacol.* 2015;47(4):388–393.
  141. Poleszak E, Szopa A, Wyska E, Wośko S, Serefko A, Wlaź A, Pieróg M, Wróbel A, Wlaź P et al. The influence of caffeine on the activity of moclobemide, venlafaxine, bupropion and milnacipran in the forced swim test in mice. *Life Sci.* 2015;136:13–18.
  142. Kędzierska E, Fiorino F, Magli E, Poleszak E, Wlaź P, Orzelska-Górka J, Knap B, Kotlińska JH. New arylpiperazine derivatives with antidepressant-like activity containing isonicotinic and picolinic nuclei: evidence for serotonergic system involvement. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 2019;392(6):743–754.
  143. Barauna SC, Kaster MP, Heckert BT, do Nascimento KS, Rossi FM, Teixeira EH, Cavada BS, Rodrigues AL, Leal RB. Antidepressant-like effect of lectin from *Canavalia brasiliensis* (ConBr) administered centrally in mice. *Pharmacol Biochem Behav.* 2006;85(1):160–169.



# ETİK KURUL KARARI



T.C.  
GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ  
UNIVERSITY OF GAZİANTEP  
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU BAŞKANLIĞI  
LOCAL ETHICS COMMITTEE OF ANIMAL EXPERIMENTS  
ARAŞTIRMA BAŞVURU ONAYI  
RESEARCH APPLICATION CONSENT



TOPLANTI TARİHİ (Meeting Date)	TOPLANTI SAYISI (Meeting No)	TOPLANTI YERİ (Meeting Place)
17.09.2019	8	Gaziantep Hayvanat Bahçesi

BAŞVURU BİLGİLERİ Application Information	Araştırmanın Başlığı Research Title	Fare beyinde serotonerjik sistemin elektrofizyolojik olarak incelenmesi Electrophysiological investigation of serotonergic system in mouse brain
	Başvuru Tarihi Application Date	25.07.2019
	Protokol no Protocol no	107

KARAR BİLGİLERİ Decision	Karar No: 2019/28 <input checked="" type="checkbox"/> Kabul (Accepted)	Decision No: 2019/28 <input type="checkbox"/> Red (Not Accepted)
	Arş. Gör. Dr. Burak YAMAN'ın yürütücüsü olduğu ve uygunluk kararı alınan (Etik kurul karar no: 2018/11 – 2019/8) daha önceki başvurusu ile ilgili değişiklik önerisi incelenmiş, değişiklik başvurusunun Gaziantep Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Yönergesince "uygun" olduğuna toplantıya katılan üyelerin oy birliği ile karar verilmiştir.	

Yürütücü Coordinator	Arş. Gör. Dr. Burak YAMAN Gaziantep Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Fizyoloji Anabilim Dalı
Araştırmacılar Researchers	Prof. Dr. Ramazan BAL

ETİK KURUL ÜYELERİ				
Ünvanı/Adı/Soyadı	Kurumu	İlişki	Katılım	İmza
Prof. Dr. A. Tuncay DEMİRÜREK (Başkan)	GAÜN Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji AD.	H	E	
Prof. Dr. Behçet AL (Üye)	GAÜN Tıp Fakültesi Acil Tıp AD.	H	H	KATILMADI
Prof. Dr. Tekin KARSLIĞİL (Üye)	GAÜN Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji AD.	H	E	
Prof. Dr. Sibel OĞUZKAN BALCI (Üye)	GAÜN Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji AD.	H	E	
Prof. Dr. Emine Elçin EMRE (Üye)	GAÜN Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü	H	E	
Prof. Dr. Can DEMİREL (Üye)	GAÜN Tıp Fakültesi Biyofizik AD	H	E	
Dr. Öğr. Üyesi Davut Sinan KAPLAN (Üye)	GAÜN Tıp Fakültesi Fizyoloji AD.	H	E	
Dr. Öğr. Üyesi Merve GÖYMEN (Üye)	GAÜN Diş Hekimliği Fakültesi Ortodonti AD.	H	E	
Öğr. Gör. Dr. Ahmet Sarper BOZKURT (Üye)	GAÜN Teknik Bilimler MYO Bitkisel ve Hayvansal Üretim	H	E	
Veteriner Hekim Celal ÖZSÖYLER (Üye)	Gaziantep Büyükşehir Belediyesi Hayvanat Bahçesi	H	E	
Avukat Orhan BEYAZ (Üye)	Serbest, Dernek Üyesi	H	E	

E: Evet, H: Hayır

## ÖZGEÇMİŞ

Burak Yaman 23/06/1990 tarihinde Elazığ'da doğdu. İlk ve orta öğreniminin ardından 2007 yılında Elazığ Kaya Karakaya Fen Lisesi'ni bitirdi. 2013 yılında Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi'nden mezun olduktan sonra Şanlıurfa Harran Devlet Hastanesi'nde pratisyen tabip olarak göreve başladı. 2015 yılında Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı'na doktor araştırma görevlisi olarak atandı. Şu anda buradaki görevine devam etmektedir.

