MARMARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BAZI ANTİDEPRESAN İLAÇLARIN ZEBRA BALIĞI (*Danio rerio*)'NDAKİ OKSİDATİF STRES PARAMETRELERİNE OLAN ETKİLERİNİN BİYOKİMYASAL VE MOLEKÜLER YÖNTEMLER İLE DEĞERLENDİRİLMESİ

ÖMER FARUK KARASAKAL

DOKTORA TEZİ
Biyoloji Anabilim Dalı
Biyoloji Programı

DANIŞMAN

Prof. Dr. Figen Esin KAYHAN

EŞ DANIŞMAN

Dr.Öğr. Üyesi Özer AKGÜL

İSTANBUL, 2021

MARMARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BAZI ANTİDEPRESAN İLAÇLARIN ZEBRA BALIĞI (*Danio rerio*)'NDAKİ OKSİDATİF STRES PARAMETRELERİNE OLAN ETKİLERİNİN BİYOKİMYASAL VE MOLEKÜLER YÖNTEMLER İLE DEĞERLENDİRİLMESİ

ÖMER FARUK KARASAKAL

720114007

DOKTORA TEZİ
Biyoloji Anabilim Dalı
Biyoloji Programı

DANIŞMAN

Prof. Dr. Figen Esin KAYHAN

EŞ DANIŞMAN

Dr.Öğr. Üyesi Özer AKGÜL

İSTANBUL, 2021

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimime başladığım andan itibaren desteklerini esirgemeyen kıymetli bilgi, birikim ve tecrübeleri ile bana yol gösterici ve destek olan değerli danışman hocam Prof.Dr. Figen Esin KAYHAN'a en içten teşekkürlerimi sunuyorum.

Her konuda varlığını hissettiğim, hayatımın en önemli ve en değerli aşamalarında yanımda olan ve desteklerini hiç esirgemeyen çok değerli hocam Eş Danışmanım Dr.Öğr. Üyesi Özer AKGÜL'e gönülden teşekkür ediyorum.

Kıymetli fikirleri ve yol göstericiliği ile akademik hayatıma yön veren çok değerli hocam Prof.Dr. Muhsin KONUK'a en içten dileklerimle teşekkür ediyorum. Doktora çalışmalarımda desteklerini esirgemeyen ve fikirleri ile yardımcı olan kıymetli hocam Doç.Dr. N. Cenk SESAL'a gönülden teşekkürlerimi sunuyorum.

Laboratuvarı birlikte paylaştığım ve çalışmalarımda destek olan Uzman Biyolog Şeyma TARTAR KIZILKAYA'ya, Araş. Gör. Sena Kardelen DİNÇ'e, Biyolog Nazlı ÇAĞAN'a, Biyolog Serra IŞIK'a, Biyolog İbrahim Halil KILIÇKAYA'ya ve Öğr. Gör. Harika Eylül ESMER DURUEL'e çok teşekkür ediyorum. Tez çalışmalarım esnasında destek ve yardımlarını benden hiç esirgemeyen Dr. Nur KALUÇ'a çok teşekkür ediyorum.

Hayatım boyunca yaptığım her işte bana inanan, güvenen, tüm maddi ve manevi imkânlarını benim eğitimim için seferber eden, şartlar ne olursa olsun her an yanımda olan annem Nigar KARASAKAL ve babam Mehmet KARASAKAL'a sonsuz saygı, sevgi ve şükranlarımı sunuyorum.

Hayat arkadaşım, canım eşim Mahide BALABAN KARASAKAL'a bu uzun yolculukta bana hep destek olduğu için yürekten teşekkür ediyorum.

Bu çalışmada kullanılan etken maddeleri temin ettiğimiz Lundbeck ve Deva ilaç firmalarına teşekkürlerimi sunuyorum.

Bu tez Marmara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi (BAPKO) tarafından, FEN-C-DRP-120917-0540 numaralı proje ile desteklenmiştir, verilen destekten dolayı teşekkür ediyorum.

Ağustos, 2021 **Ömer Faruk KARASAKAL**

İÇİNDEKİLER SAYFA

TEŞEKKÜR ..... **i**
İÇİNDEKİLER ..... **ii**
ÖZET ..... **iv**
ABSTRACT ..... **vi**
YENİLİK BEYANI ..... **viii**
SEMBOLLER ..... **ix**
KISALTMALAR ..... **x**
ŞEKİL ..... **xii**
TABLO LİSTESİ ..... **xv**
1. GİRİŞ **1**
1.1. Antidepresanlar 3
1.2. Araştırmamızda Kullanılan Antidepresan Etken Maddeleri 4
1.2.1. Essitalopram 4
1.2.2. Amitriptilin 6
1.3. Zebra Balığını ‘nın (*Danio rerio*) Genel Özellikleri ve Avantajları 7
1.3.1. Karaciğer 8
1.3.2. Beyin 9
1.4. Oksidatif Stres 10
1.4.1. Antioksidan Savunma Mekanizması 14
1.4.1.1. Katalaz (CAT) 15
1.4.1.2. Asetilkolinesteraz (AChE) 16
1.4.1.3. Glutatyon (GSH) 16
1.4.1.4. Malondialdehid (MDA) 17
1.4.1.5. Total Protein (TP) 18
1.5. Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu 18
2. MATERYAL VE YÖNTEM **19**
2.1. Materyal 19
2.1.1. Kullanılan kimyasallar ve cihazlar 19
2.1.2. Zebra balığının biyolojisi ve sistematiği 20
2.2. Yöntem 22
2.2.1. Biyokimyasal Analizler 23
2.2.1.1. %10’luk doku homojenatı hazırlanması 23
2.2.1.2. Dokularda Bradford yöntemi ile protein tayini 23

2.2.1.3. Dokularda malondialdehid (MDA) tayini 25
2.2.1.4. Dokularda indirgenmiş glutatyon (GSH) tayini 26
2.2.1.5. Dokularda katalaz aktivitesi (CAT) tayini 27
2.2.1.6. Dokularda asetilkolinesteraz aktivitesi (AChE) tayini 28
2.2.2. *cat*, *gpx1a* ve *ache* genlerinin moleküler analizleri 29
2.2.2.1. RNA izolasyonu 29
2.2.2.2. cDNA sentezi ve primerler 31
2.2.2.3. qPCR 32
2.3. İstatistiksel Analizler 33
3. BULGULAR VE TARTIŞMA 34
3.1. Bulgular 34
3.1.1. Biyokimyasal Bulgular 34
3.1.1.1. Dokularda katalaz aktivitesi 37
3.1.1.2. Dokularda asetilkolinesteraz aktivitesi 40
3.1.1.3. Dokularda glutatyon seviyesi 42
3.1.1.4. Dokularda malondialdehid seviyesi 45
3.1.1.5. Dokularda total protein seviyesi 47
3.1.2. Moleküler Bulgular 51
3.2. Tartışma 58
4. SONUÇLAR 72
KAYNAKLAR 75
ÖZGEÇMİŞ 89

ÖZET

BAZI ANTİDEPRESAN İLAÇLARIN ZEBRA BALIĞI (*Danio rerio*)'NDAKİ OKSİDATİF STRES PARAMETRELERİNE OLAN ETKİLERİNİN BİYOKİMYASAL VE MOLEKÜLER YÖNTEMLER İLE DEĞERLENDİRİLMESİ

Antidepresanlar, beyinde yer alan kimyasal haberci moleküller olan nörotransmiterlerin dengesizliklerini düzenleyen ve depresif bozuklukların belirtilerini azaltmaya yardımcı olan ilaçlardır. Antidepresanların çeşitlerinden olan ve sık tercih edilen Seçici Serotonin Geri Alım İnhibitörleri (SSGİ) grubundan essitalopram (ESSI) ve Trisiklik Antidepresanlar (TSA) grubundan amitriptilin (AMI) etken maddeleri çalışmada tercih edilmiştir. Çeşitli ilaç gruplarının, organizmalardaki antioksidan savunma sistemi, oksidatif hasar ve lipid peroksidasyonu gibi süreçlere olan etkilerinin araştırıldığı model organizmalardan biri olan zebra balığı (*Danio rerio*) çalışmamızda kullanılmıştır. Seçilen etken maddelerin beyin ve karaciğer dokularındaki oksidatif stres parametrelerine olan etkilerinin biyokimyasal açıdan katalaz (CAT), glutatyon (GSH), asetilkolinesteraz (AChE), malondialdehid (MDA) ve total protein (TP) düzeylerinin araştırılması ayrıca moleküler olarak *cat*, *ache* ve *gpx1a* genlerinin mRNA ekspresyon seviyelerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu çalışmada 4 ve 30 günlük (subkronik) maruziyet sürelerine uygun şekilde essitalopram minimum (1,2 µg/L), amitriptilin minimum (1,2 µg/L), essitalopram maksimum (2,4 µg/L) ve amitriptilin maksimum (8,64 µg/L) dozları kontrol grubu dışında 8 gruba uygulanmıştır. İnsanlarda kullanılan minimum ve maksimum günlük dozları temel alınarak zebra balığına uygun dozlar hesaplanmıştır ve maruziyet süreleri de planlanarak uygulanmıştır. Essitalopram ve amitriptilin maksimum dozlarının subkronik olarak uygulanması sonrasında oksidatif stres parametrelerinin etkilediğini görülmüştür. Essitalopramın beyin dokusunda subkronik olarak maksimum dozda uygulanmasının CAT aktivitesinde azalmaya, MDA seviyesinde artışa ve ayrıca *cat*'ın mRNA ekspresyon seviyesinde de azalmaya sebep olduğunu göstermektedir. GSH, TP seviyeleri ve AChE aktivitesi artmıştır. Amitriptilinin subkronik olarak minimum ve maksimum doz uygulanmasından sonra beyin dokusunda MDA seviyesinde artış, CAT aktivitesinde de azalma belirlenmiştir. Aynı zamanda, *cat* 'ın mRNA ekspresyon seviyesi kontrol grubuna kıyasla azalmıştır. AChE aktivitesi ve TP seviyesi artmıştır. GSH

seviyesinde ise minimum amitriptilin dozunda artış, maksimum amitriptilin de ise azalma belirlenmiştir. Bu durumda oksidatif stres oluşumunun tetiklendiği değerlendirilmiştir. Amitriptilinin subkronik olarak maksimum dozunun uygulanması sonrasında karaciğer dokusunda oksidatif stres oluşumunun tetiklendiği değerlendirilmiştir.

Çalışmamızda essitalopram ve amitriptilin etken maddelerinin doz ve sürelerine bağlı olarak kullanımı sonrasında oksidatif stresin meydana gelebileceği belirlendi. Bu sebeple, bu etken maddeleri içeren ilaçların hekim kontrolü dışında kullanılmaması gerektiğini ve belirlenen doz ve sürelerine uyularak kullanılmasının unutulmaması gerektiği ön plana çıkmaktadır. Çalışmamızın yapılacak diğer çalışmalara ışık tutacağına inanıyoruz.

Ağustos, 2021 **Ömer Faruk KARASAKAL**

ABSTRACT

EVALUATION THE EFFECTS OF SOME ANTIDEPRESSANT DRUGS ON OXIDATIVE STRESS PARAMETERS WITH BIOCHEMICAL AND MOLECULAR METHODS IN ZEBRAFISH (*DANİO RERİO*)

Antidepressants are drugs that regulate the imbalances of neurotransmitters, which are chemical messenger molecules in the brain, and help reduce the symptoms of depressive disorders. The active ingredients of escitalopram (ESSI) from the Selective Serotonin Reuptake Inhibitors (SSRI) group and amitriptyline (AMI) from the Tricyclic Antidepressants (TSA) group, which are among the types of antidepressants and are frequently used, were preferred in the study. Zebrafish (*Danio rerio*), which is one of the model organisms in which the effects of various drug groups on processes such as antioxidant defense system, oxidative damage and lipid peroxidation are investigated, was used in our study. Investigation of the effects of selected active substances on oxidative stress parameters in brain and liver tissues biochemically catalase (CAT), glutathione (GSH), acetylcholinesterase (AChE), malondialdehyde (MDA) and total protein (TP) levels, as well as molecularly *cat*, *ache* and *gpx1a*, it was aimed to determine the mRNA expression levels of genes. In this study, escitalopram minimum (1.2 µg/L), amitriptyline minimum (1.2 µg/L), escitalopram maximum (2.4 µg/L) and amitriptyline maximum (8,64 µg/L) doses were applied to 8 groups and the control group in accordance with 4 and 30-day (subchronic) exposure times. Based on the minimum and maximum daily doses used in humans, suitable doses for zebrafish were calculated and the exposure times were planned and applied. It was observed that oxidative stress parameters were affected after subchronic administration of maximum doses of escitalopram and amitriptyline. Subchronic maximum dose administration of escitalopram in brain tissue has shown that it causes a decrease in CAT activity, an increase in MDA level and also decrease in mRNA expression level of *cat*. GSH, TP levels and AChE activity increased. After subchronic minimum and maximum dose administration of amitriptyline, an increase in MDA level and a decrease in CAT activity were determined in brain tissue. At the same time, mRNA expression level of *cat* was decreased compared to the control group. AChE activity and TP level increased. In the GSH level, an increase in the minimum dose of amitriptyline and a decrease in the maximum amitriptyline were

determined. In this case, it was evaluated that the formation of oxidative stress was triggered. It was evaluated that oxidative stress formation in liver tissue is triggered after subchronic administration of the maximum dose of amitriptyline.

In our study, it was determined that escitalopram and amitriptyline could induce oxidative stress after their use, depending on their dose and duration. For this reason, it comes to the fore that drugs containing the active substances should not be used outside of the control of a physician and that they should be used in accordance with the determined doses and durations. We believe that our study will shed light on other future studies.

August, 2021 **Ömer Faruk KARASAKAL**

YENİLİK BEYANI

BAZI ANTİDEPRESAN İLAÇLARIN ZEBRA BALIĞI (*Danio rerio*)'NDAKİ OKSİDATİF STRES PARAMETRELERİNE OLAN ETKİLERİNİN BİYOKİMYASAL VE MOLEKÜLER YÖNTEMLER İLE DEĞERLENDİRİLMESİ

Antidepresanlar sınıfına dâhil olan ilaçlar 1950'li yıllardan itibaren yoğun bir şekilde kullanılmaktadır. Sıklıkla kullanılan antidepresanların etki mekanizmalarına göre farklı sınıfları bulunmaktadır. Bu sınıflar içerisinde en sık kullanılanlar, seçici serotonin geri alım inhibitörlerinden olan essitalopram ve depresyon tedavisinin yanı sıra farklı hastalıklarda da reçetelendirilen trisiklik antidepresan sınıfından olan amitriptilin etken maddeleridir. Her iki antidepresan etken maddesi de farklı yolaklardan etkisini göstermektedir. Bu tez çalışmasında tedavi süreçlerinden bağımsız olarak bu etken maddelerinin farklı doz ve sürelerde belirlenen dokular özelinde oksidatif stres parametrelerine olan etkileri değerlendirilmiştir. Yapılan bu tez çalışmasında, iki farklı sınıfa ait antidepresan etken maddelerinin model bir organizma olan zebra balığının beyin ve karaciğer dokusunda oksidatif stres parametrelerinin analizleri ve biyokimyasal ölçümleri, mRNA ekspresyonu seviyeleri belirlenmiş ve bundan sonra yapılacak benzer araştırmalara kaynak sağlanmaya çalışılmıştır. Literatür taramalarında bazı antidepresan ilaçların etken maddelerine dair çalışmalar her ne kadar bulunsa da çoğunluğunun sadece biyokimyasal analizleri barındırdığı ve en önemlisi de *in vitro* olarak tamamlandığı görülmektedir. Bu çalışmada seçilen iki dokuda *in vivo* yöntemlerin kullanılması ile daha detaylı bir değerlendirme yapılmıştır.

Bu tezde, toksikolojik etki ve ilaç analizi detaylarının araştırıldığı çalışmalarda son dönemlerde sıklıkla tercih edilen zebra balığının (*Danio rerio*) biyoindikatör tür olma uygunluğu da test edilmiştir. Ek olarak, bu çalışmanın zebra balığı beyin ve karaciğer dokularında essitalopram ve amitriptilin antidepresan etken maddelerinin oksidatif stres parametreleri açısından literatürde detaylı bilgilendirme bulunmaması nedeniyle ulusal ve uluslararası literatüre katkı sağlayacağına inanmaktayız.

Ağustos, 2021 **Danışman: Prof. Dr. Figen Esin KAYHAN** **Ömer Faruk KARASAKAL**
Eş Danışman: Dr.Öğr. Üyesi Özer AKGÜL

SEMBOLLER

% : Yüzde

ºC : Santigrat Derece

µm : Mikrometre

µM : Mikromolar

Ca^{+2} : Kalsiyum

dH_2O : Distile su

EtBr : Etidyum Bromür

H_2O_2 : Hidrojen Peroksit

HCl : Hidroklorik Asit

K^+ : Potasyum

KCl : Potasyum Klorür

KDa : Kilodalton

KH_2PO_4 : Mono Potasyum Fosfat

Mg^{+2} : Magnezyum

$MgCl_2$: Magnezyum Klorür

mg : Miligram

mL : Mililitre

NaCl : Sodyum Klorür

NaH_2PO_4 : Monosodyum Fosfat

nm : Nanometre

NaOH : Sodyum Hidroksit

-OH : Hidroksil iyonu

$^1O_2$: Singlet Oksijen

O_2^- : Süperoksit radikali

pH : Hidrojenin Gücü

-SH : Tiyol grubu

KISALTMALAR

AChE : Asetilkolinesteraz Enzimi

ACTH : Adrenokortikotropik hormon

AB : Avrupa Birliği

AMI : Amitriptilin

ATP : Adenozin mono fosfat

BSA : Sığır Serum Albümin

CAT : Katalaz

Ct : Döngü eşiği

CoQ : Koenzim Q

DNA : Deoksiribonükleik Asit

DTNB : Ellman Reaktifi (5-5'- Ditiyobis-(2-Nitrobenzoik Asit))

ESSİ **:** Essitalopram

EDTA : Etilendiamin Tetraasetikasit

EU : Enzim Ünitesi

GABA : Butirik Asit

GSH : İndirgenmiş Glutatyon

GSSG : Okside Glutatyon

GSH-Px : Glutatyon Peroksidaz

GSH-Rd : Glutatyon Redüktaz

GST : Glutatyon-S-Transferaz

LPO : Lipid peroksidasyonu

MAO : Monoamin Oksidaz İnhibitörleri

MDA : Malondialdehit

mRNA : Mesajcı Ribonükleik Asit

MT : Metallotiyonein

NA : Noradrenalin

$NADP^+$: Nikotinamid Adenin Dinükleotit Fosfat

NaGİ : Nöradrenerjik Gerialım İnhibitörleri

NaSSa : Noradrenerjik ve Spesifik Serotonerjik Antidepresanlar

NDGİ : Noradrenalin-Dopamin Gerialım İnhibitörleri

NO : Nitrik oksit

OECD : Ekonomik İşbirliği ve Kalkınma Örgütü

PAGE : Poliakrilamid Jel Elektroforez

PCR : Polimeraz Zincir Reaksiyonu

RNA : Ribonükleik Asit

ROS : Reaktif Oksijen Türleri

SA : Serotonerjik antidepresanlar

SDS : Sodyum Dodesil Sülfat

SF : Serum Fizyolojik

SNGİ : Serotonin Noradrenalin Gerialım İnhibitörleri

SSGİ : Seçici Serotonin Geri Alım İnhibitörleri

SOD : Süperoksit Dismutaz

TBA : Tiyobarbitürik Asit

TCA : Trikloroasetik Asit

TNOS : Toplam Nitrik Oksit Sentaz

TP : Total Protein

TSA : Trisiklik Antidepresan

WHO : Dünya Sağlık Örgütü

2,4-D : 2,4 Diklorofenoksiasetik asit

5-HT : Serotonin

5-HİAA : 5-hidroksi indol asetik asit

ŞEKİL SAYFA

Şekil 1.1. Essitalopram kimyasal yapısı 5
Şekil 1.2. Amitriptilin kimyasal yapısı 6
Şekil 1.3. Zebra balığı (*Danio rerio*) 8
Şekil 1.4. Organizmada oksidatif stres oluşumu 10
Şekil 1.5. Serbest radikaller ve antioksidan savunma 11
Şekil 1.6. Serbest radikallerin lipidler, proteinler ve DNA gibi biyolojik moleküller üzerindeki etkisinin şematik gösterimi (Kumar ve ark., 2012) 12
Şekil 1.7. Katalaz reaksiyonu 15
Şekil 1.8. Glutatyonun Yapısı 17
Şekil 3.1. Essitalopram ve amitriptilin etken maddelerinin 4 ve 30 günlük uygulama sonrası zebra balığı beyin dokularında CAT aktivitesi [ESSI MIN; 1,2 µg/L, ESSI MAX; 2,4 µg/L, AMI MIN; 1,2 µg/L ve AMI MAX; 8,64 µg/L], (*: p<0,0; **: p<0,01; ***: p<0,001 kontrol ve maruziyetin gerçekleştiği grup arasında anlamlı farkı göstermektedir. #: p< 0,05; gruplar arasında anlamlı farkı göstermektedir; One-Way ANOVA)..... 37
Şekil 3.2. Essitalopram ve amitriptilin etken maddelerinin 4 ve 30 günlük uygulama sonrası zebra balığı karaciğer dokularında CAT aktivitesi, [ESSI MIN; 1,2 µg/L, ESSI MAX; 2,4 µg/L, AMI MIN; 1,2 µg/L ve AMI MAX; 8,64 µg/L], (*: p<0,05, **: p<0,01, ***: p<0,001 kontrol ve maruziyetin gerçekleştiği grup arasında anlamlı farkı göstermektedir. #: p< 0,05; gruplar arasında anlamlı farkı göstermektedir; One-Way ANOVA) 38
Şekil 3.3. Essitalopram ve amitriptilin etken maddelerinin 4 ve 30 günlük uygulama sonrası zebra balığı beyin dokularında AChE aktivitesi, [ESSI MIN; 1,2 µg/L, ESSI MAX; 2,4 µg/L, AMI MIN; 1,2 µg/L ve AMI MAX; 8,64 µg/L], (*: p<0,05, **: p<0,01, ***: p<0,001 kontrol ve maruziyetin gerçekleştiği grup arasında anlamlı farkı göstermektedir. #: p< 0,05; gruplar arasında anlamlı farkı göstermektedir; One-Way ANOVA) 40
Şekil 3.4. Essitalopram ve amitriptilin etken maddelerinin 4 ve 30 günlük uygulama sonrası zebra balığı karaciğer dokularında AChE aktivitesi, [ESSI MIN; 1,2 µg/L, ESSI MAX; 2,4 µg/L, AMI MIN; 1,2 µg/L ve AMI MAX; 8,64 µg/L], (*: p<0,05, **: p<0,01, ***: p<0,001 kontrol ve maruziyetin gerçekleştiği grup arasında anlamlı farkı

göstermektedir. #: p<0,05; gruplar arasında anlamlı farkı göstermektedir; One-Way ANOVA) 42
Şekil 3.5. Essitalopram ve amitriptilin etken maddelerinin 4 ve 30 günlük uygulama sonrası zebra balığı beyin dokularında GSH seviyesi, [ESSI MIN; 1,2 µg/L, ESSI MAX; 2,4 µg/L, AMI MIN; 1,2 µg/L ve AMI MAX; 8,64 µg/L], (*: p<0,05; **: p<0,01; kontrol ve maruziyetin gerçekleştiği grup arasında anlamlı farkı göstermektedir. #: p< 0,05; gruplar arasında anlamlı farkı göstermektedir; One-Way ANOVA) 43
Şekil 3.6. Essitalopram ve amitriptilin etken maddelerinin 4 ve 30 günlük uygulama sonrası zebra balığı karaciğer dokularında GSH seviyesi, [ESSI MIN; 1,2 µg/L, ESSI MAX; 2,4 µg/L, AMI MIN; 1,2 µg/L ve AMI MAX; 8,64 µg/L], (*: p<0,05; **: p<0,01; maruziyetin gerçekleştiği grup arasında anlamlı farkı göstermektedir. #: p< 0,05; gruplar arasında anlamlı farkı göstermektedir; One-Way ANOVA)..... 44
Şekil 3.7. Essitalopram ve amitriptilin etken maddelerinin 4 ve 30 günlük uygulama sonrası zebra balığı beyin dokularında MDA seviyesi, [ESSI MIN; 1,2 µg/L, ESSI MAX; 2,4 µg/L, AMI MIN; 1,2 µg/L ve AMI MAX; 8,64 µg/L], (*: p<0,05; ***: p<0,001; kontrol ve maruziyetin gerçekleştiği grup arasında anlamlı farkı göstermektedir. #: p< 0,05; gruplar arasında anlamlı farkı göstermektedir; One-Way ANOVA) 46
Şekil 3.8. Essitalopram ve amitriptilin etken maddelerinin 4 ve 30 günlük uygulama sonrası zebra balığı karaciğer dokularında MDA seviyesi, [ESSI MIN; 1,2 µg/L, ESSI MAX; 2,4 µg/L, AMI MIN; 1,2 µg/L ve AMI MAX; 8,64 µg/L], (*: p<0,05; **: p<0,01; ***: p<0,001; kontrol ve maruziyetin gerçekleştiği grup arasında anlamlı farkı göstermektedir. #: p< 0,05; gruplar arasında anlamlı farkı göstermektedir; One-Way ANOVA) 47
Şekil 3.9. Essitalopram ve amitriptilin etken maddelerinin 4 ve 30 günlük uygulama sonrası zebra balığı beyin dokularında TP seviyesi, [ESSI MIN; 1,2 µg/L, ESSI MAX; 2,4 µg/L, AMI MIN; 1,2 µg/L ve AMI MAX; 8,64 µg/L], (*: p<0,05, ***: p<0,001 kontrol ve maruziyetin gerçekleştiği grup arasında anlamlı farkı göstermektedir. #: p< 0,05; gruplar arasında anlamlı farkı göstermektedir; One-Way ANOVA) 48
Şekil 3.10. Essitalopram ve amitriptilin etken maddelerinin 4 ve 30 günlük uygulama sonrası zebra balığı karaciğer dokularında TP seviyesi, [ESSI MIN; 1,2 µg/L, ESSI MAX; 2,4 µg/L, AMI MIN; 1,2 µg/L ve AMI MAX; 8,64 µg/L], (*: p<0,05; ***: p<0,001; kontrol ve maruziyetin gerçekleştiği grup arasında anlamlı farkı göstermektedir. #: p<

0,05; gruplar arasında anlamlı farkı göstermektedir; One-Way ANOVA) 49
Şekil 3.11. *cat*'ın beyin dokusundan $2^{-\Delta\Delta CT}$ formülü ile elde edilen verilerinin grafiği [ESSI MIN; 1,2 µg/L, ESSI MAX; 2,4 µg/L, AMI MIN; 1,2 µg/L ve AMI MAX; 8,64 µg/L] 53
Şekil 3.12. *ache*'nin beyin dokusundan $2^{-\Delta\Delta CT}$ formülü ile elde edilen verilerinin grafiği [ESSI MIN; 1,2 µg/L, ESSI MAX; 2,4 µg/L, AMI MIN; 1,2 µg/L ve AMI MAX; 8,64 µg/L] 54
Şekil 3.13. *gpx1a*'nın beyin dokusundan $2^{-\Delta\Delta CT}$ formülü ile elde edilen verilerinin grafiği [ESSI MIN; 1,2 µg/L, ESSI MAX; 2,4 µg/L, AMI MIN; 1,2 µg/L ve AMI MAX; 8,64 µg/L] 54
Şekil 3.14. *cat*'ın karaciğer dokusundan $2^{-\Delta\Delta CT}$ formülü ile elde edilen verilerinin grafiği [ESSI MIN; 1,2 µg/L, ESSI MAX; 2,4 µg/L, AMI MIN; 1,2 µg/L ve AMI MAX; 8,64 µg/L] 56
Şekil 3.15. *ache*'nin karaciğer dokusundan $2^{-\Delta\Delta CT}$ formülü ile elde edilen verilerinin grafiği [ESSI MIN; 1,2 µg/L, ESSI MAX; 2,4 µg/L, AMI MIN; 1,2 µg/L ve AMI MAX; 8,64 µg/L] 57
Şekil 3.16. *gpx1a*'nın karaciğer dokusundan $2^{-\Delta\Delta CT}$ formülü ile elde edilen verilerinin grafiği [ESSI MIN; 1,2 µg/L, ESSI MAX; 2,4 µg/L, AMI MIN; 1,2 µg/L ve AMI MAX; 8,64 µg/L] (*: $p<0,05$; kontrol ve maruziyetin gerçekleştiği grup arasında anlamlı farkı göstermektedir.) 58

TABLO LİSTESİ SAYFA

Tablo 1.1. Bazı antidepresanların nörotransmiter etkileri açısından sınıflandırılması 4
Tablo 1.2. Enzimatik ve Enzimatik olmayan antioksidanlara bazı örnekler 15
Tablo 2.1. Kullanılan bazı kimyasal maddelerin isimleri ve markaları 19
Tablo 2.2. Kullanılan bazı cihazlar ve markaları 20
Tablo 2.3. Zebra balığı (*Danio rerio*) sistematiği 21
Tablo 2.4. Deney grupları ve uygulanan dozlar/süreler 23
Tablo 2.5. Bradford yöntemi ile protein tayininin dokularda yapılışı 24
Tablo 2.6. Dokularda MDA tayininin yapılışı 25
Tablo 2.7. Dokularda indirgenmiş glutatyon (GSH) tayininin yapılışı 26
Tablo 2.8. Dokularda katalaz tayininin yapılışı 28
Tablo 2.9. Dokularda Asetilkolinesteraz ölçümü 29
Tablo 2.10. cDNA ve reaksiyon koşulları 31
Tablo 2.11. Çalışmada kullanılan genlerin primer dizileri 32
Tablo 2.12. qPCR reaksiyon koşulları ve termal koşullar 33
Tablo 3.1. Essitalopram ve amitriptilin etken maddelerinin 4 ve 30 günlük uygulama sonrası zebra balığı beyin dokularında CAT, AChE, GSH, MDA ve TP düzeyleri (*: p<0,05, **: p<0,01, ***: p<0,001 kontrol ve maruziyetin gerçekleştiği grup arasında anlamlı farkı göstermektedir.) 35
Tablo 3.2. Essitalopram ve amitriptilin etken maddelerinin 4 ve 30 günlük uygulama sonrası zebra balığı karaciğer dokularında CAT, AChE, GSH, MDA ve TP düzeyleri (*: p<0,0; **: p<0,01; ***: p<0,001 kontrol ve maruziyetin gerçekleştiği grup arasında anlamlı farkı göstermektedir.) 36
Tablo 3.3. 4. ve 30. Gün sonunda *cat, ache* ve *gpx1a* 'nın zebra balığının beyin dokularında mRNA ekspresyon seviyeleri 52
Tablo 3.4. 4. ve 30. Gün sonunda *cat, ache* ve *gpx1a* 'nın zebra balığının karaciğer dokularında mRNA ekspresyon seviyeleri (*: p<0,05; kontrol ve maruziyetin gerçekleştiği grup arasında anlamlı farkı göstermektedir.) 55

1. GİRİŞ

Günümüzde bireysel ve toplumsal veriler incelendiğinde depresyon yaygınlığının, psikiyatrik bir bozukluğun haricinde çok önemli bir halk sağlığı problemi haline geldiği görülmektedir. Dünya Sağlık Örgütü (WHO) açıklamalarına göre depresyon, psikiyatrik hastalıklar arasında sık görülmesine ek olarak, tedavi edilmediğinde intihar olasılığı taşıyan ve yaşam kalitesini önemli derecede etkileyen ruhsal bir bozukluktur (Bülbül ve ark., 2013, James ve ark., 2018). Depresif duygular, sağlıklı insanlarda istenmeyen ya da hayal kırıklığına neden olan hayatın getirdiği durumlar karşısında ortaya çıkan üzüntü, sıkıntı ve keder gibi duygusal tepkiler olarak, hayatın normal bir parçası şeklinde kabul edilebilmektedir. Birçok insanın kendi kişiliğine ve başa çıkma tarzına bağlı olarak umutsuzluk, çaresizlik dönemleri geçirmekte olduğu bilinmekte ve bunlar doğal kabul edilmektedir. Klinik depresyon ise bunlardan süre ve şiddet yönünden ayrılmaktadır. Klinikte ruhsal bir rahatsızlık olarak kabul gören depresif bozukluk, duygusal bir tepkiden çok daha şiddetli ve kişinin hayatını olumsuz yönde etkileyen, hatta onun tüm yaşamsal süreçlerini bozan belirli semptom kümelerinden meydana gelen bir sendromdur (Işık ve ark., 2013). Biyolojik açıdan depresyon araştırıldığında serotonin (5-HT), asetilkolin, noradrenalin (NA), dopamin ve gama amino butirik asit (GABA) gibi nörotransmiterlerin oldukça önemli olduğu tespit edilmiştir (Janowsky ve ark 1972; Van Praag ve ark., 1987; Vaswani ve ark., 2003). Bu nörotransmiterlerin arasında serotonin kardiyovasküler sistem, santral sinir sistemi ve gastrointestinal sistemde aktif bir görev almaktadır. Serotonerjik nöronların çoğunluğunun yerleştiği kısım olan Raphe çekirdeğinden çıkan serotoninerjik lifler talamusa, hipotalamusa, limbik sisteme, striatuma, serebral kortekse ve serebelluma bağlanmalar yapmaktadır. Serotonerjik nöronların uçlarında oluşan serotonin, adenozin monofosfat (ATP) ve diğer substratlarla birlikte veziküllerde depo edilmektedir. Bu veziküller içerisinde serotonin uygun iletinin gelmesi ile birlikte sinaptik boşluğa salınır ve serotonin taşıyıcısı olarak isimlendirilen bir presnaptik taşıyıcı pompası aracılığıyla serotoninerjik nörona geri absorbe edilir. Veziküllerden sitoplazmaya geçen veya geri alınan serotonin, NA ve dopaminin parçalanmasından da sorumlu olan monoaminooksidaz (MAO) enzimiyle katabolize edilerek 5-hidroksi indol asetik asite (5-HİAA) çevrilmektedir. Sinaps boşluğundaki serotoninin etkisi hücre içerisine geri alınmasıyla sonlanmaktadır (Velazquez-Moctezuma ve ark., 1990;

Mohammad-Zadeh ve ark., 2008). Bu nörotransmiterler arasında asetilkolin beyin dokusunda eksitatör olarak etki göstermenin yanında uyarılan beyin bölgelerinin özelliklerine bağlı şekilde davranış inhibisyonuna ve dolayısı ile depresif etkileri meydana getirmektedir. Serotonin maddesi ise, ilk olarak 1948 yılında Page tarafından kandan izole edildikten sonra santral sinir sisteminde tespit edilen ve triptofandan sentezlenen monoamin bir nörotransmitterdir (Emanuelsson ve ark., 1987) .

Klinik depresyonun tedavisi amacıyla günümüzde; psikodinamik psikoterapi, bilişsel davranışçı terapi ve kişiler arası psikoterapi gibi psikoterapötik tedaviler, antidepresan ilaçlar ve elektrokonvülsif tedavi yoğun olarak kullanılan yöntemlerdendir. Ayrıca, antidepresan ilaçlar depresif epizod içeren çok sayıda psikiyatrik bozuklukta da kullanılmaktadır. İlaç sektörünün araştırmaları ve bağımsız çalışmalar aracılığıyla etkinlikleri test edilerek kanıtlanan çok sayıda ilaç 1950'lerden itibaren antidepresan olarak yaygın bir şekilde güvenle kullanılmaktadır (Çetin 2008).

Oksidatif stres, antioksidan seviye ve serbest radikal oluşumu arasında bulunan dengenin serbest radikal lehine sonuçlanmasıyla meydana gelmektedir (Mishra ve ark., 2017). Antioksidan savunma sistemleri organizmayı reaktif oksijen türlerinin hasar verici etkilerinden korumaya çalışmaktadırlar. Enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidan savunma sistemleri olmak üzere bu sistemler ikiye ayrılmaktadır. Enzimatik antioksidanlar superoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), glutatyon peroksidaz (GSH-Px) ve glutatyon reduktaz (GR), enzimatik olmayanlar ise glutatyon (GSH), vitamin C,E, provitamin A, koenzim Q, çinko ve selenyum gibi antioksidanlardır. (Kodydková ve ark., 2009). Son yıllarda çalışmalar göstermektedir ki oksidatif stres, serbest radikallerin oluşumu ile nöronlara zarar vererek nöropsikiyatrik ve nörodejeneratif hastalıkların meydana gelmesine olanak sağlamaktadır. Antioksidan sistemler ise nöronları bu olumsuz durumdan korumak amacıyla görev almaktadır (Nikam ve ark., 2009). Antioksidan savunma sisteminin önemi sebebiyle tedavi amacıyla kullanılan antidepresan ilaçların antioksidan dengeyi bozmaması oldukça önemlidir (Kalichak ve ark., 2016; Stoyek ve ark., 2017). Serbest radikallerin artmasıyla görülen oksidatif stres durumunda genetik materyal, proteinler, hücresel yapılar ve lipitler büyük hasara uğrayarak hücresel ölüm durumları meydana gelmektedir. Serbest radikallerin üretimi sonucunda oluşan lipid peroksidasyonu meydana gelen bu hasarların belirlenmesinde en iyi bilinen yollardan birisidir. Malondialdehit (MDA), lipid peroksidasyonunda ortaya çıkan bir yan

üründür ve doku hasarında biyobelirteç olarak kullanılmaktadır (Ding ve ark., 2017).

Antidepresan ilaçların beyin ve karaciğer dokularındaki oksidatif stres parametrelerine etkileri konusunda model organizmalar üzerinde yapılan az sayıda çalışma bulunmaktadır. Bu nedenle araştırmamızda sık tercih edilen "Seçici Serotonin Geri Alım İnhibitörleri" (SSGİ) grubundan essitalopram ve "Trisiklik Antidepresanlar" (TSA) grubundan amitriptilin etken maddelerinin insanlarda kullanılan günlük doz miktarları temel alınarak zebra balığına (*Danio rerio*) uygulanan dozların, beyin ve karaciğer dokularındaki oksidatif stres parametrelerine olan etkilerinin biyokimyasal açıdan katalaz (CAT), glutatyon (GSH), asetilkolinesteraz (AChE), malondialdehit (MDA) ve total protein (TP) düzeylerinin araştırılmasını ayrıca aynı dokularda moleküler olarak *cat*, *gpx1a* ve *ache* genlerinin mRNA ekspresyon seviyelerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

1.1. Antidepresanlar

Beyinde yer alan kimyasal haberci moleküller olan nörotransmiterlerin dengesizliklerini düzenleyen ve depresif bozuklukların belirtilerini azaltmaya yardımcı olan ilaçlara "antidepresanlar" denilmektedir. Kişinin duygu durum ve davranışı ile ilgili değişiklikler kimyasal açıdan nörotransmiterlerin dengesizliği ile ilişkilidir. Nörotransmiter maddeler, nöronlar arasında özelleşmiş bağlantı bölgeleri olarak tanımlanan sinaptik boşluklarda nöronlar arası iletişimi sağlayan kimyasallardır. Bu nörotransmiterler nöronlardaki keseciklerde bulunmaktadırlar. Serotonin, dopamin ve noradrenalin/norepinefrin birer nörotransmiter örneğidir. Antidepresanlar etki mekanizmalarının temelinde, seçici reseptörler ile nörotransmiterlerin geri alımını bloklayarak ya da belirli oranda inhibe ederek sinaps bölgelerinde nörotransmiter miktarını yükseltirler. Antidepresan ilaçlar etki mekanizmalarına göre Tablo 1.1.'de gösterildiği gibi sınıflandırılmaktadır. (Yüzbaşıoğlu ve ark., 2016; Valıpour, 2019)

Tablo 1.1. Bazı antidepresanların nörotransmiter etkileri açısından sınıflandırılması

Genel Grupları	Örnekleri	Etki Mekanizması
MAO	İzokarboksazid, Fenelzin, Tranilsipromin	Monoamin oksidaz enzimini inhibe ederek hastalığın normale dönüşünü sağlamaktadır.
TSA	Amitriptilin, Amoksapin Desipramin	Monoamin taşıyıcılarını bloke edip, sinaps boşluğunda monoamin ile ilgili nörotransmiterlerin kontsantrasyonunu arttırak depresyonun iyileşmesine imkân sağlarlar.
SSGİ	Fluoksetin, Paroksetin Sertralin, Essitalopram	Serotonin maddesinin geri alımını bloke ederek fonksiyon göstermektedirler.
SNGİ	Venlafaksin, Milnacipran Duloksetin	Serotonin ve norepinefrinin geri alımını iki yönlü ve seçici şekilde inhibe ederler ve bu şekilde etki göstermektedirler.
NDGİ	Bupropion	Dopamin ve norepinefrinin sinaptik boşluktan geri alımına engel oluşturarak fonksiyon yapmaktadırlar.
NaGİ	Reboksetin, Maprotilin	Sinaptik boşluktaki noradrenalin geri emilimini çok güçlü şekilde inhibe ederken, serotonin geri alımı açısından ise daha düşük etkiye sahiptir.
NaSSA	Mirtazapin, Mianserin	Monoaminleri veya monoamin geri alım pompalarında inhibisyon oluşturmadan serotonin ve noradrenalin seviyelerini yükselterek etki göstermektedirler.
SA	Trazadon, Nefazadon, Tianeptin	Hem serotonin reseptörlerini hem de serotonin geri alımını inhibe ederek etki göstermektedirler.

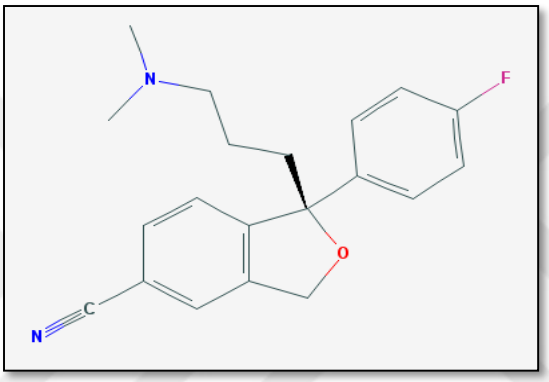
(MAO: Monoamin Oksidaz İnhibitörleri, TSA: Trisiklik Antidepresanlar, SSGİ: Seçici Serotonin Geri Alım İnhibitörleri, SNGİ: Serotonin Noradrenalin Gerialım İnhibitörleri, NDGİ: Noradrenalin-Dopamin Gerialım İnhibitörleri, NaGİ: Nöradrenerjik Gerialım İnhibitörleri, NaSSA: Noradrenerjik ve spesifik serotonerjik antidepresanlar, SA: Serotonerjik antidepresanlar)

1.2. Araştırmamızda Kullanılan Antidepresan Etken Maddeleri

1.2.1. Essitalopram

SSGİ sınıfında bulunan antidepresanlar fluoksetin, sertralin, paroksetin, sitalopram, essitalopram ve fluvoksamindir. Bu gruba ait antidepresanlar bir dizi ruhsal bozukluğun tedavisinde kritik öneme sahip olan serotonerjik antidepresanlar olarak bilinmektedir. SSGİ grubu antidepresanların etki mekanizmalarının temelinde serotonin gerialım pompasını inhibe ederek sinaps boşluğunda serotonin maddesinin arttırılması prensibi yer almaktadır. SSGİ'lerin akut etkileri incelendiğinde, serotonin nöronunda geri

alımı blokaja uğratması sonucunda somatodentritik bölgede ani şekilde serotonin 5-hydroxytryptamine (5-HT) yükselişi meydana geldiği görülmektedir. Sinaps boşluğunda artış gösteren serotonin (5-HT) konsantrasyonu kronik alımların devam etmesi ile birlikte postsinaptik reseptörlerin (5HT1A) miktarında ve duyarlılığında "down-regülasyon" oluşumuna neden olmaktadır ve sonucunda seroterjik iletinin arttırıldığı gözlenmektedir. SSGİ sınıfında yer alan antidepresanlar diğer üyelere göre yan etkilerinin daha az olması, plazma konsantrasyonlarında artış olsa dahi yaşam için tehlike oluşturmamaları ve kullanım kolaylığı gibi özellikleri sebebiyle tedavi sürecinde oldukça önemlidir (Frazer, 2000, Lucki ve O'Leary 2004, Stahl, 2012)



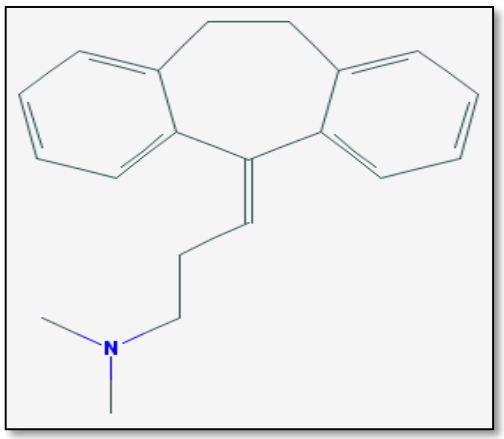
Şekil 1.1. Essitalopram kimyasal yapısı

Ticari olarak sıklıkla tercih edilen antidepresanlardan birisi olan Cipralex® Seçici Serotonin Geri Alım İnhibitörleri (SSGİ) grubuna dahil bir ilaç olarak essitalopram etken maddesine sahiptir (Işık ve Candansayar, 1993). Essitalopramın kimyasal yapısı Şekil 1.1' de gösterilmiştir (https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/146570) (22.06.2021). Diğerleri kadar etkili ve aynı zamanda daha güvenli olan SSGİ sınıfına dahil olan antidepresanlar depresyonu da kapsayan panik atak, obsesif bozukluk gibi bir çok psikiyatrik hastalığın tedavi edilmesinde tercih edilen ilaçlardır (Draz ve ark., 2009). SSGİ sınıfına dâhil olan antidepresanlar merkezi sinir sistemimizde nöronlar arasında bulunan sinaps aralığına sekrete edilen serotoninin perisinaptik bölgeye geri alımını inhibe ederek etki göstermektedirler. Normal koşullarda serotonin maddesinin beyindeki davranışını incelediğimizde, mesajın gönderilmesi ile birlikte serotonin sinaptik bölgeye salınır ve sinyalin gönderildiği reseptörlere bağlanır. Sinaptik bölgede kullanılmayan serotonin ise tekrar aynı hücre aracılığıyla geri alımı gerçekleştirilir. SSGİ sınıfı ilaçlar sinaptik boşlukta fazladan serotoninin geri alımını sağlayan kanalları bloke ederek geri

alımını engeller ve böylece sinaptik boşluk serotonin miktarında artışa neden olurlar. (Tarhan, 2006; Tok, 2015; Yüzbaşıoğlu ve ark., 2016).

1.2.2. Amitriptilin

Trisiklik antidepresanlar (TSA), 1940'lı yıllardan itibaren depresyon tedavisinde kullanılan yapılarında 3 halka içeren (iki benzen ve bir heterosiklik halka) bileşiklerdir. Bu grup ilaçların antidepresan etki mekanizmalarına ek olarak analjezik özelliklerinin de bulunduğu klinik ve deneysel olarak bazı araştırmalarda belirlenmiştir (McQuay ve ark., 1996; Lynch, 2001). Trisiklik antidepresanların kullanıldığı süreçler incelendiğinde ağrı sendromlarında ve ağrının yanında devam eden birçok hastalıkta özellikle nöropatik ağrıların bulunduğu durumlarda (Örn. diyabetik nöropati ve postherpetik nevralji vb.) sahip olduğu analjezik etki nedeniyle yaygın olarak kullanılmaktadır (Galer, 1995). Bununla birlikte, gerilim tipi baş ağrılarında, migren, fibromiyalji, kanser ve romatoid artrit gibi bazı hastalıklarda diğer ilaçlarla kombine olarak kullanımı görülmekte ve tedavi sürecinde hastaların etkin sonuçlar aldığı gözlenmektedir. (Arnold ve ark., 2000; Weber, 2001). TSA'ların toksisiteleri genellikle aşırı doz alımına bağlı olarak kardiyovasküler, otonom ve santral sinir sistemi (SSS) üzerine etki göstermektedir. (Watson ve ark., 2005; Bora, 2017). TSA ilaçlarının terapötik etkileri norepinefrin ve serotonin benzeri aminlerin geri alım inhibisyonu ve postsinaptik serotonin reseptör antagonizması yolu ile gerçekleşmektedir.



Şekil 1.2. Amitriptilin kimyasal yapısı

Trisiklik antidepresanlar içerisinde sık tercih edilen ilaçlardan birisinin amitriptilin olduğu bilinmektedir. Amitriptilinin kimyasal yapısı Şekil 1.2'de gösterilmiştir (https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/2160) (22.06.2021). Antidepresanlar üzerine yapılan araştırmaların sonuçlarına göre depresyon tedavisinde SSGİ'ler kadar etkinlik gösterdiği bildirilmiştir (Barbui ve Hotopf, 2001). TSA grubu üyesi olan amitriptilin depresyon tedavisinde tercih edilmesinin yanı sıra migren, nöropatik ağrı, postherpetik nevralji, gerilim tipi baş ağrısı, fibromiyalji gibi problemlerin çözümünde de analjezik özelliklerinden dolayı kullanılmaktadır (Arimochi ve Morita, 2006; Ezra ve ark., 2012; Güneş ve ark., 2013; Carod-Artal, 2014, Farghaly ve ark., 2014; Dalkılıç ve ark., 2018). Etki mekanizması incelendiğinde santral sinir sisteminde adrenerjik ve serotonerjik sinapslarda, noradrenalin ve serotonin maddelerinin geri alımını baskıladığı ve serotonin geri alımının noradrenaline kıyas ile daha kuvvetli bir şekilde inhibe edildiği görülmektedir. Dopamin geri alımı üzerine etkisi ise serotoninden çok daha zayıf bir şekilde olduğu bilinmektedir (Tatsumi ve ark., 1997). Ağız yoluyla vücuda alındıktan 6 saat sonra plazmada en yüksek konsantrasyona ulaşan amitriptilin, sindirim sistemi kanalında emilimi oldukça yüksek olan bir antidepresandır. Yarılanma ömrü 9-25 saat olup karaciğerde ilk geçişte sitokrom P450 aracılığıyla demetilasyona maruz kalan amitriptilin, birincil aktif ürünü olan nortriptiline dönüşmektedir. Nortriptilin, noradrenalin geri alımı üzerinde daha kuvvetli bir etkiye sahiptir. Hem amitriptilin hem de nortriptilin büyük ölçüde plazma proteinleriyle bağ yapabilmektedirler. Amitriptilin karaciğerde elimine olduktan sonra oluşan metabolitleri ile birlikte serbest veya konjuge formlarda idrar yolu ile vücuttan uzaklaştırılmaktadır (Kayaalp, 2012). Uyku bozukluğu, baş dönmesi, kalp ritim bozukluğu, tansiyon düşüklüğü, ağız kuruluğu, kabızlık, cinsel dürtülerde düşüklük ve ışığa karşı duyarlılık durumları amitriptilin kullanımında meydana gelebilecek belirli yan etkiler arasında gösterilmektedir (Barbui ve Hotopf, 2001).

1.3. Zebra Balığını 'nın (*Danio rerio*) Genel Özellikleri ve Avantajları

Cyprinidae familyasına ait Zebra balığı (*Danio rerio*) (Hamilton-Buchanan, 1882) 1930'lu yıllardan itibaren çok sayıda insan ve diğer omurgalıların hastalıklarının araştırılmasında insanlar ile yüksek homoloji göstermesi sebebi ile tercih edilen bir model organizmadır. Zebra balığı (*Danio rerio*), kardiyoloji, nöroloji ve çevresel toksikoloji dâhil olmak üzere çeşitli tıbbi ve bilimsel disiplinlerde model organizma olarak sıklıkla

kullanılmaktadır. Çeşitli ilaç gruplarının, organizmalardaki antioksidan savunma sistemi, oksidatif hasar ve lipid peroksidasyonu gibi süreçlere olan etkilerinin araştırıldığı deneysel çalışmalarda kullanılan model organizmaların başında gelmektedir. Zebra balığı (*Danio rerio*), Güneydoğu Asya ve yoğun şekilde Pakistan ve Hindistan'a özgü yayılış gösteren tropikal bir omurgalı tatlı su balığı türüdür (Keller ve Keller, 2018; Meyers, 2018). Şekil 1.3' de gösterilmiştir (Avdesh ve ark., 2012).

Yapılacak çalışmalarda model organizma olarak zebra balığının (*Danio rerio*) seçilmesinde önemli avantajlar bulunmaktadır. Morfolojik olarak erkek ve dişi bireyler arasındaki farklılıkların belirgin şekilde ayırt edilebilir olması, insan ve diğer omurgalıların genom yapılarında homojenlik oranın yüksek olması, insan ve diğer omurgalılar ile metabolizma reaksiyonlarının büyük ölçüde benzer olması, bakımının kolay ve vücutlarının şeffaf olması, optimum şartlar yerine getirildiğinde kolaylıkla üretiminin yapılabilmesi ve aynı zamanda insanlara uygulanması sakıncalı dozların araştırılması, insanlardan elde edilemeyecek doku/organların kullanılması gibi avantajları nedeniyle kapsamlı çalışmaların yapılmasında tercih edilmektedir. (Atasayar, 2011; Howe ve ark., 2013; Özdemir, 2016)



Şekil 1.3. Zebra balığı (*Danio rerio*)

1.3.1. Karaciğer

Karaciğer organizmada anabolizma ve katabolizma reaksiyonlarının gerçekleştiği bir organdır. Stres durumlarında değişiklik gösteren karaciğer önemli bir biyobelirteç olarak detoksifikasyon işlemlerinin merkezi olarak bilinmektedir. Üç loptan oluşmaktadır. Memeli karaciğerine benzer bir özellik göstermektedir. Özellikle teleostların karaciğeri vücudun metabolik homeostazında kilit bir rol üstlenmektedir (Ferguson, 1989). Hepatositler ve bağ dokusundan oluşan karaciğer aynı zamanda safra sentezi, proteinlerin, karbonhidratların ve yağların metabolizmasının regülasyonunda,

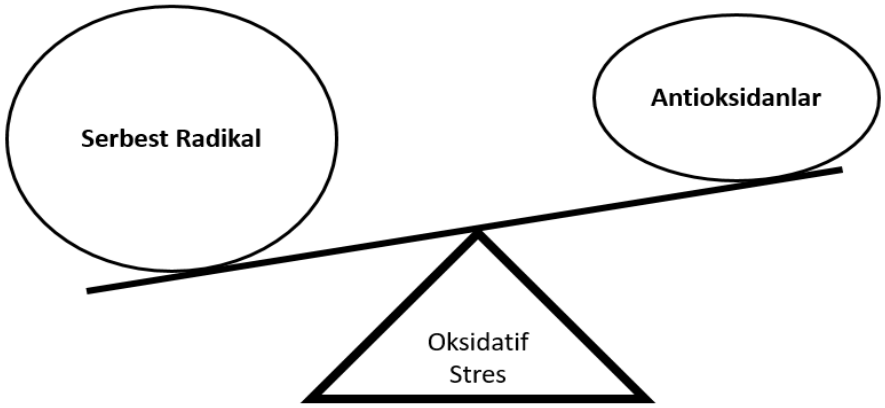
plazma proteinlerinin sentezinde (albümin, globülin ve fibrinojen) ve azotlu atıkların uzaklaştırılması gibi görevlere sahiptir (Hınton ve Couch, 1984; Bruslé ve Anadon, 1996) Zebra balıklarının karaciğerinin memelilerden farklı olan özelliği, hepatositlerin kord veya lobüllerle net bir şekilde organizasyon sağlamaması ve tipik protal triadların belirginlik göstermemesi açısından farklıdır. Ayrıca zebra balığının karaciğerinde Kuppfer hücreleri de bulunmamaktadır. Aynı zamanda ergin zebra balıklarının erkek ve dişi karaciğerleri arasında net bir ayrım gözlenmektedir. Dişi karaciğerlerinde yer alan hepatositler, vitellogenin üretimini nedeniyle daha fazla bazofilik özellik göstermektedir (Van der Ven ve ark., 2003).

1.3.2. Beyin

Nörokraniyumun boşluğunda yer alan beyin omuriliğin devamı olarak kemik ve kıkırdak dokular ile korunan merkezi bir organdır. Sucul canlılar arasında beyin dokusunun büyüklüklerinin farklı olduğu bilinmektedir. Beyin dokusunun anatomisi incelendiğinde ilk olarak önden arkaya sırasıyla prozensefalon, mezensefalon ve rombensefalon olarak belirlenmiştir. Prozensefalonun ön bölgesi farklılaşarak telensefalonu oluşturmuştur. Arka bölgesi ise diyensefalonu meydana getirmiştir. Rombensefalon kısmının ön tarafı metensefalonu oluştururken arka tarafı ise miyelensefalon ve medulla oblangata kısımlarını oluşturmaktadır. Beyin bölgelerinin her birinin önemli görevleri bulunmaktadır. Koku uyartılarını alma, değerlendirme, öğrenme ve üreme ile ilişkili kısımların yer aldığı kısım telensefalondur. Hipotalamus ve talamus gibi beyin bölgelerinin bulunduğu yer diyensefalondur. Görme işlemlerinin gerçekleştiği bölge iyi gelişme gösteren mezensafalondur. Metensefalon, beyinciğin geliştiği kısımdır. Beyincik (serebellum) özellikle hareket, duruş-denge koordinasyonlarının sağlanması ve kas tonusu gibi işlevlere sahiptir. Miyelensefalon ise kan damarları içererek beyni saran kısımdır. Medulla oblangata omurilik soğanı diye isimlendirilen beynin ön bölgedeki merkezleri ile omurilik arasında köprü vazifesi gören ve bilgi aktarımının gerçekleşmesini sağlayan özel bir bölgedir. Bilgi aktarımı neticesinde solunum, osmoregülasyon, yüzgeç kontrolü ve renklenme gibi özellikler bulunmaktadır. (Ekingen, 2001; Wulliman ve ark., 2012)

1.4. Oksidatif Stres

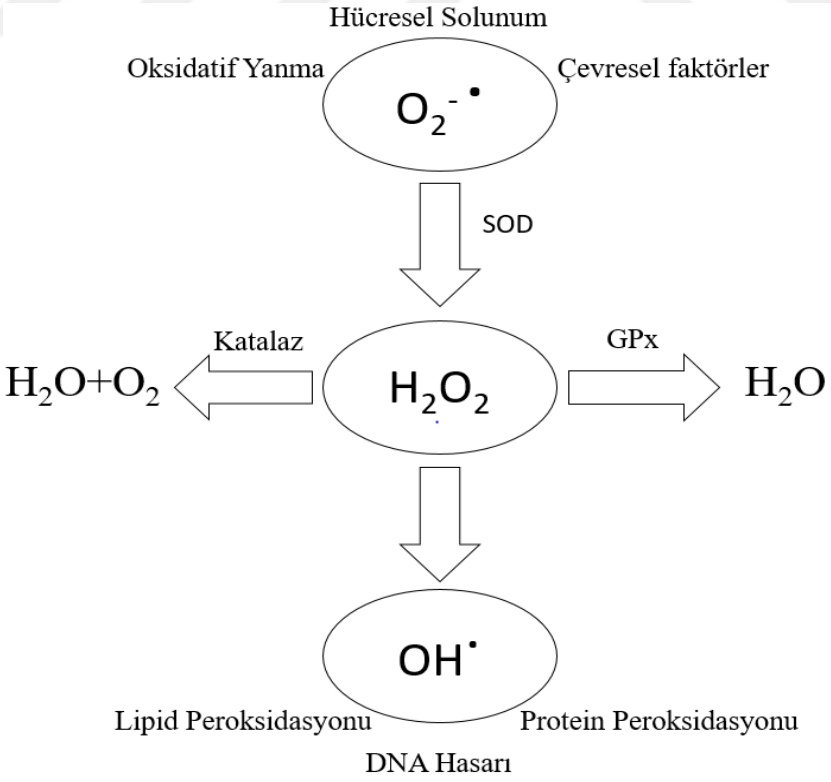
Oksidatif stres, organizmanın sahip olduğu antioksidan savunma sistemi ile serbest radikallerin üretimi arasında ortaya çıkan dengesizlik olarak tanımlanmaktadır. Toksikolojik araştırmalarda oksidatif stres toksisitenin temel bir mekanizması olarak oldukça fazla tercih edilmektedir. Serbest radikallerin oluşturacağı hasarı kompanse edebilmek adına antioksidan sistemler kullanılmaktadır fakat bu sistemler inhibisyona uğramış ya da serbest radikal üretimi oldukça fazla duruma ulaşmış ise organizmadaki antioksidan-oksidan denge de değişimler meydana gelmektedir. Bununla birlikte, oksidan konsantrasyonunda ki artış oksidatif stresi ortaya çıkartmaktadır (Ören, 2009, Karabulut ve Gülay, 2016).



Şekil 1.4. Organizmada oksidatif stres oluşumu

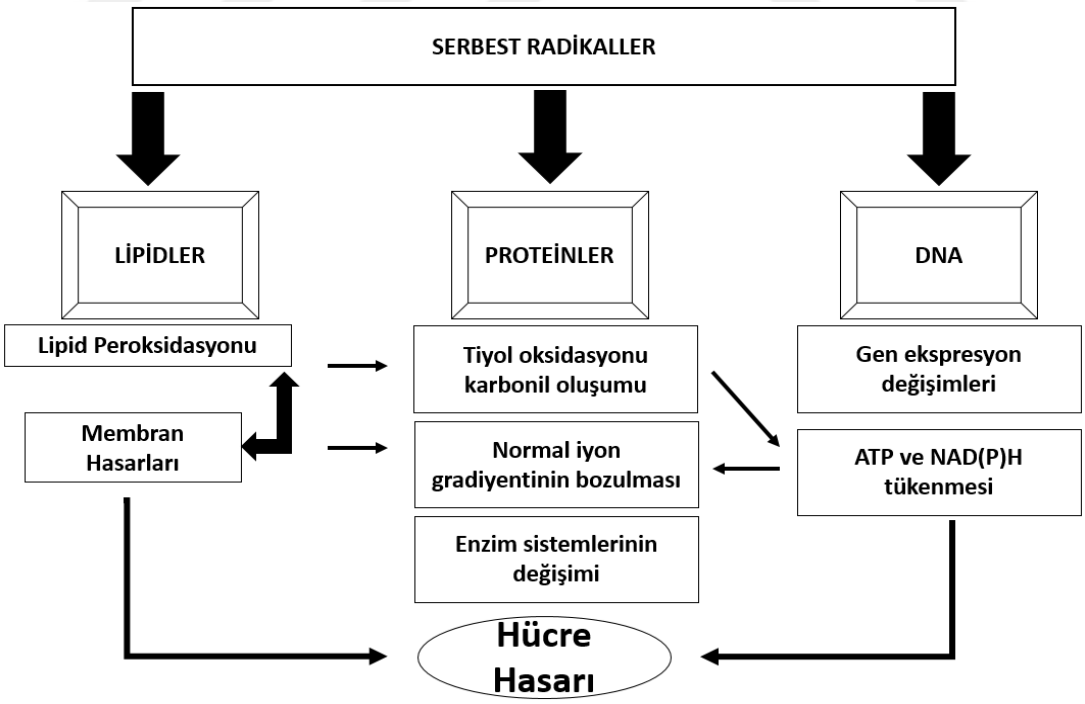
Çekirdek ve etrafında yer alan değişik sayıda elektronlardan oluşan yapı atom olarak tanımlanmaktadır. Belirli bir sistemde enerji düzey durumlarına göre yerleşen elektronlar, yörüngelerinde hareketlerini sürdürmektedirler (Onat ve ark., 2002). Moleküllerin büyük bir çoğunluğunda elektronlar ortaklanmış formda bulunmaktadır. Yörüngelerinin her birinde zıt yönde hareket eden iki elektron içermektedirler. Bu yörüngeler kovalent bağlar kurabilmek amacıyla birleşebilir veya suda bulunan oksijen atomunda bulunduğu gibi bağlanmamış çiftler halinde kalabilmektedir. Ayrıca elektronun ortaklanmadığı ya da yörüngesinde tek olduğu kimyasal türevlerde bulunmaktadır. Özellikle oksijen metabolizması sonucunda üretilen yapısında bir veya daha fazla sayıda eşlenmemiş elektrona sahip, molekül ağırlığı düşük, ömrü kısa, etkili ve aktif olan ara bileşikler serbest radikaller olarak isimlendirilmektedir (Larson, 1997; Abdollahi ve ark., 2003). Organizma ihtiyacı olan enerjiyi oluştururken besinleri

oksijenle reaksiyona uğratarak enerjiye dönüştürür ve bu sırada da ortaya çıkan kararsız ve reaktif moleküller serbest radikallerdir. Moleküler yapısından kaynaklı oldukça kararsız durumda bulunmaktadır. Kararlı bir pozisyona erişebilmek için serbest radikaller, hücre içerisinde bulunan diğer atomlar ya da moleküller ile reaksiyonlara girmektedirler (Yamada ve ark., 2005). Moleküler oksijenin elektron konfigürasyonu içerisinde oluşabilecek değişiklikler ile radikaller meydana gelmektedir. Bir spin değişikliği ile birlikte singlet oksijen ($^1O_2$), bu oksijene bir elektron transferi ile süperoksit radikali (O_2^-), ikinci bir elektron transferi ile peroksit radikallerinin üretimini başlatan hidrojen peroksit radikali (H_2O_2) ve üçüncü elektron transferi ile de toksik ve reaktif olan hidroksil radikali (OH^-) meydana gelmektedir. Oluşan radikallerin büyük bir çoğunluğu oksijen içermelerinden kaynaklı olarak reaktif oksijen türleri (ROT) olarak isimlendirilmektedir. ROT'ların hedefleri temel olarak organizmadaki makromoleküllerdir. Hayati öneme sahip olan genetik materyaller, lipitler, karbonhidratlar ve proteinler ile bulundurdukları çiftlenmemiş elektronları aracılığıyla reaksiyona girerek hücrenin komponentlerine ve aynı zamanda dokulara hasar verdiği tespit edilmiştir (Kelly ve ark., 1998; Nathan ve Ding, 2010; Wojtovich ve ark., 2012).



Şekil 1.5. Serbest radikaller ve antioksidan savunma

Lipitler serbest radikallerden etkilenen makromoleküllerin başında gelmektedir. Özellikle hücre membranlarında ki kolesterol ve yağ asitlerinin doymamış durumda olan bağları serbest radikaller ile hızlıca reaksiyon göstererek oksidatif bir yıkıma sebep olmaktadır. Bu durum lipid peroksidasyonu olarak bilinmektedir (Avşaroğlu ve Karasu, 2009) Lipid peroksidasyonu bir zincir reaksiyonu halinde devam eden oldukça zararlı bir reaksiyon türüdür. Bu reaksiyon esnasında, karbon bağlarının koparak aldehid yapısında yıkım ürünleri meydana gelmektedir. Oluşan metabolit örneklerinin başında malondialdehid (MDA) gibi alkalenler, 4-hidroksinonenal (4-HNE) gibi hidroksi alkalenlerdir. Lipid peroksidasyonunun en önemli biyobelirteçlerinden birisi de tiyobarbürik asit (TBARS) ile reaksiyon gösteren maddelerden olan MDA'dır (Richardson ve ark., 2008; Sachdev ve Davies, 2008). Zarda meydana gelen lipid peroksidasyonu, zarın permeabilitesinin yükselmesine ve zarda bulunan akışkanlığının düşmesine sebep olmaktadır. Zarın geçirgenliğinde meydana gelen bu bozukluk protein sentezi basamaklarında büyük bir öneme sahip olan potasyum (K^{+}) ve magnezyum (Mg^{+2}) iyonlarının konsantrasyonlarında bir değişikliğe, kalsiyum (Ca^{+2}) iyonlarının hücre içerisine rahatlıkla geçişine ve tüm bunlara bağlı olarak protein sentezinde bir inhibisyon meydana gelmesine sebep olmaktadır (Girotti, 1998).



Şekil 1.6. Serbest radikallerin lipidler, proteinler ve DNA gibi biyolojik moleküller üzerindeki etkisinin şematik gösterimi (Kumar ve ark., 2012)

Serbest radikal hasarına karşı oldukça hassas olan moleküllerden birisi de proteinlerdir. Serbest radikallerin gösterecekleri hasara karşı etkilenmeleri yapılarındaki amino asit bileşenlerine göre değişiklik gösterebilmektedir. Metiyonin, sistein gibi tiyol grubu (-SH) bulunduran amino asitler ile tirozin, fenilalanin, triptofan, histidin gibi aromatik yapıya sahip amino asitler oksidasyondan fazlaca etkilenerek konfigürasyonlarında değişiklikler meydana gelebilmektedir (Machlin ve Bendich, 1987; Marnett ve ark., 2003). Proteinlerin temel yapısında oluşan değişimler organizmamız için büyük bir öneme sahip olan enzimlerin, plazma proteinlerinin, hemoglobinin membranlarında bulunan reseptör proteinlerinin fonksiyonlarını yerine getirememesine sebep olabilmektedir (Jakubczyk ve ark., 2020).

Genetik materyalimiz olan DNA serbest oksijen radikallerinin kolayca hasara uğratabileceği hedeflerden biridir. Özellikle hidroksil radikali, DNA' da bulunan şeker ve bazlar ile rahatça tepkimeye girebilmektedir. Hidrojen peroksit membrandan geçerek hücre çekirdeğinde DNA'nın hasara uğramasına, hücre içerisinde işlev bozukluğuna ve daha ileri derecede hücre kaybına sebep olabilmektedir (Özkan ve Fışkın, 2004). Karbonhidratların temel yapı taşı olan glikoz ve monosakkaritler de serbest radikaller tarafından hasara uğrayabilmektedir. Hidroksil radikalleri glikoz ile tepkimesi sonrasında peroksit radikalleri meydana gelmektedir. Aldehit grubu içermesi sebebiyle glikoz toksik özellik gösterebilmektedir. Aldehitler enzimatik olmayan glikasyonlara yol açabilirler özellikle genetik materyalimiz olan DNA'ya ve proteinlere bağlanarak bu durumu meydana getirirler. Glikoz seviyesinin arttığı durumlarda glikasyon daha kolay meydana gelir ve diyabetli hastaların bazı proteinlerinde bu durum gözlemlenmektedir. Glikasyon ürünlerinin serbest radikaller ile oksidasyona uğraması sonucu son ürünlerin birikimi gözlenir ve doku hasarı oluşumu meydana gelmektedir. Kollajen proteininin dokularda birikim göstermesi dokunun elastikiyet özelliğinin kaybına ve böbrekte membran hasarına sebep olabilmektedir (Chung ve ark., 1999; Halliwell ve Gutteridge, 2015)

1.4.1. Antioksidan Savunma Mekanizması

Biyolojik sistemler, oksidatif stres neticesinde oluşan reaktif oksijen türlerinin oluşturduğu hasarı önlemek amacıyla çeşitli savunma sistemleri geliştirmektedir. Antioksidan savunma sistemleri olarak adlandırılan bu sistemler, radikal oluşumunu durdurmak, ortaya çıkan radikalleri temizlemek, etkili olan radikalleri daha zayıf formlarına dönüştürmek, hasara uğramış hedefin tamiri ve hedef dokuların antioksidan savunma sisteminin arttırılması gibi önlemler ile serbest radikal oluşumunu geciktiren ya da ortadan kaldıran tüm işlemleri kapsamaktadır (Seven ve ark., 1995). Bu sistemler, serbest radikallerin oluşturacağı zararları enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanların aktiviteleri ile denge halinde tutarak bertaraf etmektedir. Serbest oksijen radikallerinin endojen ve ekzojen olmak üzere iki oluşum kaynağı olduğu bilinmektedir. GSH, NADPH, tridoksin, vitaminler (E ve C) ve selenyum enzimatik olmayan küçük molekül ağırlıklı bileşiklere sahip olan ve reaktif oksijen türlerinin zararlı etkilerine karşı organizmalar savunma yapmaktadırlar (Rahal ve ark., 2014). Süperoksit dismutaz, katalaz, glukoz-6-fosfat dehidrogenaz, glutatyon redüktaz, glutatyon S transferaz, glutatyon peroksidaz, tridoksin redüktaz, peroksiredoksin ve metiyonin sülfoksitredüktaz gibi enzimatik aktivitesi bulunan savunma sistemine de sahiptir (Nathan ve Cunningham-Bussel, 2013). Etki mekanizmaları toplayıcı, bastırıcı ve zincir kırıcı olarak sınıflandırılmaktadır. Toplayıcı etki; reaktif oksijen türlerini etkileyen bazı antioksidanlar (enzimler) onları tutarak daha az reaktif olan başka bir moleküle çevirmektedir. Bastırıcı etki; bazı antioksidanlar (flavonoidler, vitaminler) reaktif oksijen türleri ile etkileşir ve bir proton transferiyle aktivitelerinin kaybına neden olmaktadır. Zincir kırıcı etki; bazı antioksidanlar (mineraller), reaktif oksijen türlerine ve zincir reaksiyonlarını başlatan maddelerine bağlanarak zincirin kırılmasına ve bu şekilde fonksiyonlarının kaybına neden olmaktadır. Antioksidan savunma sisteminde enzimatik olmayan bir sistemde bulunmaktadır. Enzimsel sistemin eksik kaldığı durumlarda, serbest radikalleri tutma özelliğine sahip tutucular (E vitamini, C vitamini ve glutatyon) lipidlerin radikalleri ile reaksiyona girerek antioksidan sisteme destek sağlamaktadır (Tufan ve Yücel, 2008; Kızıl ve Çay, 2010).

Tablo 1.2. Enzimatik ve Enzimatik olmayan antioksidanlara bazı örnekler

Enzimatik Antioksidanlar	Enzimatik Olmayan Antioksidanlar	
Süperoksit dismutaz (SOD)	Melatonin	Sistein
Katalaz (CAT)	Seruloplazmin	Ürik asit
Glutatyon peroksidaz (GSH-Px)	Transferrin	Glikoz
Glutatyon redüktaz	Laktoferrin	Albumin
Glutatyon-S-transferaz (GST)	Glutatyon (GSH)	Bilirubin
Mitokondriyal-sitokrom oksidaz		

1.4.1.1. Katalaz (CAT)

Katalaz, metabolizma tarafından oluşturulan H_2O_2'nin büyük bir kısmını H_2O ve O_2'ye dönüştüren antioksidan bir enzimdir (Chang ve ark., 2020). İfade edilen reaksiyon birinci ve ikinci olmak üzere iki aşamada gerçekleşir. İlk aşamada, kompleks-I olarak bilinen CAT-H_2O_2 ara ürünü meydana gelmektedir. Reaksiyon sonucu oluşan ara ürün, hidrojen peroksidin enzim ile bağlanma reaksiyonunu gerçekleştirmesi sonucu meydana gelir. Kompleks-I'in ikinci aşamada bir kez daha H_2O_2 ile reaksiyonu su ve moleküler oksijenin meydana gelmesi ile sonuçlanmaktadır.

$$CAT + H_2O_2 \longrightarrow CAT - H_2O_2 \text{ [Kompleks I]}$$

$$CAT - H_2O_2 \text{ [Kompleks I]} + H_2O_2 \longrightarrow CAT + 2H_2O + O_2 \text{ [Katalaz Enzim Aktivitesi]}$$

$$2H_2O_2 \xrightarrow{CAT} 2H_2O + O_2$$

Şekil 1.7. Katalaz reaksiyonu

Ortamdaki H_2O_2 konsantrasyonunun azaldığı durumlarda hidrojen peroksitin ortamdan uzaklaştırılması için antioksidan enzimler (GSH-Px gibi) de devreye girmektedirler. Bu reaksiyonda hidrojen peroksiti substrat olarak kullanmaktadır.

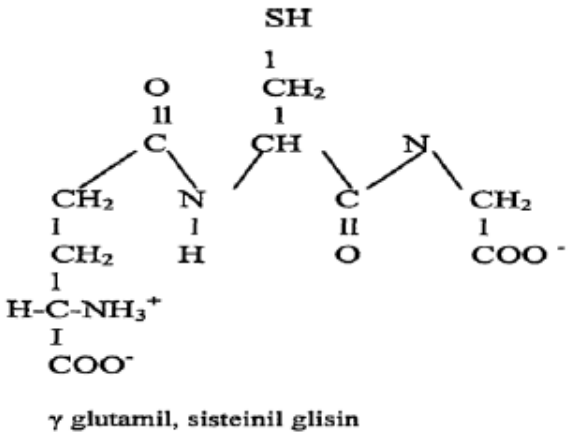
Hücreler içerisinde H_2O_2 oluşumundan sorumlu olan oksidazların çoğunluğu peroksizomlara yerleşmiş durumdadırlar. Bu nedenle katalazın büyük bir miktarı sitozol ve mitokondriye kıyasla peroksizomlarda bulunmaktadır. Özellikle eritrositlerde ve karaciğer dokularında bolca yer almaktadır (Kelly ve ark., 1998; Azevedo ve ark., 2020).

1.4.1.2. Asetilkolinesteraz (AChE)

Asetilkolinesteraz molekülü her biri 80 kDa moleküler ağırlıkta olan ve dört alt birimden oluşan bir proteindir. Asetilkolinesteraz sinir dokusunda, eritrosit membranlarında ve iskelet kaslarında mevcuttur (Ören, 2009). Asetilkolin maddesi, sinir uçları-organ ve nöron-nöron arasından uyartı taşımasının yanı sıra, sinir ve kas lifleri boyunca elektriksel bir akımın oluşturulmasında görev alan kritik öneme sahip olan bir esterdir. (Kirby ve ark., 2000). Asetilkolin, asetilkolinesteraz enzimi tarafından hidroliz edilerek inaktif formuna dönüştürülmektedir. Hidroliz reaksiyonundan sonra kolin ve asetik asit olarak isimlendirilen iki inaktif molekül meydana gelmektedir. Belirli bir zaman sonrasında inaktif olan formlar tekrardan aktifleşerek uyartı iletiminde görev almaktadır. Asetilkolinesteraz(AChE) toksisite metabolizmasında yer alan reaksiyonlarda izlendiğinde ilk olarak inhibisyona uğrayarak indüklenmektedir. AChE enziminin inhibisyonunun ölçülmesi, oksidatif stresten etkilenmenin bir biyobelirteci olarak kullanılmaktadır (Adams, 2002).

1.4.1.3. Glutatyon (GSH)

Glutatyon enzimatik olmayan bir antioksidandır ve glisin, sistein ve glutamin amino asitlerinden oluşan molekül ağırlığı da az olan tiyol bileşiklerdendir (Wellner ve ark., 1984). α-glutamil-sistein sentetaz ve glutatyon sentetazın kontrolünde sentez edilmektedir (Griffith, 1999). Glutatyon önemli bir indirgeyici ajan ve antioksidandır. Glutatyonun organizmadaki görevleri arasında detoksifikasyon ve endojen/eksojen bileşiklerin antioksidasyonu kritik bir öneme sahiptir. Bunun yanı sıra yapısında ihtiva ettiği tiyol grupları sayesinde intrasellüler redoks balansının devam etmesinde önemli bir rol oynamaktadır (Luberda, 2005). GSH oksidatif stres süresince ROT'lara elektron vererek hücreyi oksidatif stresin oluşturacağı hasara karşı koruma görevi üstlenmiştir. Koruyucu özelliğinin yanı sıra rubuloz-5-fosfat üretimi için ihtiyacımız olan $NADP^+$ 'nın oluşumunu sağlayarak DNA sentezine (Blokhina ve ark., 2003) ve hücre apoptozisi esnasında seviyesini düşürerek hücrenin apoptozis olmasına katkı sağlamaktadır (Masella ve ark., 2005).



Şekil 1.8. Glutatyonun Yapısı

Hücrelerde bulunan toplam glutatyon miktarının %5'i okside glutatyon (GSSG) şeklide bulunurken, %95'lik kısmı GSH şeklinde bulunmaktadır. GSH 'ın görevleri sıralandığında; öncelikle sistein ve tiyol gruplarını indirgenmiş durumda tutmak ve oluşabilecek zararların önüne geçmektir. Hücre içerisinde sistein depolamak, ağır metal ve bazı karbon atomlarının organizmadan uzaklaştırılmasına destek sağlamak, serbest radikal ve ROT 'ların aktivasyonunu durdurmak, DNA ve protein sentezine destek sağlamak, bazı proteinlerin disülfit bağlarına etki ederek üç boyutlu yapılarında değişiklik yapmak ve enzimlerin katıldığı reaksiyonlarda görev almaktır (Esmer, 2019).

1.4.1.4. Malondialdehid (MDA)

Hücre zarlarında çeşitli yapılarda yağlar bulunmaktadır. Bunlar fosfolipit, gliserit, glikolipit vb. yağ çeşitleridir. Serbest radikaller tarafından bu membran lipidlerinin yıkılmasına lipid peroksidasyonu adı verilmektedir (Zervos ve ark., 2011). Lipit peroksitlerin yıkılmasının ardından biyolojik açıdan aktif olan aldehitler ortaya çıkmaktadırlar. Üç veya daha fazla çift bağa sahip olan yağ asitlerinin peroksidosyonu esnasında, tiyobarbitürik asidin de kullanımı ile birlikte ortaya çıkan ara ürün malondialdehit (MDA) 'dır. MDA spesifik olarak bir biyobelirteç olmamasına rağmen peroksidasyon analizlerinde sıklıkla tercih edilmektedir (Niki, 2009; Sreejai ve Jaya, 2010). Lipid peroksidasyonunun meydana gelmesi hücre membranların ve biyolojik zarlarda ciddi hasarlara sebep olmaktadır.

1.4.1.5. Total Protein (TP)

Proteinlerin oksidatif stresten etkilenme durumları amino asit dizilimine bağlı şekilde gerçekleşmektedir. Özellikle proteinlerde yer alan sülfidril grupları oksidatif strese karşı oldukça hassastır (Sen ve Packer, 2000). Serbest radikaller proteinler üzerinde farklı zararlar oluşturabilirler (Çakatay ve Kayalı, 2004). Bu zararlara proteinlerin agregasyonu, çapraz bağlanmalar ve parçalanmalar örnektir. Bu zararlara ek olarak enzimlerin yapısında oluşturduğu bozukluklar da verilebilir. Tüm bu zararları proteinler serbest radikaller ile reaksiyona girdiklerinde sülfür radikalleri ve karbon merkezli radikalleri oluşturmasından kaynaklanır. Karbon merkezli radikaller karbonillerdir ve oksidatif hasarın ölçülmesinde tercih edilmektedir.

1.5. Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu

DNA dizisi olan genlerin organizmada biyolojik fonksiyona sahip protein moleküllerinin oluşumu ve bu dönüşüm süreci içerisinde yer alan reaksiyon basamaklarının tümü gen ifadesi veya gen ekspresyonu olarak tanımlanmaktadır. Bir başka deyişle, genetik bilgilerimiz DNA üzerinde yer almaktadır. Bu bilginin bir RNA molekülü (mRNA) üretimi ile kopyalanması transkripsiyon olarak tanımlanır. Kopyalanan genetik bilgilerin bir protein molekülüne dönüştürülmesi ise translasyon olarak isimlendirilir. Transkripsiyon ve translasyon süreçlerinin tamamına gen ekspresyonu veya gen ifadesi adı verilmektedir. Gerçek zamanlı kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu (RT-qPCR), her bir reaksiyon esnasında meydana gelen ürünleri gerçek zamanlı olarak tespit etmemize ve miktarlarının belirlenerek değerlendirmemize imkan tanıyan moleküler bir tekniktir. Bu teknik, çift iplikli DNA'ya floresan boyalar, problar veya moleküler boncuklar bağlayarak PCR ürünlerinin gerçek zamanlı görüntülenmesi esasına dayanmaktadır. Kullanılan floresan boyalar içerisinde en yaygın olan Syber Green I floresan boyasıdır (Li ve ark., 2016). Genetik bilginin RNA molekülüne aktarılması sonucu oluşan mesajcı RNA (mRNA), revers transkriptaz (RT) enzimi kullanılarak komplementer DNA'ya (cDNA) çevrilmektedir. Oluşan komplementer DNA kantitatif polimeraz zincir reaksiyonunda hedef DNA olarak kullanılır. Bu şekilde tercih edilen ilgili genin mRNA ekspresyon seviyesinin belirlenmesi sağlanabilmektedir (Turgut ve Ağaoğlu., 2020).

2. MATERYAL VE YÖNTEM

2.1. Materyal

2.1.1. Kullanılan kimyasallar ve cihazlar

Çalışmamızda kullanılan kimyasal maddeler ve cihazlar sırasıyla Tablo 2.1. ve Tablo 2.2.'de gösterilmektedir.

Tablo 2.1. Kullanılan bazı kimyasal maddelerin isimleri ve markaları

KİMYASAL ADI	MARKA
Sodium Phosphate Dibasic (Anhydrous, Na_2HPO_4)	Molychem
Thiobarbituric Acid ($C_4H_4N_2O_2S$)	Molychem
Potassium Dihydrogen Phospate (KH_2PO_4)	Merck
Citric Acid (Trisodyum Dihydrate)	Biomatik
DTNB (5,51 -Dithio-bis(2-nitrobenzoic asid)	Aldrich
Meta – Phosphoric acid	Merck
E.D.T.A. Disodium % 35	Multicell
Hidrogen Peroxide % 35 (H_2O_2)	Merck
Trichloroacetic Acid (TCA) (CCI_3COOH)	Panreac
Sodium Hydroxide (NaOH)	Merck
n-Butanol ($CH_3(CH_2)_3OH$)	Merck
Sodium Chlorure (NACI)	Merck
Bovine Serum Albumine (BSA)	Sigma
Bradford Reaktifi	Sigma
Hidroklorik Asit %37 (HCl)	Merck
Total RNA Purification Kiti (Catalog Number: TR01/TR01-150)	GeneMark
High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kiti (Catalog number: 4368814)	Applied Biosystems
GM SYBR qPCR Kit (without ROX) (Cat No: QPSY02)	GeneMark
Etilendiamin tetraasetik asit (EDTA)	Santa Cruz

Tablo 2.2. Kullanılan bazı cihazlar ve markaları

CİHAZIN ADI	MARKA
Spektrofotometre	DYNAMICA, Halo Sb-10 Single Beam Uv-Vıs
Soğutmalı Santrifüj	HERMLE Z 326 K
Vortex	BIOSAN V-1 Plus
Manyetik Çalkalayıcı	VELP Scientifica
Su Banyosu	Nüve NB 9
Hassas Terazi	Precia XT 320M
Mikro- Dismembrator U	Sartorius
Santrifüj	Herolab MicroCen® 16
Etüv	BINDER
Derin Dondurucu (-80)	Thermo Scientific Forma 700 Series
Derin Dondurucu (-20)	Arçelik No Frost
Otomatik Pipet Seti	RAININ Pipet-lite
NanoDrop spektrometresi	Thermo Scientific
CFX96	Bio-Rad

2.1.2. Zebra balığının biyolojisi ve sistematiği

Bu çalışmada model organizma olarak zebra balığı (*Danio rerio*) kullanılmaktadır. Zebra balığının üzerinde boyuna çizgiler bulunmaktadır. Ortam su ısısı 26-28 °C arasında optimum verim gösterirler. Suyun sıcaklığının yanı sıra optimum pH veriminin ise 6,5-7,5 değerinde olduğu ifade edilmektedir. Vücut boyları ortalama 4-5 cm olmakla birlikte yapısı hassas ve yan kısımlardan basık bir özelliğe sahip olduğu bilinmektedir. Erkek ve dişi bireyler arasında farklılıklar gözlemlenmektedir. Bu farklılıklar da erkek bireylerin anal yüzgeçlerinin dişilere göre daha büyük olması ve genital papilla bulundurması ve ayırt edici farklılıklardan birisidir. Dişi balıkların ise boyuna çizgilerinin belirgin olması ve vücutlarının daha büyük olması, karınlarının şişkin olması ve enine bantların sarımsı beyaz renk üzerine parlak mavi bantlar şeklinde görülmesi belirgin bir farklılık oluşturmaktadır. (Akan, 2012, Ölmez ve ark., 2015). Yapılan çalışmalar insanlardaki hastalık ve gelişim ile ilişkili bazı genlerin büyük bir miktarının zebra balıklarında da mevcut olduğunu göstermektedir (Dooley ve Zon, 2000;

Rubinstein, 2003). Özellikle gerçekleştirilen dizi analizlerinde benzerlik oranının asgari % 70 olduğu bildirilmiştir (Spitsbergen ve Kent, 2003; Howe ve ark., 2013; Gomes ve Mostowy, 2020), Bunun yanı sıra benzer genlerde meydana gelen mutasyonların nihayetinde ortaya çıkan mutasyonlarında insanlardakine benzediği ifade edilmektedir (Lieschke ve Currie, 2007; Lee ve ark., 2018). Bu benzerlik özellikle insanlarda gözlemlenen hastalıkların araştırılmasında zebra balıklarının model organizma olarak tercih edilmesinde büyük bir avantaj sağlamaktadır (Hill ve ark., 2005; Li ve ark., 2010; Can ve ark., 2020).

Tablo 2.3. Zebra balığı (*Danio rerio*) sistematiği

Âlem	*Animalia*
Alt-Alem	Bilateria
İnfra-Alem	Deuterostomia
Şube	Chordata
Alt-Şube	Vertebrata
İnfra-Şube	Gnathostomata
Üst Sınıf	Actinopterygii
Sınıf	Teleostei
Takım	Cypriniformes
Üst-Aile	Cyprinoidea
Familya	Cyprinidae
Cins	***Danio***
Tür	***Danio rerio* (Hamilton, 1822)**

2.2. Yöntem

Bu tez çalışması için Marmara Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulundan gerekli izin alınmıştır (Protokol numarası: 67.2019.mar, Tarih:07.10.2019). Deney hayvanlarının bakımlarına ilişkin olarak "Hayvan Etik Kurulu" uygulamalarına özen gösterilmiştir. Zebra balıkları ticari olarak satın alınmıştır. Çalışmada kullanılan zebra balıkları ortalama 3.91±0.05 cm boyunda ve 0.51±0.05 gram ağırlığındadır. Deneylerde kullanılan antidepresan etken maddelerinden olan essitalopram Lundbeck firmasından, amitriptilin ise Deva İlaç firmasından temin edilmiştir. 10 litrelik cam akvaryumlarda uygun sıcaklık ve havalandırma koşullarında optimizasyonlar sağlanmıştır. Optimizasyon işlemlerinde balıklar eşit sayıda ve rastgele seçilmiş olup 26 ±1 ℃ sıcaklığındaki dinlendirilmiş su içeren akvaryumlara alınmıştır. Akvaryumlarda iki hafta boyunca balıkların laboratuvar koşullarına uyum sağlaması için farklı bir işlem gerçekleştirilmemiştir. Deneysel süreçler 14/10 olarak bilinen aydınlık/karanlık foto periyotlarda gerçekleştirilmiştir. Akvaryumlar sürekli havalandırılmış ve balıklar günde iki kez türüne uygun olarak tercih edilmiş ticari balık yemi ile beslenmiştir. Deney düzeneği kontrol grubu hariç 8 gruptan oluşmaktadır. Günümüzde sıklıkla tercih edilen antidepresan etken maddelerinden olan essitalopram ve amitriplinin insanlarda kullanılan minimum ve maksimum günlük dozları temel alınarak zebra balığına uygun dozlar hesaplanmıştır ve 4-30 günlük maruziyet süreleri de planlanarak balıkların yaşam ortamlarına ilave edilmiştir. Optimizasyon şartlarının aynı olduğu kontrol grubunun bulunduğu akvaryuma ise herhangi bir etken madde ilavesi yapılmamıştır. Deney gruplarına ait akvaryumlarda yer alan akvaryum sularının % 50'si, 24 saatlik periyotlar içerisindeki etken madde konsantrasyonunda değişim olmayacak formda yenilenmiştir. (OECD, 1992) Balıkların 4 ve 30 günlük süreçleri tamamladığında beyin ve karaciğer dokuları diseksiyon işlemi ile birlikte alınarak, biyokimyasal ve moleküler analizlerin çalışılacağı zamana kadar derin dondurucuda (-80ºC) saklanmıştır.

Tablo 2.4. Deney grupları ve uygulanan dozlar/süreler

GÜN	DENEY GRUPLARI (n=8)	DOZLAR
4 Gün	Kontrol	Doz uygulanmadı.
	Grup 1 (ESSI MIN.)	Minimum Essitalopram (4 Gün) (1,2 µg / L)
	Grup 2 (ESSI MAX.)	Maksimum Essitalopram (4 Gün) (2,4 µg / L)
	Grup 3 (AMI MIN.)	Minimum Amitriptilin (4 Gün) (1,2 µg / L)
	Grup 4 (AMI MAX.)	Maksimum Amitriptilin (4 Gün) (8,64 µg / L**)**
30 Gün	Kontrol	Doz uygulanmadı.
	Grup 5 (ESSI MIN.)	Minimum Essitalopram (30 Gün) (1,2 µg / L)
	Grup 6 (ESSI MAX)	Maksimum Essitalopram (30 Gün) (2,4 µg / L)
	Grup 7 (AMI MIN.)	Minimum Amitriptilin (30 Gün) (1,2 µg / L)
	Grup 8 (AMI MAX.)	Maksimum Amitriptilin (30 gün) (8,64 µg / L**)**

2.2.1. Biyokimyasal Analizler

2.2.1.1. %10'luk doku homojenatı hazırlanması

Beyin ve karaciğer doku örnekleri gruplandırdığımız her bir balıktan disekte edildi. Diseksiyon işlemi sonucunda dokular ayrı ayrı serum fizyolojik ile yıkandı ve bir süzgeç kâğıdı aracılığıyla kurutularak yapılan tartım işlemi kaydedildi. Gerekli ölçüde serum fizyolojik ve cam boncuk ile dismembranatörde hızlı bir şekilde homojenize işlemi gerçekleştirildi. Oluşan doku homojenatları ayrı ayrı eppendorf tüplerin içerisinde üzerlerine etiketleme yapılarak çalışılacağı güne kadar derin dondurucuda (-80ºC) saklandı. Aynı gün çalışma gerçekleştirilecek ise +4 buzdolabında bekletildi.

2.2.1.2. Dokularda Bradford yöntemi ile protein tayini

Bu yöntem protein tayini belirlemede yoğun olarak kullanılmaktadır. Bradford yöntemi ile protein tayininde Coomassie Brilliant Blue (G-250) boyası kullanılmaktadır. Bu boya proteinlere bağlanarak, proteinlerdeki asidik ve bazik gruplar ile etkileşme neticesinde renkli bir çözelti oluşturmaktadır. Proteinlerin bu tarz boyalar ile reaksiyon verdiği farklı yöntemlerde mevcuttur, bu yöntemde yapısından negatif yük içeren G-250 proteindeki pozitif yüklere bağlanarak renk değişiminin meydana gelmesini sağlar.

Dokularda bu şekilde protein tayini, oluşan renkli çözeltinin 595 nm 'deki absorbans değerinin ölçülmesi temeline dayanmaktadır (Bradford, 1976).

Bradford yöntemi ile protein tayini için gerekli çözeltiler aşağıdaki şekilde hazırlandı:

- % 10 mg albümin stok çözeltisi: 10 mg albümin az miktarda distile su kullanılarak içerisinde çözüldü ve sonrasında toplam hacmi distile su eklenerek 100 ml'ye tamamlandı.
- Protein çalışma standart çözeltileri: Stok çözeltiden uygun hacimler alındı ve % 20, 40, 60, 80 µg albumin içerecek şekilde distile su ile seyreltildi ve hazırlandı.
- Bradford reaktifi: Stok çözelti içerisinden temin edilerek kullanıldı.

Deney yöntemi:

6 deney tüpü alındı. Numune (N), Standart 1 (S1), Standart 2 (S2), Standart 3(S3), Standart 4 (S4) ve Kör (K) olmak üzere işaretlenip ve aşağıdaki gibi çalışıldı.

Tablo 2.5. Bradford yöntemi ile protein tayininin dokularda yapılışı

	Numune	**S1**	**S2**	**S3**	**S4**	**Kör**
Albumin(%10 mg)	-	20 µl	40 µl	60 µl	80 µl	-
Doku homojenatı	25 µl	-	-	-	-	-
Distile su	775 µl	780 µl	760 µl	740 µl	720 µl	800 µl
Vorteks ile karıştırılır. Sonrasında bradford reaktifi eklenir.						
Bradford reaktifi	200 µl	200 µl	200 µl	200 µl	200 µl	200 µl

Vortekste karıştırılıp, oda sıcaklığında 15 dk. boyunca bekletildi. 15 dk. sonunda 595 nm 'de köre karşı absorbanslar belirlenerek kaydedildi.

Hesaplama: Protein standart grafiği ile miktarı hesaplanır.

2.2.1.3. Dokularda malondialdehid (MDA) tayini

MDA lipid peroksidasyonunda (LPO) oluşan bir üründür ve tiyobarbitürik asit (TBA) ile arasında bir reaksiyon gerçekleşebilmektedir. Bu reaksiyonun gerçekleştirilmesi sonucunda oluşan pembemsi rengin absorbansının spektrofotometrik olarak belirlenmesi esasına dayanmaktadır (Ledwozyw ve ark., 1986).

Dokularda MDA tayini için gerekli çözeltiler aşağıdaki şekilde hazırlandı:

- 0.047 M'lık TBA çözeltisi: 1 M'lık 6 ml Sodyum Hidroksit (NaOH) ile 500 mg TBA çözeltisi karıştırıldı ve 69 ml üzerine distile su eklendi.
- NaOH (1 M) : NaOH'tan 4 gram tartılıp, bir miktar distile su kullanılarak çözüldü ve distile su kullanılarak 100 ml'ye tamamlandı.
- Triklorasetik asit (TCA) çözeltisi (1.22 M; 0.6 M HCl'deki): 20 ml TCA (%100 g TCA) ve 5 ml HCl (% 37 g lık, d=1.19 g/dl'lik HCl) karıştırıldı ve distile su kullanılarak 100 ml' ye tamamlandı.
- *n-butanol:* Stok çözeltiden kullanıldı.

Deney yöntemi:

2 adet deney tüpü alındı. Kör-Numune olmak üzere işaretlendi ve Tablo 2.6'da belirtildiği gibi çalışıldı.

Tablo 2.6. Dokularda MDA tayininin yapılışı

	Numune	**Kör**
Doku homojenatı	0.25 ml	-
Distile su	-	0.25 ml
TCA	1.25 ml	1.25 ml
Vorteksle karıştırıldıktan sonra 15 dakika bekletilir.		
TBA	0.75 ml	0.75 ml
Vortekslenir ve sonrasında 30 dakika su banyosu içerisinde (kaynar su) inkübasyon yapılır.		
n-Bütanol	2 ml	2 ml

Vortekslendi ve 3000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Butanol fazı alınıp 532 nm'de köre karşı belirlenen absorbanslar kaydedildi.

Hesaplama: Doku homojenatında LPO düzeyleri MDA için saptanmış ekstinksiyon katsayısı (1.56.105 M^{-1} cm^{-1}) kullanılarak nmol MDA/ mg protein türünden hesaplanır.

2.2.1.4. Dokularda indirgenmiş glutatyon (GSH) tayini

Dokularda glutatyon seviyesinin tespiti için Ellman ayıracı kullanılmaktadır. DTNB (5-5' ditiyobis 1-2 nitrobenzoik asit) ile sülfidril gruplarının tepkimesi neticesinde ortaya çıkan renkli bileşik spektrofotometrik olarak tespit edilmektedir (Beutler, 1984).

Dokularda GSH tayini için gerekli çözeltiler aşağıdaki şekilde hazırlandı:

- % 1 g Sodyum sitrat çözeltisi: 1 gram sodyum sitrat tartıldı, bir miktar distile su içerisinde çözüldü, 100 ml'ye distile su ile tamamlandı.
- Ellman ayıracı (% 40 mg DTNB) : 40 mg DTNB (5-5' ditiyobis 1-2nitrobenzoik asit) tartıldı, bir miktar sodyum sitrat çözeltisi içerisinde (% 1 g) çözüldü. Hacim %1g'lık sodyum sitrat çözeltisi ile 100 ml'ye tamamlandı.
- Proteinsizleştirme çözeltisi: meta-fosforik asit 'ten 1.67 gram, EDTA-Na (etilen diamintetra asetik asit sodyum) tuzundan 0.2 gram ve 30 gram sodyum klorürden ayrı ayrı olarak bir miktar distile suda içerisinde çözülme işlemi yapılır. Tümü birleştirilerek distile su ile 100 ml'ye hacim tamamlandı.
- Disodyum fosfat (Na_2HPO_4) çözeltisi (0.3 M) : 4.26 gram Na_2HPO_4 biraz distile suda çözüldükten sonra ve 100 ml'ye distile su ile tamamlandı.

Deney yöntemi:

Doku homojenatından 0.2 ml alınarak bir deney tüpü içerisine konuldu ve üstüne 0.3 ml proteinsizleştirme çözeltisi eklendi. Vorteks ile karıştırıldı. 5dk. oda sıcaklığında bekletildikten sonra 10 dk. 4000 rpm'de santrifüj edildi. Pellet atılıp süpernatant kısmı alındı. İki adet deney tüpü alındı. Kör ve numune olarak işaretlenerek Tablo 2.7'de belirtildiği gibi çalışıldı.

Tablo 2.7. Dokularda indirgenmiş glutatyon (GSH) tayininin yapılışı

	Numune	**Kör**
Distile su	-	0.2 ml
Süpernatant	0.2 ml	-
Na_2HPO_4	0.8 ml	0.8 ml
Ellman ayıracı	0.1 ml	0.1 ml

Deney tüpleri vortekslenir ve sonrasında oda sıcaklığında 5 dk. bekletilir. Köre karşı spektrofotometrik olarak 412 nm absorbansta ölçümü gerçekleştirilir.

Hesaplama: Doku homojenatında GSH seviyeleri, seyreltme faktörü ve ortaya çıkan sarı renkte ki ürünün 412 nm'de ekstinksiyon katsayısı (13600/$M^{-1}cm^{-1}$) kullanımı ile GSH μg /mg protein türünden hesaplanır.

2.2.1.5. Dokularda katalaz aktivitesi (CAT) tayini

Hidrojen peroksitin (H_2O_2) su ve oksijene parçalanma reaksiyonunu katalaz enzimi gerçekleştirmektedir. Bu dönüşüm esnasında 240 nm'deki absorbansın azalması ile takip edilebilir. 1 dk 'daki absorbansta azalması katalaz aktivitesinin göstergesi olmaktadır (Aebi, 1974).

Dokularda CAT tayini için gerekli çözeltiler aşağıdaki şekilde hazırlandı:

- 50 mM ve pH=7.0 olan Fosfat tamponu:
  a) 6.81 g KH_2PO_4
  b) 8.90 g $Na_2HPO_4.2H_2O$ tartılarak ayrı ayrı bir miktar distile suda çözüldü. Daha sonra hacimleri ayrı ayrı olacak şekilde 1000 ml 'ye distile su kullanılarak tamamlandı. Deneyde kullanılacağı zaman a çözeltisinden 1 hacim b çözeltisinden 1.5 hacim alınarak pH=7.0'de olacak şekilde karıştırıldı.
- H_2O_2 çözeltisi (30 mM, d=1.11) + Fosfat tamponu: % 30 g'lık H_2O_2 çözeltisinden 0.31 ml alındı. 50 mM lık fosfat tamponu (pH=7.0) ile 100 ml'ye seyreltilerek hazırlandı. Deneyler sırasında taze hazırlanmalıdır.
- Doku homojenatı: Doku serum fizyolojik ile homojenize edilip seyreltildi. Ön denemeler yapılarak dokunun seyreltileceği oran önceden tespit edilir.

Deney yöntemi:

% 10 gramlık doku homojenatı 4000 rpm de 10 dk. santrifüj edildi. Süpernatant alındı ve 1/10, 1/20 veya 1/50 oranında serum fizyolojik kullanılarak seyreltildi ve çalışıldı. Süpernatant seyreltildikten sonra 5-10 dakika içinde kesinlikle çalışılmalıdır. Numune ve kör olarak işaretlenmiş 2 ayrı deney tüpü alınır. Aşağıda Tablo 2.8'de ki gibi çalışılır.

Tablo 2.8. Dokularda katalaz tayininin yapılışı

	Numune	**Kör**
Fosfat tamponu	-	0.2 ml
Dilüe süpernatant	0.4 ml	0.4 ml
H_2O_2 çözeltisi + fosfat tamponu	0.2 ml	-

1 dk. sonra 240 nm'de absorbansları okunarak kaydedilir.

Hesaplama: Süpernatantta katalaz aktivitesi bu deney için belirlenmiş ekstinksiyon katsayısı 0.004 (0.00394) mM-1/ mm-1 kullanılarak hesaplanır ve yapılan seyreltmeler de göz önünde bulundurulmalıdır. Ü/mg protein dk. Türünden hesaplaması yapılır.

2.2.1.6. Dokularda asetilkolinesteraz aktivitesi (AChE) tayini

Dokularda asetilkolinin inhibisyonunda görev alan enzim asetilkolinesterazdır.

Dokularda AChE tayini için gerekli çözeltiler aşağıdaki şekilde hazırlandı:

- DTNB belirteci: 8.75 g sodyum fosfat ve 1.5 g $NaHCO_3$ yaklaşık 950 ml distile suda çözüldü, pH 7'ye ayarlandı. 3.96 g DTNB çözülerek hacim distile su ile 1 litreye tamamladı (Ellman ve ark., 1961).
- Sodyum tamponu: 8.75 g sodyum fosfatdihidrat ($NaH_2PO_4.2H_2O$) 900 ml distile suda çözüldü ve 1N NaOH çözeltisiyle pH 8'e ayarlandı. Daha sonra çözelti distile su ile 1 litreye tamamlandı.
- Asetilkolin iyodür: 0.50868 g asetiltiyokolin iyodür alınır ve bir miktar 0.05 M (pH=8) sodyum fosfat tamponu içinde çözüldü. Hacim bu sodyum tamponu ile 100 ml'ye tamamlandı.

Deney yöntemi:

Her numunenin kendi körü olacak şekilde aşağıdaki gibi çalışılır.

Tablo 2.9. Dokularda Asetilkolinesteraz ölçümü

	Numune	**Kör**
DTNB Belirteci	100 µl	100 µl
Doku Homojenatı	100 µl	100 µl
Vorteks ile karıştırılır ve sadece kör 65ºC'de 3 dk. bekletilir.		
Sodyum Tamponu	2.7 ml	2.7 ml
Vorteks ile karıştırılır ve 37ºC'de 5 dk. beklenir.		
Asetilkolin İyodür	100 µl	100 µl
37ºC'de 10 dk. beklenir.		

Bu aşamadan 10 dk. sonra 412 nm.'de absorbans ölçümü yapıldı.

2.2.2. *cat, gpx1a* ve *ache* genlerinin moleküler analizleri

2.2.2.1. RNA izolasyonu

Gen ekspresyon çalışmaları için öncelikle diseke edilen doku örnekleri "GeneMark Total RNA Purification Kiti (Catalog Number: TR01/TR01-150)" kullanılarak üretici firmanın önerileri doğrultusunda homojenize edildi ve dokulardan RNA izolasyonu gerçekleştirildi. RNA izolasyonunu gerçekleştirirken, diseke edilen beyin ve karaciğer dokuları steril bistüri yardımıyla numaralandırılmış eppendorf tüplere alınarak liziz solüsyonu içerisinde homojenizatör kullanılarak parçalanmıştır. Parçalanma işlemi tamamlandıktan sonra numunelerden RNA elde etmek amacıyla kit içerisinde belirtilen prosedürde üretici firmanın açıkladığı uygulamaların tüm basamakları uygun şekilde gerçekleştirilmiştir.

Üretici firmanın önerileri ile birlikte GeneMark Total RNA Purification Kiti ile elde edilen RNA'ların konsantrasyonları (ng/µl) ve A260/A280 dalga boyundaki ışıma ölçümleri NanoDrop™ 2000 spektrometresi (Thermo Fisher Scientific) cihazı kullanılarak ölçülmüştür. A260/A280 oranı 1.8 ve üzerinde olan ekstraktları RNA saflığı açısından uygun olarak değerlendirilmiştir. Uygun saflıkta olduğu belirlenen izolasyon örnekleri PCR işleminin gerçekleştirileceği zamana kadar -20ºC'de bekletilmiştir.

RNA İzolasyonu için kullanılan GeneMark Total RNA Purification Kiti'nin içerisinde belirtilen prosedürdeki tüm uygulamaların adımları aşağıda belirtilmiştir.

- Uygun şartlar altındaki diseksiyon sonrası beyin ve karaciğer dokuları alınmıştır.
- Elde edilen dokular -70°C'de saklanabileceği gibi, RNAfter™ reaktifinde (GeneMark Kat. No. RA-100) stabilize de edilir. Örneğin, RNAfter™ reaktifinde gün boyunca 37 ℃, 1 hafta oda sıcaklığında (25 ~ 28 ℃), bir ay 4 ℃ ve süresiz olarak - 20 ℃ de saklanabilir.
- RNAfter™ reaktifi ile stabilize edilmiş doku tartılır ve homojenizasyon için tüpe yerleştirilir.
- Numuneye uygun hacimde RNA Lizis/2-ME solüsyonu eklenir ve homojenize edilir. (Doku tipine bağlı olarak genellikle 20 ~ 60 saniye).
- Homojen lizatı 3 dakika süresince en yüksek hızda döndürülür. Süpernatant yeni bir tüpe dikkatlice aktarılır.
- Homojen olan lizata eşit hacimde %70 Etanol eklenir ve vorteks yapılarak karıştırılır.
- 2 mL toplama tüpüne yerleştirilmiş bir RNA Spin Kolonuna 700 µL 'ye kadar lizat/etanol karışımı yüklenir, ardından en yüksek hızda 1 dakika boyunca (12.000-14.000 xg) döndürülür ve akan sıvı atılır.
- Her izolasyon reaksiyonu için 80 µL DNase I inkübasyon tamponu yeni bir steril tüpte, 2 µL DNase I ile önceden, vortekslemeden karıştırılır.
- RNA Spin Kolon membranının merkezine 83 µL solüsyon eklenir ve 15 dakika boyunca oda sıcaklığında (25 ~ 28 ℃) inkübasyona bırakılır.
- RNA Spin Kolonuna 500 µL RNA yıkama solüsyonu I eklenir ve en yüksek hızda 1 dakika döndürülerek akan sıvı atılır.
- RNA Spin Kolonu orijinal toplama tüpüne yerleştirilir. 600 µL RNA Yıkama Solüsyonu II eklenir. En yüksek hızda 1 dakika döndürülür ve akan sıvı atılır. Bu adım bir kez daha tekrarlanır.
- RNA Döndürme Kolonu toplama tüpüne yerleştirilir ve kalan etanolü gidermek amacıyla 3 dakika boyunca en yüksek hızda döndürülür.
- RNA Döndürme Kolonu temiz bir 1,5 mL mikrosantrifüj tüpüne yerleştirilir.
- RNA Spin Kolon membranının merkezine 30 ~ 50 µl Nükleaz içermeyen su eklenir ve 1 dakika bekletilir.

- RNA'yı elute etmek için en yüksek hızda 1 dakika santrifüjleme işleme yapılır ve elde edilen RNA örneği -70 ℃'da çalışmanın yapılacağı zamana kadar saklanır.

2.2.2.2.cDNA sentezi ve primerler

Applied Biosystems High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kiti (Catalog number: 4368814) ile üretici firmanın önerileri doğrultusunda kitin prosedürüne uygun olarak basamaklar uygulanmıştır. Çalışmada RNA konsantrasyonları 1 µg RNA örneği kullanılarak, reaksiyon karışım miktarları ve sıcaklık koşulları Tablo 2.10 'da gösterildiği gibi gerçekleştirilmiştir. Revers transkripsiyon reaksiyonunu hazırlarken, tüplere 10 µL 2X RT ana karışımı pipetlenmiştir. Karıştırma işlemi için her tüpe iki kez yukarı ve aşağı pipetleme yapılarak 10 µL RNA örnekleri eklenmiştir ve ardından tüpler kısa bir süre santrifüjlenmiştir ve Tablo 2.10'a göre karışım hazırlanmıştır. Tabloda belirtilen sıcaklık ve süre bilgilerine göre thermal cycler ayarlanmıştır. Thermal cycler'daki program bittikten sonra cDNA'lar bekletilmeden kuru buz üzerine alınmıştır.

Tablo 2.10. cDNA ve reaksiyon koşulları

cDNA Koşulları		**Reaksiyon Koşulları**	
10X RT Buffer	2.0 µl	25℃	10 dk
25X dNTP Mix (100mM)	0.8 µl	37℃	120 dk
10X RT Random Primer	2.0 µl	85℃	5 dk
MultiScribe™ Reverse Transcriptase	1 µl		
Rnase Inhibitor	1 µl		
Nuclease-free dH_20	3.2 µl		
RNA+ dH_20	10 µl		
Toplam	**20 µl**		

Çalışmamızda *cat, ache* ve *gpx1a* genleri kullanılmıştır. Housekeeping gen olarak isimlendirilen referans gen için *Actb2* tercih edilmiştir. Housekeeping geninin kullanım amacı revers transkripsiyon reaksiyonlarına eklenen RNA miktarı için PCR normalizasyonunun yapılabilmesidir. Gen ekspresyon basamaklarının oluşabilecek hatalardan etkilenmediğini belirlemek amacıyla *Actb2* kontrol geni olarak tercih edilmiştir. Çalışmada kullanılan primer çiftleri NCBI data GenBank ® kullanılarak primerblast programında sentezlenmiştir. Deneme kurgulanırken gen seçiminde hata yapmamak için oldukça kapsamlı literatür araştırması yapılmıştır. Literatürden elde

edilen gen kodları ‘Genbank’ genetik veri tabanından kontrol edilmiş, forward ve reverse dizileri kodlama bölgelerinden doğrulanmış ve daha sonra primer siparişleri verilerek ticari kit olarak alınmıştır. Kullanılan genlere ait özel primer çiftleri Tablo 2.10.’da gösterilmiştir. Elde edilen cDNA kütüphanesi üzerinde ilgili genlerin kantitatif olarak tespitinde Real-time PCR kullanılmıştır.

Tablo 2.11. Çalışmada kullanılan genlerin primer dizileri

Gen	Forward (5’– 3’)	Reverse (5’– 3’)
cat	CCAACAGCTTCAGTGCTCCT	ACTTGGGTCACGTTGTCATC
ache	CATACGCACAATACGCTGCC	TACACAGCACCATGCGAGTT
gpx1a	GGACGGGGAACCATTCAAGA	AGCATGTGATGTGCAGTGGA
Actb2	TTACCACTTCACGCCGACTC	GTCACCTTCACCGTTCCAGT

2.2.2.3. qPCR

PCR reaksiyonu uygun şartlarda nükleik asitlerin *in vitro* koşullarda çoğaltılması esasına dayanmaktadır. Esasında temelinde, DNA’nın denatürasyonu ile birlikte primerlerin hedef DNA’ya hibridizasyonunu ve zincirin uzayarak çift zincirli DNA sentezinin belli sayıda tekrarını kapsamaktadır. PCR reaksiyonu esnasında tekrarlanan döngüler üstel açıdan DNA miktarının artmasına neden olur. Real-time PCR reaksiyonu, başlangıçta ki miktara göre oluşan son ürün miktarının hassas, özgün ve diğer yöntemlere kıyasla daha rahat belirlenebildiği bir tekniktir (Bustin, 2000). Bu teknik içerisinde floresan moleküllerin yaptıkları ışımalar tespit edilerek miktar tespiti gerçekleştirilir. PCR’ın her döngüsünde ışımalar kaydedilerek ürünlerin artışlarına hangi noktada ulaşıldığı eş zamanlı olarak görülebilmektedir. (Livak ve ark., 1995)

Çalışmada, Real Time PCR işlemi için hazır ticari kit olan GeneMark SYBR qPCR Kit (without ROX)-(Cat No: QPSY02) kullanılmıştır. GM SYBR qPCR Kiti, Taq DNA polimeraz enzimi, SYBR Green floresan boyası, dNTP karışımı, $MgCl_2$ ve PCR reaksiyon tamponunu içeren hazır halde bulunan bir karışımdır. Bu karışımdan GM SYBR qPCR Mix (2X) 7.5 µl kullanılmıştır. Real Time PCR reaksiyonları CFX96 (Bio-Rad) cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Primerler ile cDNA’lardan konsantrasyon optimizasyonu yapılmıştır ve aynı zamanda erime eğrisi analizleri ile primerler kontrol edilmiştir. Daha sonrasında, tüm örnekler için ekspresyon analizleri cDNA'lerden (cDNA

Template 2.0 µl, dH20 5.1 µl) 1:2 dilüsyonda olacak şekilde dört primer için de uygulanmıştır. Revers transkripsiyon reaksiyonu ile oluşturulan cDNA'lar, belirlenen primerler (Forward Primer (10uM) 0.2 µl, Reverse Primer (10uM) 0.2 µl) ile birlikte real time PCR cihazında amplifikasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Amplifikasyon işlemi için real time PCR reaksiyon koşulları ve termal koşullar Tablo 2.12'de belirtildiği şekilde gerçekleştirilmiştir. Amplifikasyon işleminin ardından elde edilen amplifikasyon eğrilerine ait kopya eşiği (C_t) değerleri karşılaştırılarak, hedef genlerin mRNA transkripsiyon düzeylerinin oransal değişimleri belirlenerek $2^{-\Delta\Delta CT}$ metodu ile hesaplanmıştır (Livak ve Schmittgen, 2001).

Tablo 2.12. qPCR reaksiyon koşulları ve termal koşullar

Amplifikasyon Termal Profili			
Başlangıç denatürasyonu	95°C	120 sn	İlk siklus
Denatürasyon	95°C	20 sn	40 döngü
Birleşme	57°C	30 sn	
Uzama	72°C	45 sn (Okuma)	
Soğuma	Melt Curve analizi		Son siklus

2.3.İstatistiksel Analizler

Testin gücü % 80'in altında olmayacak şekilde α= 0,5 β=0,20 alınarak örneklem genişliği her bir deney grubunda en az 8'er balık ve 8 kontrol grubu üyesinden oluşacak şekilde belirlenmiştir (G Power 3.1.9.2). Sürekli değişkenlerin normal dağılıma uyumu Shapiro-Wilk testi ile, grup varyanslarının homojenliği ise Levene testi ile kontrol edilmiştir. Parametrik testlerin ön şartlarını sağlayan değişkenler bakımından bağımsız iki grup ortalaması Student t testi, tüm uygulama grupları ve kontrol grubu arasındaki farklar tek yönlü varyans analizi (One-Way ANOVA) ile karşılaştırılmıştır. Parametrik testlerin ön şartlarını sağlamayan değişkenler bakımından grup ortancaları ise Mann Whitney U testi ile değerlendirilmiştir. Kategorik değişkenler Fisher'ın kesinlik testi (Fisher's exact test) ile değerlendirilmiştir. İstatistiksel analizlerde IBM SPSS Statistics for Windows, Version 24.0 (SPSS 24, Armonk, NY: IBM Corp.) programı kullanılmıştır. İstatistiksel anlamlılık sınırı $p<0,05$ ve çift yönlü olarak alınmıştır.

3. BULGULAR VE TARTIŞMA

Seçici Serotonin Geri Alım İnhibitörleri (SSGİ) grubundan essitalopram (ESSİ) ve Trisiklik Antidepresanlar grubundan amitriptilin (AMI) etken maddelerinin insanlarda kullanılan günlük dozlarına bağlı şekilde zebra balığına uygulanarak beyin ve karaciğer dokularında oksidatif strese ilişkin belirteçleri araştırılmıştır. Biyokimyasal olarak katalaz ve asetilkolinesteraz aktiviteleri, glutatyon, malondialdehid ve total protein seviyeleri belirlenmiştir. Bununla birlikte c*at, ache* ve *gpx1a* genlerinin mRNA ekspresyon seviyeleri değerlendirilmiştir.

3.1. Bulgular

3.1.1. Biyokimyasal Bulgular

Zebra balığı (*Danio rerio*)' nda beyin ve karaciğer dokularında sık kullanılan antidepresanlardan olan essitalopram ve amitriptilin etken maddelerinin insanlarda kullanılan günlük dozları temel alınarak yapılan hesaplamalar neticesinde 4 ve 30 gün uygulanan dozların oksidatif stres parametreleri üzerine olası etkileri değerlendirilmiştir. Günlük doz uygulamaları ESSI MIN; 1,2 µg/L, ESSI MAX; 2,4 µg/L, AMI MIN; 1,2 µg/L ve AMI MAX; 8,64 µg/L olarak belirlenmiştir. Bu çalışma için ilaç analizlerinde çokça tercih sebebi olan zebra balığı model organizma olarak kullanılmıştır. Oksidatif stres parametrelerinde biyokimyasal açıdan katalaz (CAT), glutatyon (GSH), asetilkolinesteraz (AChE), malondialdehid (MDA) ve total protein (TP) düzeyleri analiz edilerek değerlendirilmiştir.

Çalışmada essitalopram ve amitriptilin etken maddelerinin 4 ve 30 günlük uygulama sonrası zebra balığı (*Danio rerio)* 'nda beyin ve karaciğer dokularında CAT, AChE, GSH, MDA ve TP düzeyleri Tablo 3.1 ve Tablo 3.2'de gösterilmiştir.

Tablo 3.1. Essitalopram ve amitriptilin etken maddelerinin 4 ve 30 günlük uygulama sonrası zebra balığı beyin dokularında CAT, AChE, GSH, MDA ve TP düzeyleri (*: p<0,05, **: p<0,01, ***: p<0,001 kontrol ve maruziyetin gerçekleştiği grup arasında anlamlı farkı göstermektedir.)

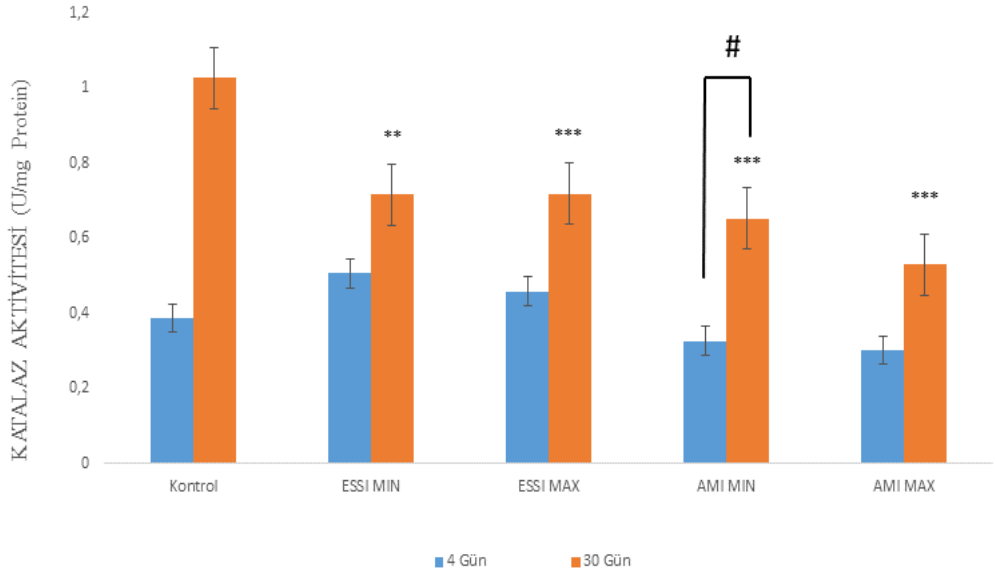
BEYİN					
Gruplar **(Dozlar)**	**CAT** (U/mg protein)	**AChE** (U/mg protein)	**GSH** (nmol/g protein)	**MDA** (nmol/g protein)	**TP** (µg/µL protein)
Kontrol	0,387±0,029	0,025±0,004	0,122±0,008	0,018±0,0005	22,579±1,185
Grup 1 (ESSI MIN) (1,2 µg / L)	0,505±0,044	0,062±0,009	0,097±0,001**	0,019±0,001	19,846±0,689
Grup 2 (ESSI MAX) (2,4 µg/L)	0,458±0,036	0,086±0,007*	0,104±0,002	0,023±0,002	18,888±0,408*
Grup 3 (AMI MIN) (1,2 µg / L)	0,327±0,024	0,041±0,007	0,117±0,004	0,020±0,002	22,395±1,177
Grup 4 (AMI MAX) (8,64 µg/L)	0,302±0,026	0,066±0,006*	0,129±0,003	0,023±0,0006*	21,547±0,436
Kontrol	1,026±0,078	0,080±0,012	0,162±0,008	0,032±0,001	10,763±0,569
Grup 5 (ESSI MIN) (1,2 µg / L)	0,715±0,066**	0,088±0,025	0,172±0,014	0,034±0,0007	15,753±0,677*
Grup 6 (ESSI MAX) (2,4 µg/L)	0,647±0,064***	0,141±0,023*	0,175±0,012	0,038±0,002***	13,948±0,630*
Grup 7 (AMI MIN) (1,2 µg/L)	0,651±0,052***	0,123±0,023	0,175±0,009	0,035±0,002	17,311±0,374***
Grup 8 (AMI MAX) (8,64 µg/L)	0,530±0,052***	0,139±0,005*	0,141±0,002	0,041±0,0008***	15,664±0,613***

Tablo 3.2. Essitalopram ve amitriptilin etken maddelerinin 4 ve 30 günlük uygulama sonrası zebra balığı karaciğer dokularında CAT, AChE, GSH, MDA ve TP düzeyleri (*: p<0,0; **: p<0,01; ***: p<0,001 kontrol ve maruziyetin gerçekleştiği grup arasında anlamlı farkı göstermektedir.)

KARACİĞER					
Gruplar **(Dozlar)**	**CAT** (U/mg protein)	**AChE** (U/mg protein)	**GSH** (nmol/g protein)	**MDA** (nmol/g protein)	**TP** (µg/µL protein)
Kontrol	0,341±0,028	0,013±0,003	0,145±0,008	0,018±0,001	27,142±0,549
Grup 1 (ESSI MIN) (1,2 µg/L)	0,447±0,015*	0,019±0,005	0,111±0,006**	0,021±0,0008	23,283±0,888
Grup 2 (ESSI MAX) (2,4 µg/L)	0,478±0,031**	0,035±0,003**	0,115±0,003*	0,023±0,001*	23,546±1,063
Grup 3 (AMI MIN) (1,2 µg/L)	0,398±0,022	0,010±0,0007	0,122±0,009	0,020±0,001	25,342±1,254
Grup 4 (AMI MAX) (8,64 µg/L)	0,310±0,024	0,020±0,002	0,144±0,008	0,023±0,0009	25,704±1,665
Kontrol	0,650±0,047	0,016±0,001	0,131±0,004	0,040±0,003	14,449±0,969
Grup 5 (ESSI MIN) (1,2 µg/L)	0,701±0,053	0,024±0,001*	0,175±0,024	0,041±0,002	18,080±0,480
Grup 6 (ESSI MAX) (2,4 µg/L)	0,717±0,067	0,030±0,003***	0,145±0,01	0,042±0,003	15,143±1,044
Grup 7 (AMI MIN) (1,2 µg/L)	0,530±0,076	0,029±0,002**	0,157±0,014	0,048±0,005	21,706±0,753***
Grup 8 (AMI MAX) (8,64 µg/L)	0,510±0,054	0,034±0,003***	0,152±0,007	0,074±0,014***	18,988±1,289*

3.1.1.1. Dokularda katalaz aktivitesi

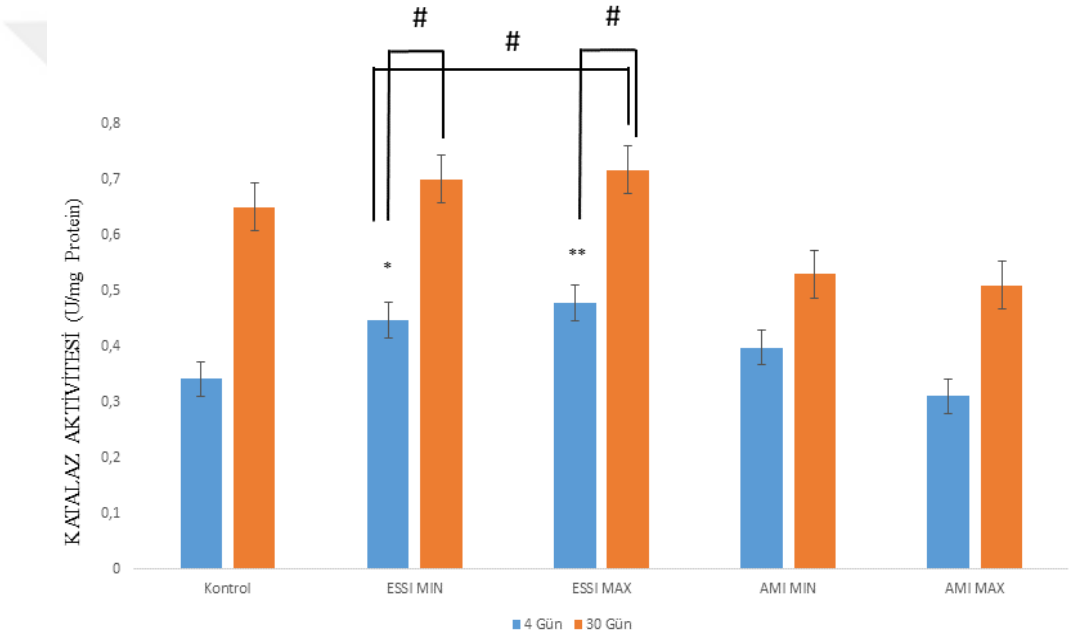
Essitalopram ve amitriptilin etken maddelerinin zebra balığının (*Danio rerio*) beyin ve karaciğer dokularındaki oksidatif stres parametrelerinden birisi olan ve organizmanın antioksidan savunma sistemlerinden olan katalaz enzim aktivitesine olası etkisi belirlenmiştir. 4 ve 30 günlük her iki etken maddenin de minimum ve maksimum dozlarının uygulanması sonrasında katalazın aktivite değişimleri Şekil 3.3 ve Şekil 3.4 de gösterilmiştir.



Şekil 3.1. Essitalopram ve amitriptilin etken maddelerinin 4 ve 30 günlük uygulama sonrası zebra balığı beyin dokularında CAT aktivitesi [ESSI MIN; 1,2 µg/L, ESSI MAX; 2,4 µg/L, AMI MIN; 1,2 µg/L ve AMI MAX; 8,64 µg/L], (*: $p<0,0$; **: $p<0,01$; ***: $p<0,001$ kontrol ve maruziyetin gerçekleştiği grup arasında anlamlı farkı göstermektedir. #: $p< 0,05$; gruplar arasında anlamlı farkı göstermektedir; One-Way ANOVA)

Hem essitalopramın hem de amitriptilinin 4 ve 30 gün süresince minimum ve maksimum dozlarının zebra balıklarına uygulanması sonrasında spektrofotometrik yöntemler ile analizler gerçekleştirilmiştir. Beyin dokusunda essitalopramın 4 günlük minimum ve maksimum dozlarının uygulanması sonrasında kontrol grubuna göre anlamlı olmayan bir artış olduğu belirlenmiştir ($p>0,05$). Buna karşın essitalopramın 30 günlük subkronik olarak nitelendirdiğimiz minimum ve maksimum doz uygulaması sonrasında

kontrol grubuna kıyasla katalaz aktivitesinde anlamlı bir düşüşün olduğu tespit edilmiştir ($p<0,01$ ve $p<0,001$). Amitriptilinin 30 gün süresince minimum ve maksimum dozlarının uygulanması sonrasında beyin dokusunda yapılan ölçümlerde katalaz aktivitesinde istatistiksel açıdan anlamlı bir azalmanın olduğu belirlenmiştir ($p<0,001$). Benzer şekilde 4 günlük uygulamada da bir düşüş olduğu görülmüştür ancak bu düşüş istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p>0,05$). Ayrıca amitriptilinin minimum 4 ve 30 günlük doz uygulanmasında 30 günlük uygulama neticesinde katalaz aktivitesinde 4 günlüğe göre anlamlı bir artış gösterdiği tespit edilmiştir (#: $p<0,05$; One-Way ANOVA) ve bulgular Şekil 3.1'de gösterilmiştir.

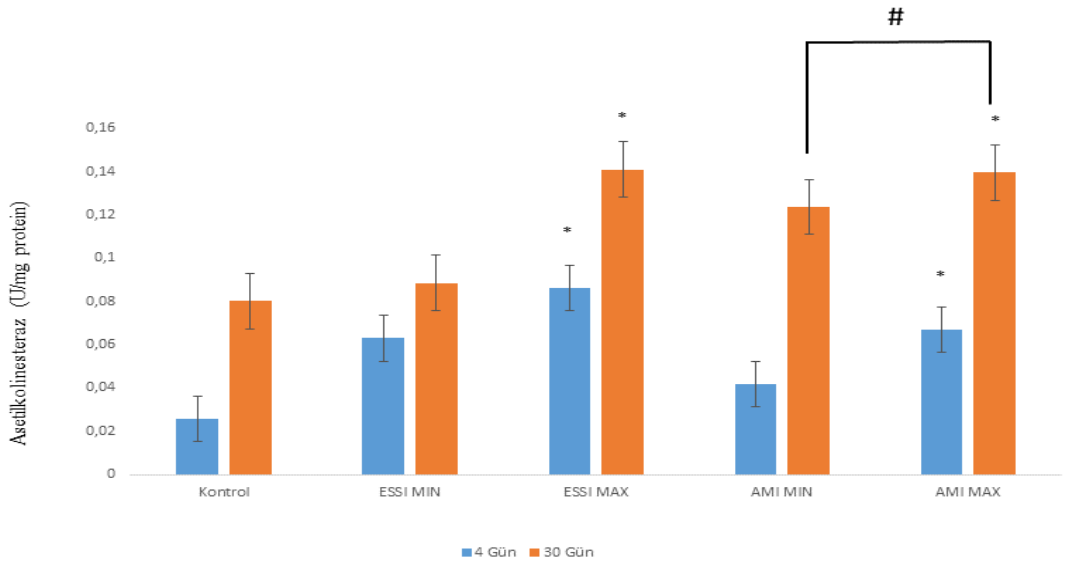


Şekil 3.2. Essitalopram ve amitriptilin etken maddelerinin 4 ve 30 günlük uygulama sonrası zebra balığı karaciğer dokularında CAT aktivitesi, [ESSI MIN; 1,2 µg/L, ESSI MAX; 2,4 µg/L, AMI MIN; 1,2 µg/L ve AMI MAX; 8,64 µg/L], (*: $p<0,05$, **: $p<0,01$, ***: $p<0,001$ kontrol ve maruziyetin gerçekleştiği grup arasında anlamlı farkı göstermektedir. #: $p< 0,05$; gruplar arasında anlamlı farkı göstermektedir; One-Way ANOVA)

Hem essitalopramın hem de amitriptilinin 4 ve 30 gün süresince minimum ve maksimum dozlarının zebra balıklarına uygulanması sonrasında spektrofotometrik yöntemler ile karaciğer dokusunda katalaz aktivitesinin analizleri gerçekleştirilmiştir. Karaciğer dokusunda essitalopramın 4 günlük minimum ve maksimum dozlarının uygulanması sonrasında katalaz aktivitesinde istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde kontrol grubuna kıyasla artış olduğu görülmektedir ($p<0,05$). Essitalopramın minimum ve maksimum 30 günlük uygulanması sonrasında da kontrol grubuna göre artış olduğu belirlenmiştir ($p>0,05$). Amitriptilinin 4 günlük minimum doz uygulanması sonrasında kontrol grubuna kıyasla artış ($p>0,05$), maksimum doz uygulanması sonrasında ise azalma meydana gelmiştir ($p>0,05$). Amitriptilinin karaciğer dokusunda 30 günlük minimum ve maksimum doz uygulanması sonrasında katalaz aktivitelerinde kontrol grubu ile karşılaştırıldığında azalma olduğu tespit edilmiştir ($p>0,05$). Ayrıca essitalopram minimum ve maksimum dozlarının 4 ve 30 günlük uygulamalarında 30 günlük doz uygulanmasının 4 günlüklere kıyasla anlamlı bir artış gösterdiği istatistiksel olarak belirlenmiştir (#: $p<0,05$; One-Way ANOVA) ve bulgular Şekil 3.2 ’de gösterilmiştir.

3.1.1.2.Dokularda asetilkolinesteraz aktivitesi

Essitalopram ve amitriptilin etken maddelerinin zebra balığında (*Danio rerio*) beyin ve karaciğer dokularındaki 4 ve 30 günlük doz uygulanmaları sonrasında asetilkolinesteraz enzim aktivitesi üzerine etkisi belirlenerek Şekil 3.3. ve Şekil 3.4' da gösterilmiştir.

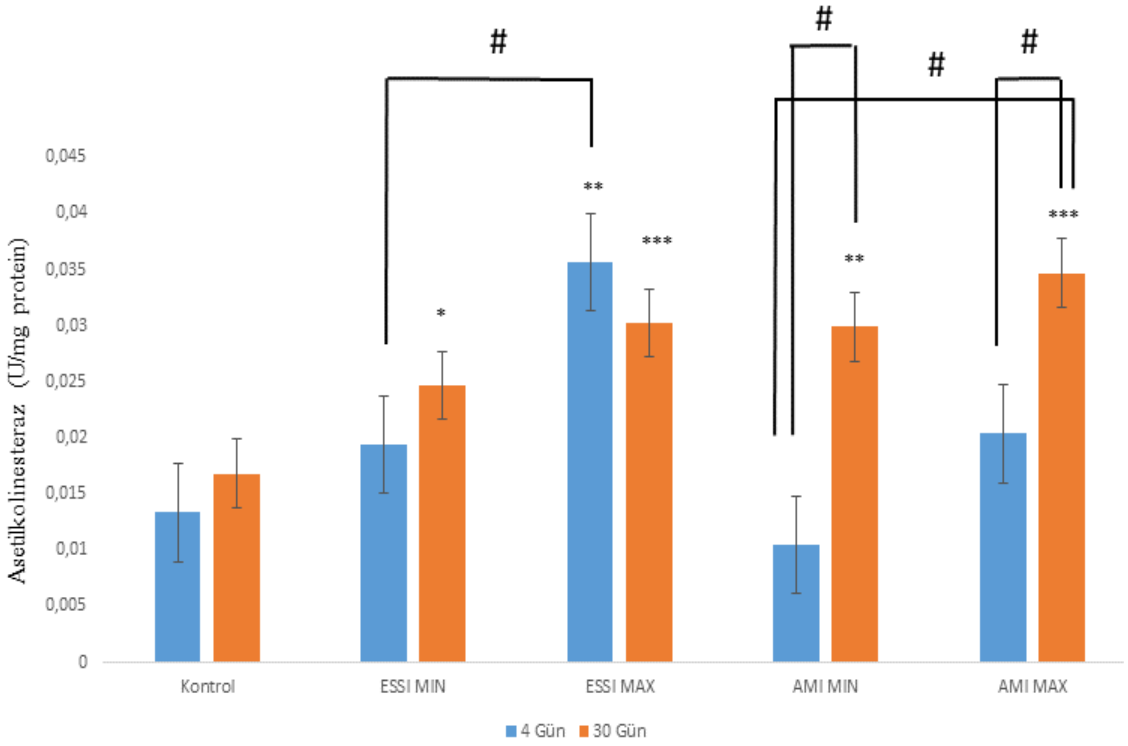


Şekil 3.3. Essitalopram ve amitriptilin etken maddelerinin 4 ve 30 günlük uygulama sonrası zebra balığı beyin dokularında AChE aktivitesi, [ESSI MIN; 1,2 µg/L, ESSI MAX; 2,4 µg/L, AMI MIN; 1,2 µg/L ve AMI MAX; 8,64 µg/L], (*: $p<0,05$, **: $p<0,01$, ***: $p<0,001$ kontrol ve maruziyetin gerçekleştiği grup arasında anlamlı farkı göstermektedir. #: $p< 0,05$; gruplar arasında anlamlı farkı göstermektedir; One-Way ANOVA)

Essitalopram ve amitriptilin etken maddelerinin minimum ve maksimum olmak üzere 4 ve 30 gün uygulanmasından sonra AChE aktivitesi beyin ve karaciğer dokularında spektrofotometrik yöntem ile analiz edilmiştir. Essitalopram etken maddesinin beyin dokusunda 4 günlük minimum doz uygulanması sonrasında kontrol grubuna göre bir artış olduğu gözlenmiştir ($p>0,05$). 4 günlük maksimum doz uygulanması sonrasında ise kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir yükselme olduğu tespit edilmiştir ($p<0,05$). Essitalopramın 30 gün süresince minimum ve maksimum doz uygulanması sonrasında artış olduğu görülmektedir ancak özellikle maksimum doz sonrasında kontrol grubuna göre anlamlı bir yükselme olduğu tespit edilmiştir ($p<0,05$).

Amitriptilin etken maddesinin 4 ve 30 günlük beyin dokusunda doz uygulanması sonrasında asetilkolinesteraz aktivitesinde artış olduğu belirlenmiştir. Bu artışlardan amitriptilinin 4 ve 30 gün süresince özellikle maksimum dozunda istatistiksel olarak anlamlı bir aktivite artışı olduğu belirlenmiştir ($p<0,05$). Ayrıca amitriptilinin minimum 30 günlük doz uygulanması ile maksimum 30 gün arasında istatistiksel olarak anlamlı bir artış olduğu belirlenmiştir (#: $p<0,05$; One-Way ANOVA) ve bulgular Şekil 3.3 'te gösterilmiştir.

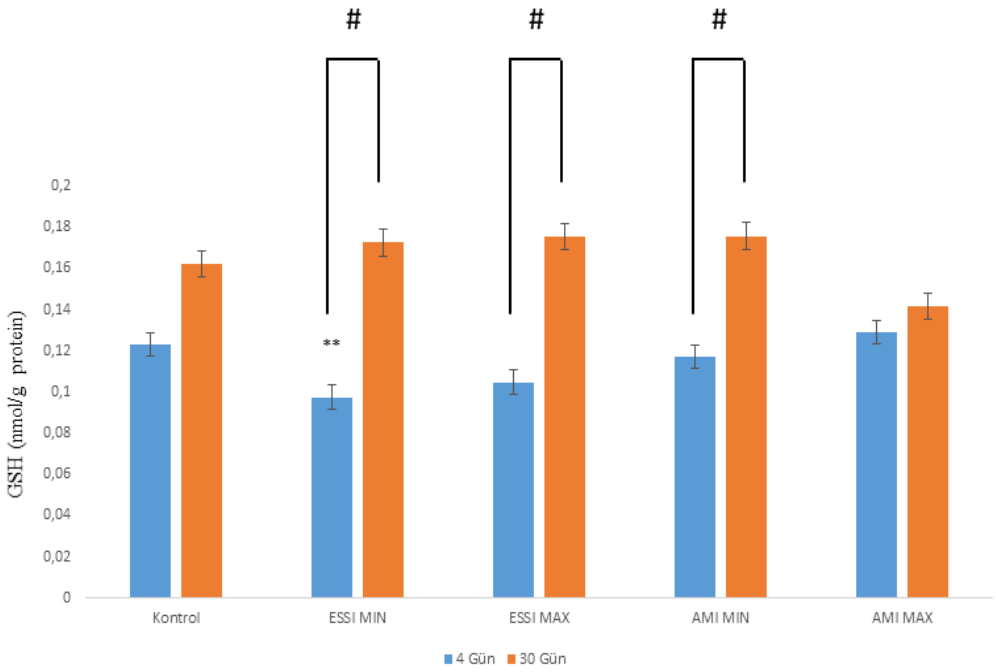
Her iki etken maddenin 4 ve 30 gün süresince karaciğer dokusunda uygulanması sonucunda asetilkolinesteraz enzim aktiviteleri spektrofotometrik yöntem ile analiz edilmiştir. Bu ölçümlerde 4 günlük essitalopram minimum doz uygulanması sonrasında kontrol grubuna göre bir artış, 30 günlük minimum doz uygulanması sonrasında ise asetilkolinesteraz aktivitesinde kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir artış meydana gelmiştir ($p<0,05$). Essitalopramın 4 ve 30 gün süresince maksimum doz uygulanmasında, 4 günlük ve 30 günlük kontrol grubuna göre karşılaştırma yapıldığında anlamlı bir artış olduğu tespit edilmiştir ($p<0,05$ ve $p<0,01$). Ayrıca essitalopram 4 gün minimum doz uygulanması ile 4 gün essitalopram maksimum doz uygulanmasında iki grup arasında da istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olduğu tespit edilmiştir (#: $p<0,05$; One-Way ANOVA). Amitriptilin etken maddesinin 4 günlük minimum doz uygulanmasında kontrol grubuna göre hafif bir düşüş belirlenmiştir ($p>0,05$), ancak 30 günlük minimum doz uygulanması sonrasında asetilkolinesteraz seviyesinde kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir artış meydana gelmiştir ($p<0,01$). Amitriptilinin 4 ve 30 gün süresince maksimum doz uygulanması sonrasında kontrol grubuna göre her ikisinde de artış meydana gelmiştir ancak 30 günlük uygulama sonrasında istatistiksel açıdan anlamlı bir yükselme belirlenmiştir ($p<0,001$). Amitriptilinin 4 ve 30 günlük minimum ve maksimum doz uygulamaları kendi içinde değerlendirildiğinde 30 günlük uygulamalarda asetilkolinesteraz aktivitesinde anlamlı bir şekilde artışların olduğu belirlenmiştir (#: $p<0,05$; One-Way ANOVA) ve bulgular Şekil 3.4 'de gösterilmiştir.



Şekil 3.4. Essitalopram ve amitriptilin etken maddelerinin 4 ve 30 günlük uygulama sonrası zebra balığı karaciğer dokularında AChE aktivitesi, [ESSI MIN; 1,2 µg/L, ESSI MAX; 2,4 µg/L, AMI MIN; 1,2 µg/L ve AMI MAX; 8,64 µg/L], (*: $p<0,05$, **: $p<0,01$, ***: $p<0,001$ kontrol ve maruziyetin gerçekleştiği grup arasında anlamlı farkı göstermektedir. #: $p<0,05$; gruplar arasında anlamlı farkı göstermektedir; One-Way ANOVA)

3.1.1.3.Dokularda glutatyon seviyesi

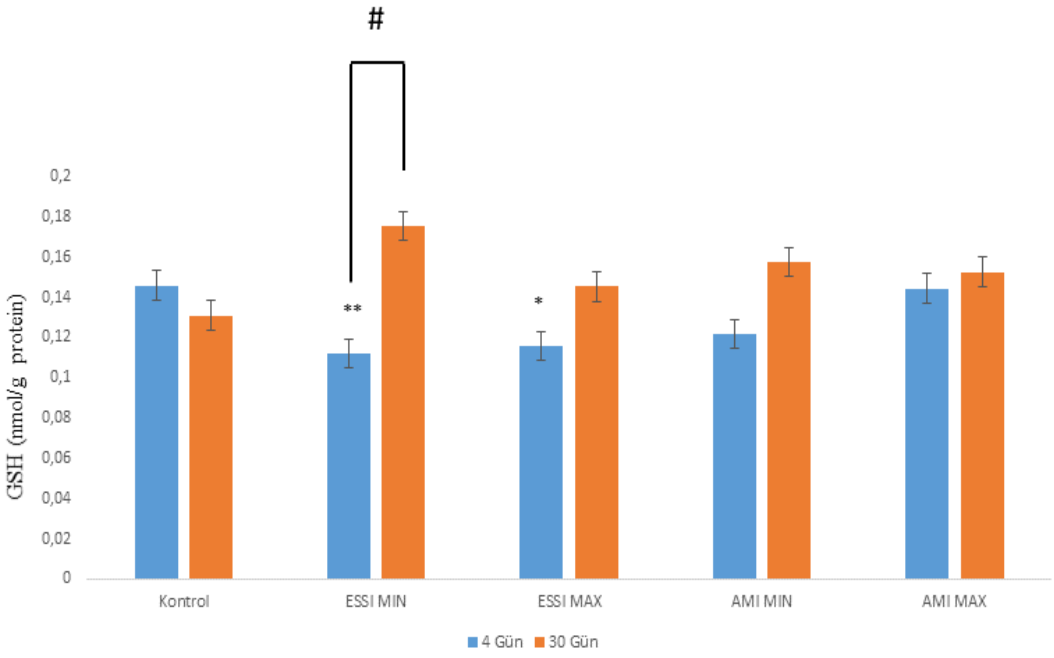
Essitalopram ve amitriptilin etken maddelerinin zebra balığında (*Danio rerio*) beyin ve karaciğer dokularındaki 4 ve 30 günlük doz uygulanmaları sonrasında GSH seviyesi üzerine etkisi belirlenerek Şekil 3.5 ve Şekil 3.6 'da gösterilmiştir.



Şekil 3.5. Essitalopram ve amitriptilin etken maddelerinin 4 ve 30 günlük uygulama sonrası zebra balığı beyin dokularında GSH seviyesi, [ESSI MIN; 1,2 µg/L, ESSI MAX; 2,4 µg/L, AMI MIN; 1,2 µg/L ve AMI MAX; 8,64 µg/L], (*: $p<0,05$; **: $p<0,01$; kontrol ve maruziyetin gerçekleştiği grup arasında anlamlı farkı göstermektedir. #: $p< 0,05$; gruplar arasında anlamlı farkı göstermektedir; One-Way ANOVA)

Beyin dokusunda 4 ve 30 gün essitalopram ve amitriptilin uygulanmasından sonra GSH seviyesinde kontrol grubu ile karşılaştırıldığında değişimler gözlenmiştir. Bulgular kontrol grubuna göre karşılaştırıldığında, essitalopramın 4 gün boyunca minimum doz uygulanması sonrasında GSH seviyesinin istatistiksel olarak anlamlı bir düşüş gösterdiği tespit edilmiştir ($p<0,01$). Aksine 30 günlük doz uygulanmasında ise kontrol grubuna göre artış meydana gelmiştir ($p>0,05$). Essitalopramın minimum dozunda 4 ve 30 günlük süreler arasında ise anlamlı bir şekilde 30 günlük uygulama sonrasında GSH seviyesinin artış gösterdiği görülmüştür (#: $p<0,05$; One-Way ANOVA). Essitalopramın maksimum doz uygulanmasında 4 günlükte kontrol grubuna göre azalma, 30 günlükte ise kontrol grubuna göre GSH seviyesinde yükselme tespit edilmiştir ($p>0,05$). Essitalopramın maksimum dozunda 4 ve 30 günlük süreler arasında ise anlamlı bir şekilde 30 günlük uygulama sonrasında GSH seviyesinin artış gösterdiği görülmüştür (#: $p<0,05$; One-Way ANOVA). Amitriptilinin 4 günlük doz uygulanmasında kontrol grubuna göre azalma, 30

günlük uygulanmasında ise artış belirlenmiştir (p>0,05). Ayrıca Amitriptilinin minimum dozunda 4 ve 30 günlük süreler arasında ise anlamlı bir şekilde 30 günlük uygulama sonrasında GSH seviyesinin artış gösterdiği görülmüştür (#: p<0,05; One-Way ANOVA). Amitriptilinin 4 ve 30 günlük maksimum doz uygulanmasında ise kontrol grubuna göre artış olduğu tespit edilmiştir (p>0,05).



Şekil 3.6. Essitalopram ve amitriptilin etken maddelerinin 4 ve 30 günlük uygulama sonrası zebra balığı karaciğer dokularında GSH seviyesi, [ESSI MIN; 1,2 µg/L, ESSI MAX; 2,4 µg/L, AMI MIN; 1,2 µg/L ve AMI MAX; 8,64 µg/L], (*: p<0,05; **: p<0,01; maruziyetin gerçekleştiği grup arasında anlamlı farkı göstermektedir. #: p< 0,05; gruplar arasında anlamlı farkı göstermektedir; One-Way ANOVA)

Karaciğer dokusunda 4 ve 30 gün essitalopram ve amitriptilin uygulanmasından sonra GSH seviyesinde kontrol grubu ile karşılaştırıldığında değişimler gözlenmiştir. Bulgular kontrol grubuna göre karşılaştırıldığında essitalopramın 4 günlük minimum ve maksimum uygulanması sonrasında anlamlı bir şekilde GSH seviyesinde düşüş olduğu tespit edilmiştir (p<0,01 ve p<0,05). 30 günlük uygulanmasında ise, kontrol grubuna göre anlamlı olmayan artış gösterdiği görülmektedir (p>0,05). Ayrıca essitalopramın minimum dozunda 4 ve 30 günlük süreler arasında ise anlamlı bir şekilde 30 günlük uygulama sonrasında GSH seviyesinin artış gösterdiği görülmüştür (#: p<0,05; One-Way

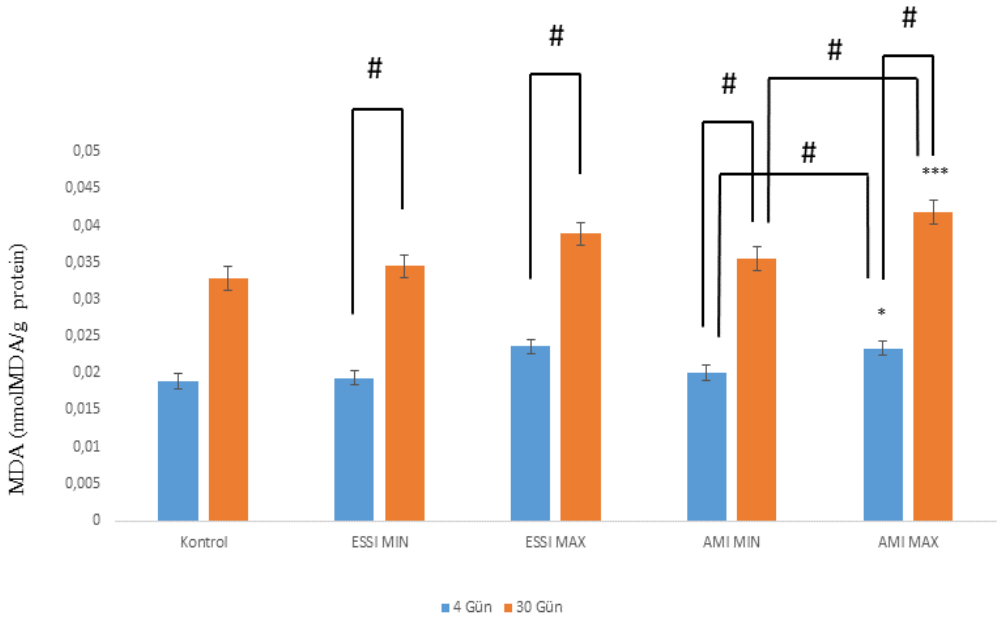
ANOVA). Amitriptilinin 4 günlük minimum doz uygulanmasından sonra GSH seviyesinde kontrol grubuna göre azalma, 30 günlükte ise yükselme olduğu belirlenmiştir ($p>0,05$). Amitriptilinin 4 ve 30 günlük maksimum doz uygulanmasından sonra kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel açıdan anlamlı olmayan artışın olduğu tespit edilmiştir ($p>0,05$).

3.1.1.4. Dokularda malondialdehid seviyesi

Essitalopram ve amitriptilin etken maddelerinin zebra balığında (*Danio rerio*) beyin ve karaciğer dokularındaki 4 ve 30 günlük doz uygulanmaları sonrasında lipid peroksidasyonunun belirteçlerinden olan MDA seviyesinin üzerine etkisi belirlenerek Şekil 3.7. ve Şekil 3.8' de gösterilmiştir.

Beyin dokusunda 4 ve 30 gün essitalopram ve amitriptilin uygulanmasından sonra, MDA seviyesinde kontrol grubu ile karşılaştırıldığında değişimler gözlenmiştir. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında essitalopramın 4 ve 30 günlük minimum ve maksimum dozlarının uygulanması sonrasında gruplarda kontrol grubuna göre bir artış olduğu tespit edilmiştir ($p>0,05$). Ayrıca essitalopramın minimum ve maksimum dozlarında 4 ve 30 günlük süreler arasında ise anlamlı bir şekilde 30 günlük uygulama sonrasında MDA seviyesinin artış gösterdiği görülmüştür (#: $p<0,05$; One-Way ANOVA). Amitriptilinin 4 ve 30 günlük minimum doz uygulanmasından sonra her iki sürede de kontrol grubuna kıyasla bir artış meydana gelmiştir ($p>0,05$). 4 ve 30 gün süresince amitriptilinin maksimum doz uygulanması sonrasında kontrol grubu ile karşılaştırma yapıldığında her iki sürede de istatistiksel açıdan anlamlı olan bir yükselme olduğu analiz sonuçlarında tespit edilmiştir ($p<0,05$ ve $p<0,001$). Ayrıca amitriptilinin minimum ve maksimum doz uygulanan gruplarında 4 ve 30 günlük süreler arasında, anlamlı bir şekilde 30 günlük uygulama sonrasında MDA seviyesinin artış gösterdiği görülmüştür (#: $p<0,05$; One-Way ANOVA). Amitriptilinin 4 günlük minimum doz uygulaması ile 4 günlük maksimum doz uygulandığı gruplar arasında ve aynı şekilde 30 günlük gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olduğu, dozların maksimum ve sürelerin 30 gün olması ile birlikte MDA seviyesinin de artış gösterdiği

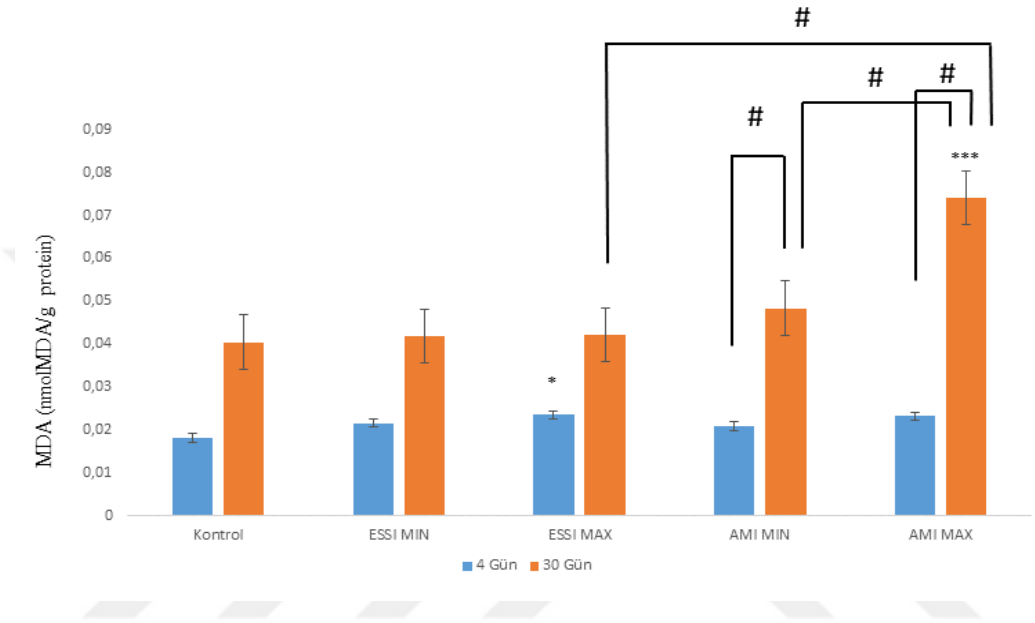
görülmüştür (#: p<0,05; One-Way ANOVA).



Şekil 3.7. Essitalopram ve amitriptilin etken maddelerinin 4 ve 30 günlük uygulama sonrası zebra balığı beyin dokularında MDA seviyesi, [ESSI MIN; 1,2 µg/L, ESSI MAX; 2,4 µg/L, AMI MIN; 1,2 µg/L ve AMI MAX; 8,64 µg/L], (*: p<0,05; ***: p<0,001; kontrol ve maruziyetin gerçekleştiği grup arasında anlamlı farkı göstermektedir. #: p< 0,05; gruplar arasında anlamlı farkı göstermektedir; One-Way ANOVA)

Karaciğer dokusunda 4 ve 30 günlük essitalopram ve amitriptilin dozlarının uygulanmasından sonra MDA seviyesinde kontrol grubu ile karşılaştırıldığında değişimler gözlenmiştir. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında essitalopramın 4 ve 30 günlük minimum doz uygulanması sonrasında hafif bir artış olduğu görülmüştür (p>0,05). Essitalopramın 4 günlük maksimum doz uygulanması sonrasında ise kontrol grubuna kıyasla anlamlı artış olduğu belirlenmiştir (p<0,05). Essitalopramın 30 günlük maksimum doz uygulanması sonrasında ise kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı olmayan hafif bir artış meydana gelmiştir (p>0,05). Amitriptilinin 4 ve 30 günlük minimum dozlarının uygulanması sonrasında kontrol grubuna kıyasla artış olduğu ancak anlamlılık göstermediği belirlenmiştir (p>0,05). Amitriptilinin 30 gün süresince maksimum dozunun uygulandığı grupta kontrol grubuna göre anlamlı bir artış olduğu tespit edilmiştir (p<0,001). Ayrıca essitalopram 30 günlük maksimum doz uygulanan

grup ile amitriptilin 30 gün maksimum doz uygulanan grup arasında MDA seviyesinde artış olduğu ve bu artışın amitriplinin 30 gün ve maksimum doz uygulanan grupta olduğu belirlenmiştir (#: p<0,05; One-Way ANOVA). Ayrıca amitriptilinin minimum ve maksimum doz uygulanan gruplarında 4 ve 30 günlük süreler arasında, anlamlı bir şekilde 30 günlük uygulama sonrasında MDA seviyesinin artış gösterdiği görülmüştür (#: p<0,05; One-Way ANOVA).

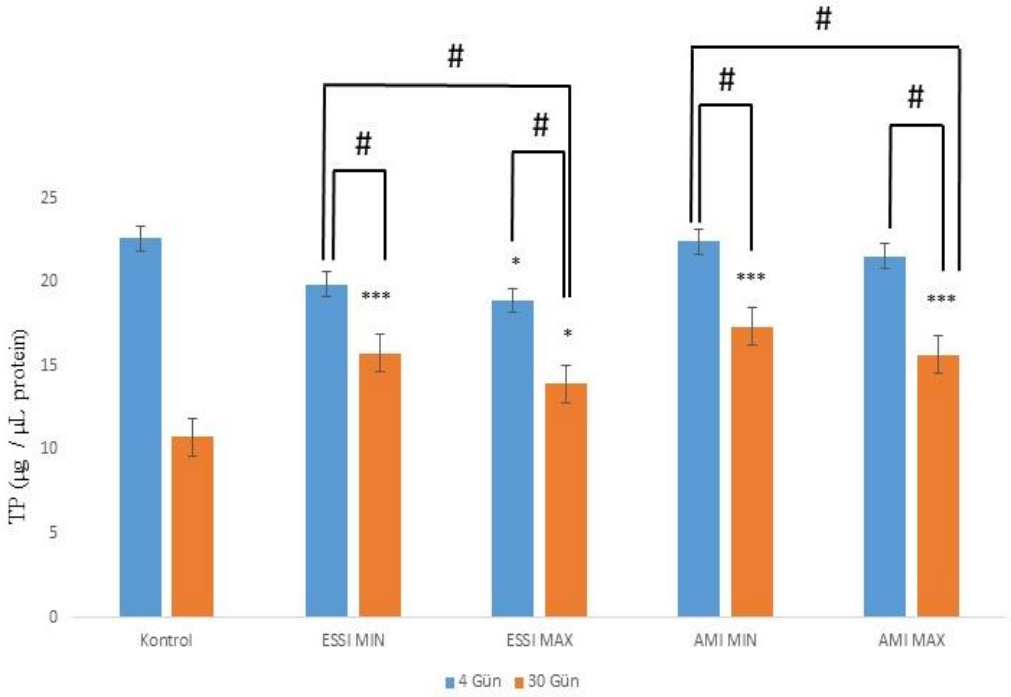


Şekil 3.8. Essitalopram ve amitriptilin etken maddelerinin 4 ve 30 günlük uygulama sonrası zebra balığı karaciğer dokularında MDA seviyesi, [ESSI MIN; 1,2 µg/L, ESSI MAX; 2,4 µg/L, AMI MIN; 1,2 µg/L ve AMI MAX; 8,64 µg/L], (*: p<0,05; **: p<0,01; ***: p<0,001; kontrol ve maruziyetin gerçekleştiği grup arasında anlamlı farkı göstermektedir. #: p< 0,05; gruplar arasında anlamlı farkı göstermektedir; One-Way ANOVA)

3.1.1.5.Dokularda total protein seviyesi

Dokularda protein tayini için bovin serum albümin kullanılarak hesaplamaları yapılmıştır. Çalışmada, zebra balığına (*Danio rerio*) 4 ve 30 gün boyunca farklı dozlarda minimum ve maksimum olmak üzere essitalopram ve amitriptilin etken maddeleri uygulanmıştır. 4 ve 30 günlük uygulamalar sonrasında beyin ve karaciğer dokuları disekte edilmiştir ve uygun analiz yöntemleri ile ölçümler gerçekleştirilmiştir. Toplam protein seviyesinde kontrol grubuna göre ve gruplar arası essitalopram ve amitriptilinin etken maddelerinin minimum ve maksimum dozlarının uygulanması sonrasında oksidatif stres

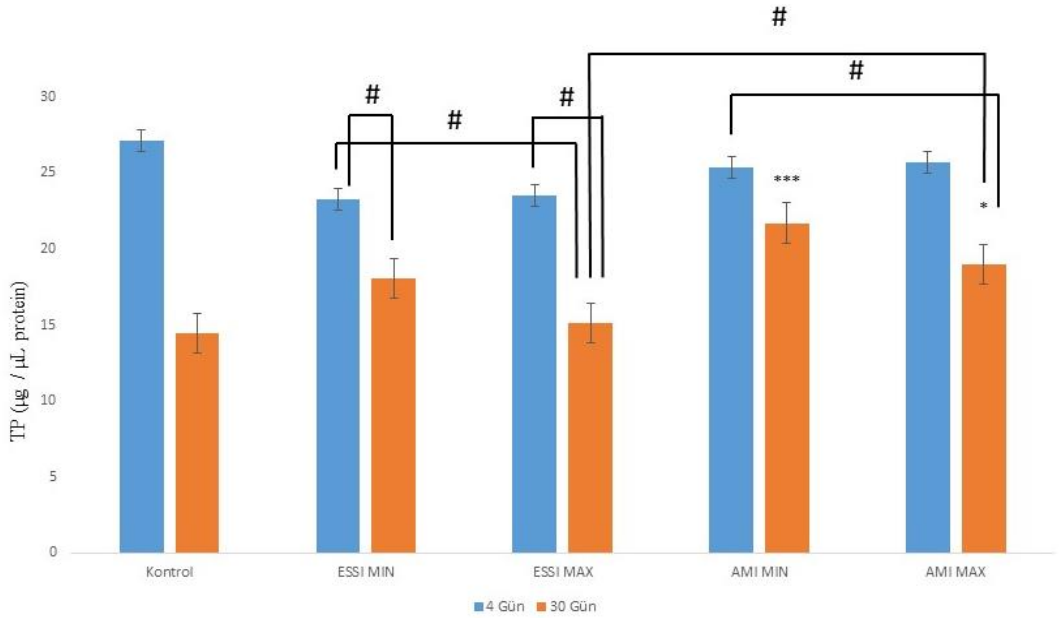
parametrelerinde yer alan değişimler Şekil 3.9 ve Şekil 3.10 'da gösterilmiştir.



Şekil 3.9. Essitalopram ve amitriptilin etken maddelerinin 4 ve 30 günlük uygulama sonrası zebra balığı beyin dokularında TP seviyesi, [ESSI MIN; 1,2 µg/L, ESSI MAX; 2,4 µg/L, AMI MIN; 1,2 µg/L ve AMI MAX; 8,64 µg/L], (*: $p<0,05$, ***: $p<0,001$ kontrol ve maruziyetin gerçekleştiği grup arasında anlamlı farkı göstermektedir. #: $p< 0,05$; gruplar arasında anlamlı farkı göstermektedir; One-Way ANOVA)

Essitalopram etken maddesinin beyin dokusunda 4 günlük minimum doz uygulanması sonrasında kontrol grubuna göre TP seviyesinde anlamlı olmayan bir azalma gerçekleşmiştir ($p>0,05$). Buna kıyasla minimum essitalopramın 30 günlük subkronik olarak nitelendirdiğimiz doz ve süre uygulanmasında istatistiksel açıdan anlamlı bir şekilde total protein seviyesinde azalma olduğu tespit edilmiştir ($p<0,001$). Aynı etken maddenin maksimum doz uygulanması sonrasında 4 ve 30 gün sonuçlarında kontrol grubuna kıyasla total protein seviyelerinde anlamlı bir azalma meydana gelmiştir ($p<0,05$). Maksimum essitalopram uygulanması 4 ve 30 günlükte yani akut ve subkronik etki açısından değerlendirildiğinde TP seviyesinde kontrol grubuna kıyasla net bir düşüş göstermektedir ($p<0,05$). Ayrıca 4 günlük essitalopram minimum doz uygulanan grup ile 30 günlük maksimum essitalopram uygulanan grup karşılaştırıldığında anlamlı bir şekilde maksimum dozun ve 30 günlük sürenin bir azalmayı meydana getirdiği belirlenmiştir (#:

p<0,05; One-Way ANOVA). Essitalopram minimum uygulanmasının 4 ve 30 gün arasında, aynı şekilde maksimum uygulanmasının 4 ve 30 gün arasında değerlendirme yapıldığında 30 günlük uygulamalarda anlamlı bir şekilde azalma olduğu görülmektedir (#: p<0,05; One-Way ANOVA). Amitriptilin etken maddesinin minimum ve maksimum 4 günlük uygulanmaları sonrasında TP seviyesinde kontrol grubuna göre bir azalma meydana gelmiştir (p>0,05). Ancak subkronik uygulama sonrasında kontrol grubu ile karşılaştırıldığında TP seviyelerinde anlamlı bir şekilde azalma olduğu tespit edilmiştir ve Şekil 3.9 'da gösterilmiştir (p<0,001). Amitriptilinin 4 ve 30 günlük minimum ve maksimum doz uygulamaları arasında anlamlı bir farklılık olduğu görülmüştür özellikle 30 günlük uygulama ile birlikte azalma olduğu istatistiksel olarak belirlenmiştir (#: p<0,05; One-Way ANOVA).



Şekil 3.10. Essitalopram ve amitriptilin etken maddelerinin 4 ve 30 günlük uygulama sonrası zebra balığı karaciğer dokularında TP seviyesi, [ESSI MIN; 1,2 µg/L, ESSI MAX; 2,4 µg/L, AMI MIN; 1,2 µg/L ve AMI MAX; 8,64 µg/L], (*: p<0,05; ***: p<0,001; kontrol ve maruziyetin gerçekleştiği grup arasında anlamlı farkı göstermektedir. #: p< 0,05; gruplar arasında anlamlı farkı göstermektedir; One-Way ANOVA)

Essitalopram etken maddesinin karaciğer dokusunda 4 günlük minimum uygulandığı doz sonrasında kontrol grubuna göre TP seviyesinde anlamlı olmayan bir azalma görülmektedir (p>0,05). Bu bulguya benzer şekilde essitalopramın maksimum doz uygulanması sonrasında da yapılan analizlerde anlamlı olmayan bir düşüş

görülmektedir (p>0,05). Essitalopramın subkronik olarak nitelendirdiğimiz 30 günlük minimum ve maksimum doz uygulanması sonrasında ise kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olmayan bir artış tespit edilmiştir ve Şekil 3.2' de gösterilmiştir (p>0,05). Essitalopram minimum ve maksimum dozlarının 4 ve 30 günlük aralarındaki karşılaştırılmasında 30 günlük uygulamalar ile birlikte TP seviyesinin azalma yönünde anlamlılık gösterdiği her iki grup içerisinde belirlenmiştir (#: p<0,05; One-Way ANOVA). Ayrıca essitalopramın 4 günlük minimum doz uygulanması ile 30 günlük maksimum doz uygulanması arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir azalma meydana gelmiştir (#: p<0,05; One-Way ANOVA). Amitriptilin minimum 30 günlük doz uygulanması sonrası karaciğer dokusundaki TP seviyesinde kontrol grubuna göre artış olduğu belirlenmiştir (p<0,001). Maksimum dozu da kontrol grubu ile karşılaştırıldığında artış göstermektedir (p<0,05). Ayrıca amitriptilin minimum 4 günlük doz uygulanması ile 30 günlük maksimum doz uygulanması arasında istatistiksel açıdan anlamlılık bulunmaktadır ve Şekil 3.10 'da gösterilmiştir (#: p<0,05; One-Way ANOVA). Essitalopram ile amitriptilinin maksimum dozlarının karşılaştırılmasında amitriptilin lehine anlamlılık görülmektedir (#: p<0,05; One-Way ANOVA).

3.1.2. Moleküler Bulgular

Zebra balığı beyin ve karaciğer dokularında c*at, ache* ve *gpx1a* genlerinin mRNA ekspresyon düzeyleri üzerine yaptığımız araştırmada, essitalopram ve amitriptilin etken maddelerinin insanlarda kullanılan günlük dozlarına göre zebra balığına uygulanması sonrasında beyin ve karaciğer dokularının diseksiyonu ile birlikte alınan örneklerden total RNA'lar ticari kit kullanılarak izole edilmiştir. İzole edilen RNA'ların saflık dereceleri NanoDrop^{TM} 2000 spektrofotometre de belirlenerek 260 ve 280 nm'de ölçümü yapılan absorbanslarının oranı (A260/A280) değerlendirilmiştir. Ölçümler yapıldıktan sonra A260/A280 değerlerinin 1.8 ve üzerinde olması yapılan izolasyonun başarılı olduğunun bir göstergesi olarak literatürde kabul edilmektedir. Beyin ve karaciğer dokularından cDNA elde etmek için gerekli RNA saflık ve konsantrasyon verileri çalışmamızda elde edilmiştir.

Bu çalışmada yapılan gen ifade analizi sonuçlarına göre örneklerin cycle threshold (Ct) değerleri tespit edilmiştir. Zebra balığının beyin ve karaciğer dokularına ait genlerinin ifade oranları Livak and Schmittgen'e ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) göre oransal hesaplama algoritması ile değerlendirilerek hesaplanmıştır. Real time PCR 'da cycle threshold-döngü eşiği değerleri bulunmaktadır. Çift zincir olan DNA zincirinin arasında floresan boya molekülü (SYBR) yayılım gösterdiğinde floresan sinyal ışıması ortaya çıkmaktadır. Belirlenmiş olan döngü sayısı üzerinden floresan ışımanın görüntülenmesi için gerekli döngü eşiği ile Ct değerleri elde edilmektedir. Hedef genin Ct değeri ile housekeeping geninin Ct değeri arasında ki fark ΔCt değeri olarak tanımlanmaktadır. Bu değer,

$$\Delta Ct = Ct \text{ hedef gen} - Ct \text{ kontrol gen}$$

olarak formüle edilmektedir. ΔΔCt değeri, deney grubunda yer alan hedef genin ΔCt 'si ile kontrol grubunun ΔCt değeri arasındaki fark olarak tanımlanmaktadır. Bu tanımda,

$$\Delta\Delta CT = \Delta Ct \text{ hedef gen} - \Delta Ct \text{ kontrol gen}$$

şeklinde formüle edilmektedir. Kontrol örneği için ΔΔCt değeri sıfırdır ve her döngü esnasında cDNA miktarında (2^) üstel olarak artış göstermektedir. Bu durumda hedef genin ifadesinde $2^{-\Delta\Delta Ct}$ değeri, gen ekspresyonunda kontrol grubuna göre değişimin tespit edilmesini sağlamaktadır (Livak ve Schmittgen, 2001).

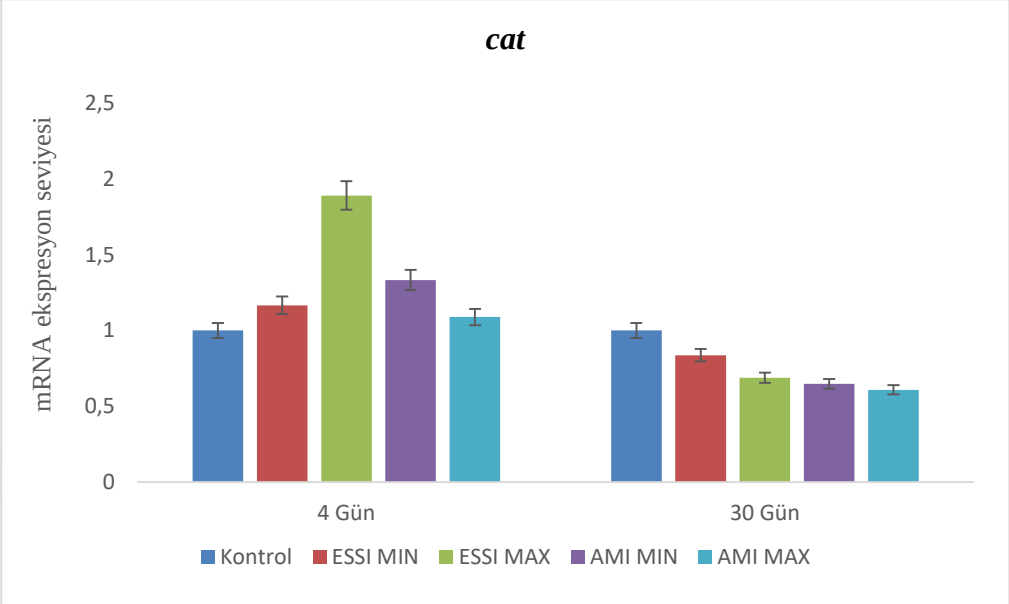
Kantitatif PCR analiz işlemlerinde *Actb2* geni referans gen olarak kullanılmıştır. Referans gene göre beyin ve karaciğer dokularında c*at, ache* ve *gpx1a* genlerinin mRNA ekspresyon seviyeleri hesaplanarak Tablo 3.3. ve Tablo 3.4.'de kontrol grubuna göre karşılaştırılması verilmiştir.

Tablo 3.3. 4. ve 30. Gün sonunda *cat, ache* ve *gpx1a* 'nın zebra balığının beyin dokularında mRNA ekspresyon seviyeleri

Gruplar (Dozlar)	***cat***	***Ache***	***gpx1a***
Kontrol	1,00	1,00	1,00
Grup 1 (ESSI MIN) (1,2 µg/L)	1,16±0,17	1,29±0,40	1,65±0,42
Grup 2 (ESSI MAX) (2,4 µg/L)	1,89±0,48	1,37±0,51	1,61±0,28
Grup 3 (AMI MIN) (1,2 µg/L)	1,33±0,31	1,22±0,49	1,07±0,26
Grup 4 (AMI MAX) (8,64 µg/L)	1,08±0,21	0,87±0,27	1,64±0,40
Kontrol	1,00	1,00	1,00
Grup 5 (ESSI MIN) (1,2 µg/L)	0,83±0,14	0,57±0,11	0,89± 0,28
Grup 6 (ESSI MAX) (2,4 µg/L)	0,68±0,19	0,57±0,19	1,02± 0,30
Grup 7 (AMI MIN) (1,2 µg/L)	0,64±0,18	0,69±0,16	0,93± 0,16
Grup 8 (AMI MAX) (8,64 µg/L)	0,60±0,17	0,56±0,08	0,95± 0,19

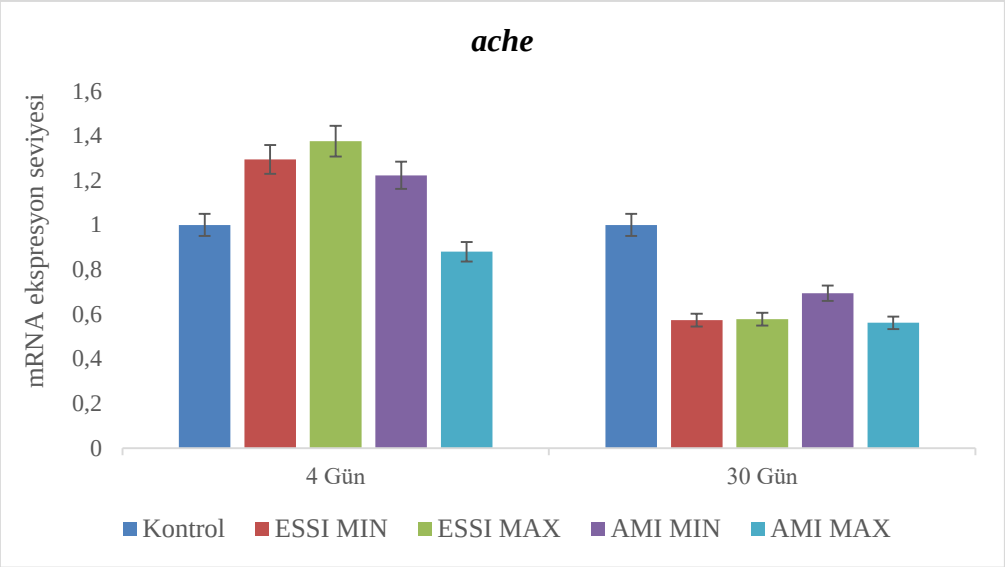
Çalışmamızda elde edilen sonuçlara göre, *cat* mRNA gen ekspresyon düzeyi beyin dokusunda 4 günlük essitalopram ve amitriptilin etken maddelerinin uygulanmasından sonra kontrol grubuna göre artış göstermektedir ($p>0,05$). 30 günlük subkronik uygulamadan sonra ise kontrol grubuna göre düşüşün olduğu tespit edilmiştir. Sonuçlar Tablo 3.3'de verilmiştir. Ayrıca Şekil 3.12 'de grafikler gösterilmiştir. Bu sonuçlar içerisinde essitalopramın 4 günlük maksimum dozunun uygulanması sonrasında *cat* mRNA gen ekspresyon düzeyinde kontrol grubuna kıyasla 1,89 katlık istatistiksel açıdan anlamlı olmayan bir artış olduğu görülmüştür ($p>0,05$). Etken maddelerin subkronik olarak nitelendirdiğimiz 30 günlük doz uygulanması sonuçlarında, amitriptilinin 30 günlük maksimum seviyede uygulanan dozu sonrasında hesaplanan 0,60

katlık azalma ile birlikte, *cat* mRNA gen ekspresyon düzeyinde azalma olduğu tespit edilmiştir (p>0,05) ve Şekil 3.11' de gösterilmiştir.



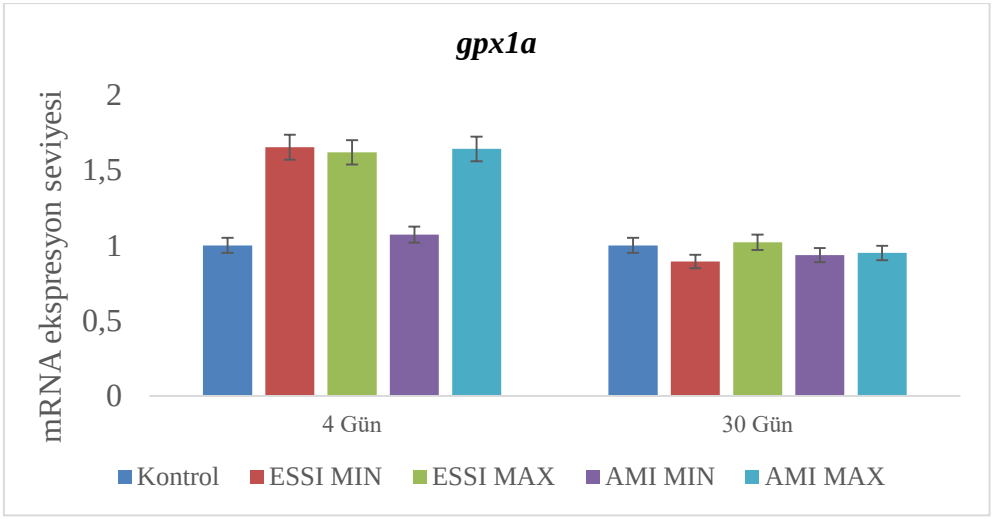
Şekil 3.11. *cat'ın* beyin dokusundan $2^{-\Delta\Delta CT}$ formülü ile elde edilen verilerinin grafiği [ESSI MIN; 1,2 µg/L, ESSI MAX; 2,4 µg/L, AMI MIN; 1,2 µg/L ve AMI MAX; 8,64 µg/L]

ache mRNA gen ekspresyon düzeyi beyin dokusunda 4 günlük essitalopram ve amitriptilin etken maddelerinin uygulanmasından sonra, kontrol grubuna göre essitalopramın minimum/maksimum dozlarında ve amitriptilinin minimum dozunda artış göstermektedir ancak amitriptilin maksimum doz uygulamasından sonra anlamlı olmayan 0,87 katlık bir düşüş olduğu tespit edilmiştir (p>0,05). Etken maddelerin subkronik olarak nitelendirdiğimiz 30 günlük doz uygulanma sonuçlarında ise, kontrol grubuna göre doz uygulanan tüm gruplarda mRNA ekspresyon düzeylerinde bir azalma olduğu tespit edilmiştir (p>0,05) ve Şekil 3.12 'de *ache* mRNA gen ekspresyon düzeyi gösterilmiştir.



Şekil 3.12. *ache*'nin beyin dokusundan $2^{-\Delta\Delta CT}$ formülü ile elde edilen verilerinin grafiği [ESSI MIN; 1,2 µg/L, ESSI MAX; 2,4 µg/L, AMI MIN; 1,2 µg/L ve AMI MAX; 8,64 µg/L]

gpx1a mRNA gen ekspresyon düzeyi beyin dokusunda 4 günlük essitalopram ve amitriptilin etken maddelerinin uygulanmasından sonra, kontrol grubuna göre karşılaştırıldığında tüm gruplarda istatistiksel olarak anlamlı olmayan bir artış gösterdiği tespit edilmiştir ($p>0,05$). 30 günlük uygulamada ise kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir değişimin olmadığı tespit edilmiştir ($p>0,05$) ve Şekil 3.13 'de *gpx1a* mRNA gen ekspresyon düzeyi gösterilmiştir.

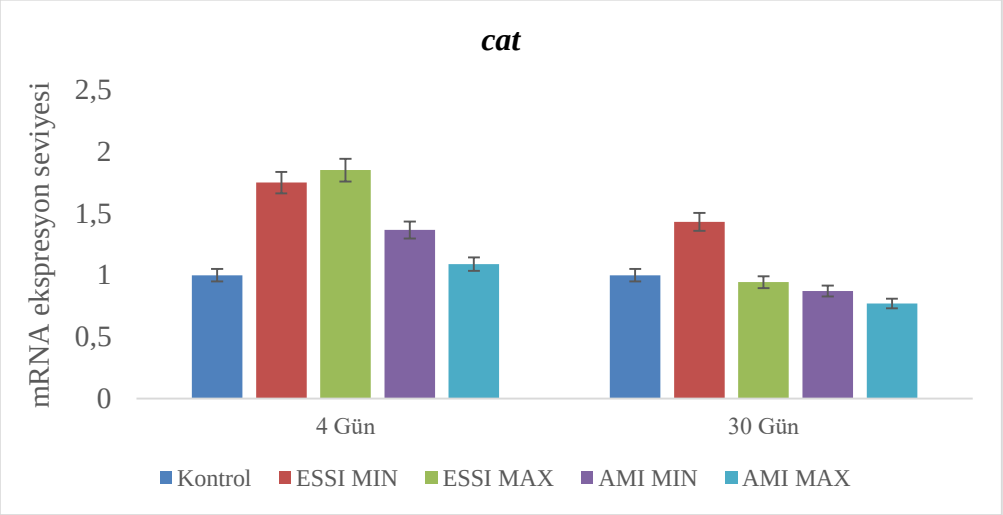


Şekil 3.13. g*px1a*'nın beyin dokusundan $2^{-\Delta\Delta CT}$ formülü ile elde edilen verilerinin grafiği [ESSI MIN; 1,2 µg/L, ESSI MAX; 2,4 µg/L, AMI MIN; 1,2 µg/L ve AMI MAX; 8,64 µg/L]

Tablo 3.4. 4. ve 30. Gün sonunda *cat*, *ache* ve *gpx1a* 'nın zebra balığının karaciğer dokularında mRNA ekspresyon seviyeleri (*: p<0,05; kontrol ve maruziyetin gerçekleştiği grup arasında anlamlı farkı göstermektedir.)

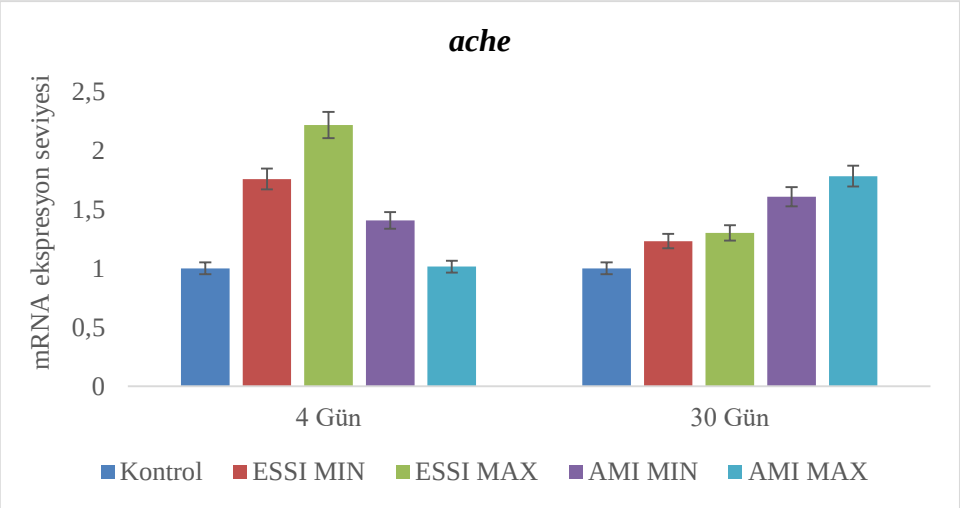
Gruplar (Dozlar)	***cat***	***Ache***	***gpx1a***
Kontrol	1,00	1,00	1,00
Grup 1 (ESSI MIN) (1,2 µg/L)	1,75±0,54	1,75±0,49	1,60±0,40
Grup 2 (ESSI MAX) (2,4 µg/L)	1,85±0,90	2,21±0,89	0,97±0,40
Grup 3 (AMI MIN) (1,2 µg/L)	1,36±0,47	1,40±1,01	1,00±0,46
Grup 4 (AMI MAX) (8,64 µg/L)	1,09±0,44	1,01±0,22	1,30±0,45
Kontrol	1,00	1,00	1,00
Grup 5 (ESSI MIN) (1,2 µg/L)	1,43± 0,63	1,23± 0,51	2,00± 0,82
Grup 6 (ESSI MAX) (2,4 µg/L)	0,94± 0,22	1,29± 0,31	1,28± 0,46
Grup 7 (AMI MIN) (1,2 µg/L)	0,87± 0,26	1,60± 0,53	2,54± 0,97
Grup 8 (AMI MAX) (8,64 µg/L)	0,77± 0,14	1,78± 0,58	3,63± 0,90*

Çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlara göre, *cat* mRNA gen ekspresyon düzeyinde karaciğer dokusunda 4 günlük essitalopram ve amitriptilin etken maddelerinin uygulanmasından sonra kontrol grubuna göre bir artış olduğu tespit edilmiştir (p>0,05). Özellikle essitalopramın 4 günlük minimum/maksimum doz uygulanmasından sonra kontrol grubuna göre sırasıyla 1,75 ve 1,85 katlık *cat* mRNA ekspresyon seviyesinde bir artış olduğu belirlenmiştir (p>0,05). Etken maddelerin 30 günlük subkronik olarak nitelendirdiğimiz doz uygulanmasından sonra, kontrol grubuna göre sadece essitalopramın minimum seviyesinde bir artış gözlenirken, amitriptilinin minimum ve maksimum doz uygulanmasında kontrol grubuna kıyasla mRNA ekspresyon seviyelerinde anlamlı olmayan bir azalmanın olduğu tespit edilmiştir (p>0,05) ve Şekil 3.15 'de gösterilmiştir. Amitriptilin etken maddesinin maksimum seviyede ve 30 gün süresince uygulanması sonucunda anlamlı olmasa da kontrol grubuna göre 0,77 katlık bir düşüş göstermesinin, antioksidan sistemin karaciğer dokusunda oksidatif stresin etkisi ile birlikte baskılandığını düşündürmektedir.



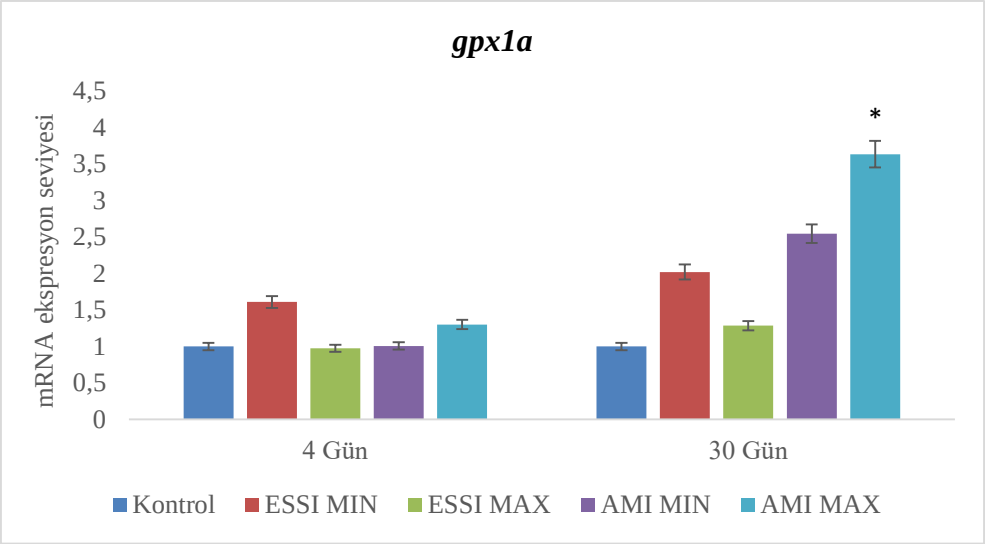
Şekil 3.14. *cat'ın* karaciğer dokusundan $2^{-\Delta\Delta CT}$ formülü ile elde edilen verilerinin grafiği [ESSI MIN; 1,2 µg/L, ESSI MAX; 2,4 µg/L, AMI MIN; 1,2 µg/L ve AMI MAX; 8,64 µg/L]

ache mRNA gen ekspresyon düzeyinde karaciğer dokusunda 4 günlük essitalopram ve amitriptilin etken maddelerinin minimum/maksimum seviyede dozlarının uygulanmasından sonra kontrol grubuna göre bir artış olduğu tespit edilmiştir ($p>0,05$). Özellikle essitalopram minimum/maksimum doz uygulanmasından sonra kontrol grubuna göre anlamlı olmayacak şekilde 1,75 ve 2,21 katlık mRNA ekspresyon seviyelerinde bir artış olduğu gözlenmiştir ($p>0,05$). Bu durum antioksidan savunmanın çalıştığının bir göstergesi olduğunu düşündürmektedir. Etken maddelerin 30 günlük subkronik olarak nitelendirdiğimiz dozlarının uygulanmasından sonra ise, hem essitalopram hem de amitriptilin uygulanmasında minimum ve maksimum seviyelerde kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olmayan bir artış olduğu görülmektedir ($p>0,05$) ve sonuçlar Şekil 3.16 'de gösterilmiştir.



Şekil 3.15. *ache'nin* karaciğer dokusundan $2^{-\Delta\Delta CT}$ formülü ile elde edilen verilerinin grafiği [ESSI MIN; 1,2 µg/L, ESSI MAX; 2,4 µg/L, AMI MIN; 1,2 µg/L ve AMI MAX; 8,64 µg/L]

gpx1a mRNA gen ekspresyon düzeyinde karaciğer dokusunda 4 günlük essitalopram ve amitriptilin etken maddelerinin dozlarının uygulanmasından sonra kontrol grubuna göre, essitalopram minimum ve amitriptilin maksimum doz uygulamasından sonra anlamlı olmayan bir artış gösterdiği tespit edilmiştir ($p>0,05$). Etken maddelerinin 30 günlük doz uygulanması sonrasında ise tüm gruplarda kontrol grubuna göre artış gözlenmiştir. Özellikle amitriptilinin maksimum doz uygulandığı grupta istatistiksel açıdan anlamlı bir şekilde kontrol grubuna kıyasla 3,63 katlık bir yükselme olduğu görülmüştür ($p<0,05$). Oksidatif strese karşı antioksidan üretimi artırmak ve savunma oluşturmak için *gpx1a* geninde mRNA ekspresyon seviyesinde artış olduğu düşünülmektedir. Ayrıca, her ne kadar istatistiksel açıdan anlamlı olmasa da amitriptilinin minimum 30 günlük doz uygulanması sonrasında da karaciğer dokusunda *gpx1a* mRNA ekspresyon seviyesinde bir artış olduğu da görülmektedir ($p>0,05$). Bu artışta benzer şekilde antioksidan üretimi artırmak ve savunma sistemini aktif tutulmasına destek olarak yorumlanabilmektedir. Tüm sonuçlar Tablo 3.4'de verilmiştir. Ayrıca Şekil 3.17 'de grafikler gösterilmiştir.



Şekil 3.16. *gpx1a'nın* karaciğer dokusundan $2^{-\Delta\Delta CT}$ formülü ile elde edilen verilerinin grafiği [ESSI MIN; 1,2 µg/L, ESSI MAX; 2,4 µg/L, AMI MIN; 1,2 µg/L ve AMI MAX; 8,64 µg/L] (*: $p<0,05$; kontrol ve maruziyetin gerçekleştiği grup arasında anlamlı farkı göstermektedir.)

3.2. Tartışma

Antioksidan savunma sistemi, reaktif oksijen türlerinin zararlı etkilerine karşı savunmada büyük bir öneme sahiptir. Antioksidanlar, hücre ve dokuları oksidatif stres sonucu meydana gelen yıkımlara karşı koruma görevini yerine getirmektedirler. Oksidatif stresin ortaya çıkmasında organizmada var olan ve ihtiyaç olan serbest radikallerin oluşması ve aynı zamanda yok edilmesi arasındaki dengenin bozulması durumunda organizma oksidatif strese maruz kalmış olmaktadır (Luis ve ark., 2006). Oksidan etki gösteren serbest radikallerin artması veya buna karşın antioksidanların azalması sonucunda hücrelerin metabolik faaliyetlerinde bozulma ve hasarlar meydana gelebilmektedir. Bunun sonucunda da doku ve organlarda ciddi hasarlar görülebilmektedir (Valko ve ark., 2007).

Bu tez çalışmasında dengenin bozulmasının belirteçleri olan oksidatif stres parametreleri çeşitli yöntemler ile analiz edilmiştir. Çalışmada, sıklıkla tercih edilen antidepresan ilaçların etken maddelerinden olan essitalopram ve amitriptilinin insanlarda kullanılan günlük dozlarının, 4 ve 30 gün süresince zebra balığına uygulanmasının ardından, balığın beyin ve karaciğer dokularında oksidatif stres parametreleri biyokimyasal yöntemlerle değerlendirilmiştir. Ayrıca moleküler yöntemler kullanılarak,

cat, ache ve *gpx1a* gen bölgelerinin mRNA ekspresyon seviyeleri de belirlenmiştir.

Seçici serotonin geri alım inhibitör (SSGİ) grubunda ki antidepresanlardan olan essitalopram, serotonin geri alımını bloke ederek serotonin düzeyini yükseltir ve özellikle depresif ve kaygı bozukluklarını içeren çoğu ruhsal ve fiziksel hastalıkların tedavisi amacıyla kullanılmaktadır (Harmancı, 2020). Literatürde, klinikte sık tercih edilen seçici serotonin geri alım inhibitör grubuna dâhil maddeler ve bu maddelerin oksidatif stres ile ilişkisini gösteren çalışmalar incelendiğinde çeşitli sonuçların elde edildiği gözlenmektedir. Örneğin, Bilici ve arkadaşları tarafından 2001 yılında yapılan bir çalışmada; sağlıklı kontrollerle karşılaştırıldığında Majör Depresif Bozukluğu olan hastalarda plazma MDA ve GR düzeyleri ile eritrosit MDA, GPx ve SOD düzeylerinin arttığı; eritrosit GR ve CAT, plazma GPx, kolesterol ve Trigliserit (TG) düzeylerinin benzer olduğu saptanmıştır. Aynı olgu grubuna uygulanan üç aylık SSGİ tedavisi sonucunda plazma MDA, GPx ve GR ile eritrosit MDA ve SOD düzeylerinin düştüğü belirlenmiştir. Ayrıca çalışmada araştırmacılar tarafından, antioksidan sistem belirteçlerinin, SSGİ etkilerinin monitörizasyonunda kullanılabilecek parametreler olabileceği ileri sürülmüş, mekanizmanın aydınlatılabilmesi için konu ile ilgili daha detaylı ve gelişmiş araştırmalara ihtiyaç duyulduğu vurgulanmıştır. (Bilici ve ark., 2001). Khanzode ve arkadaşlarının 2003 yılında yapmış oldukları farklı bir çalışmada ise SSGİ sınıfına dâhil olan fluoksetin ve sitalopramın lipid peroksidasyonu, SOD aktivitesi ve askorbik asit konsantrasyonları üzerine etkileri incelenmiştir. Çalışmanın sonuçları değerlendirildiğinde sitalopramın fluoksetin etken maddesine göre oksidatif streste büyük oranda azalmaya sebep olduğu tespit edilmiştir. Serumda artmış olan SOD, MDA seviyelerinin ve plazmada azalan askorbik asit konsantrasyonunun majör depresyon ile ilişkili olduğunu gösterdiğini rapor etmişlerdir. Sonuç olarak, sitalopram ve fluoksetin ile gerçekleştirilen tedavi biyokimyasal parametreleri tersine çevirmiştir (Khanzode ve ark., 2003). Çalışmamızda da beyin dokusunda SSGİ sınıfından olan essitalopram etken maddesinin minimum ve maksimum seviyede 4 günlük doz uygulanan gruplarında, aynı zamanda 30 günlük minimum essitalopram uygulanmasının ardından gerekli analizler gerçekleştirilmiştir ve oksidatif stres oluşumu belirlenmemiştir. Karaciğer dokusunda da benzer şekilde essitalopram etken maddesinin minimum ve maksimum seviyede 4 ve 30 günlük doz uygulanan gruplarında yapılan analizlerde lipid peroksidasyonu oluşumu görülmemektedir. 2004 yılında Atmaca, M. ve arkadaşlarının yapmış oldukları bir başka

çalışmada ise bazı psikiyatrik bozuklukların etyopatogenezinde rol oynadığı ve literatür de sosyal fobinin artmış antioksidan enzimler ve lipid peroksidasyonu ürünü olan MDA seviyeleri ile ilişkili olduğunu bildirmişlerdir. Çalışmada sosyal fobili hastalarda artmış radikal yükün, semptomların hafifletilmesiyle azaltılıp azaltılamayacağı değerlendirilmiştir. Araştırmada 39 hasta ve 39 sağlıklı kontrol yer almıştır. MDA, Süperoksit dismutaz, glutatyon peroksidaz ve katalaz enzim ölçümleri 8 haftalık sitalopram tedavisi öncesinde ve sonrasında gerçekleştirilmiştir. Çalışmanın sonuçlarında başlangıçta hasta grubunun ortalama MDA, SOD, GSH-Px ve CAT seviyeleri kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek düzeydeyken, sitalopram tedavisi sonrasında antioksidan enzimler ve MDA seviyelerinin önemli ölçüde azaldığı rapor edilmiştir (Atmaca ve ark., 2004). 2007 yılında deney hayvanları ile yapılan bir çalışmada da Wistar sıçanlarının beyin korteksinde antioksidan seviye ve lipid peroksidasyonu üzerine aripiprazol, lamotrigin ve essitalopram uygulamalarının etkileri araştırılmıştır. Bu çalışmada, kırk adet erkek wistar sıçanı rastgele 1.grup Kontrol, 2. Grup CMS (Kronik hafif stres), 3.grup CMS + aripiprazol, 4.grup CMS + lamotrigin, ve 5.grup CMS + essitalopram olmak üzere beş gruba ayrılmıştır. 28 gün boyunca ilaç uygulamaları gerçekleştirilerek sonuçlar değerlendirilmiştir. İkinci, üçüncü ve beşinci gruplarda glutatyon peroksidaz aktivitesinde kontrol grubuna kıyasla düşüş, dördüncü grupta ise artış gözlemlenmiştir. MDA seviyesinde ikinci, üçüncü ve beşinci gruplarda artış meydana gelmiştir. GSH seviyesinde ise üçüncü ve dördüncü gruplarda istatistiksel olarak anlamlı bir artış olduğu bildirilmiştir. Sonuç olarak, kronik hafif stres durumunda aripiprazol, lamotrigin ve essitalopramın faydalı bir etki gösterdiği gözlenmiştir (Eren ve ark., 2007). Başka bir çalışma ise 2010 yılında yapılmıştır ve çalışma da SSGİ grubundan essitalopramın, majör depresyonlu hastalarda tedavi öncesi ve sonrası, LPO, nitrik oksit ($NO^{\cdot}$) düzeyi ve SOD, CAT, GPx aktivitelerine olan etkisi araştırılmıştır. Çalışmanın sonucunda, sağlıklı kontrollerle kıyaslama yapıldığında majör depresyon bulunduran hastalarda tedavi öncesinde plazma SOD, CAT ve MDA düzeylerinin istatistiksel açıdan anlamlılık göstererek daha fazla olduğu, GPx düzeyleri bakımından anlamlı bir değişim bulunmadığı gözlenmiştir. 6 haftalık 20 mg/gün dozunda essitalopram tedavisinin plazmadaki SOD, CAT ve MDA düzeylerini istatistiksel açıdan anlamlılık göstererek azalttığı, GPx düzeylerinde ise herhangi bir değişime neden olmadığı rapor edilmiştir (Gümüş, 2010). 2017 yılında Kayhan ve arkadaşları zebra balıklarında (*Danio rerio*)

yaptıkları bir çalışmada, seçici serotonin geri alım inhibitörleri sınıfından olan fluoksetin-HCl' in tüm vücut ve karaciğer dokusunda katalaz (CAT) aktivitesi ve malondialdehit (MDA) seviyeleri üzerindeki bozucu etkilerini araştırmışlardır. Son grup kontrol grubu olarak planlanan çalışmada her bir akvaryum tankına 150 ng fluoksetin-HCl uygulanmıştır ve 15, 30, 60 dakika, 4 gün ve 8 gün çalışma sürdürülmüştür. Çalışmada, 15 ve 30 dk olan grupta FLX 'e maruz kaldıktan sonra karaciğer dokusunda CAT aktivitesinin arttığı belirlenmiştir. 60 dakikalık fluoksetin uygulanmasının ardından CAT aktivitesinin azaldığı, dört günlük uygulama sonrasında ise yeniden arttığı gözlenmiştir. 8 gün süresince uygulandıktan sonra CAT aktivitesinin önemli ölçüde azaldığını tespit etmişlerdir. Aynı şekilde karaciğer dokusunda fluoksetin maruziyetinden sonra tüm deney gruplarında MDA düzeylerinin de düşüş gösterdiğini bildirmişlerdir. Tüm vücudun kullanıldığı gruplarda ise fluoksetin maruziyetinden sonra ilk olarak MDA seviyelerinde bir azalma, ancak sonrasında MDA seviyelerinde kontrol grubuna göre bir artış olduğu tespit edilmiştir (Kayhan ve ark., 2017). 2019 yılında yapılan bir çalışmada SSGİ sınıfından olan fluoksetinin dünya genelinde insanlarda sık kullanıldığını ve bu kullanımından sonra yüksek ng/L konsantrasyon aralığında su ekosistemlerine yaygın olarak bulunduğunu tespit etmişlerdir (da Silva ve ark., 2011; Styrishave ve ark., 2011). Yaptıkları çalışmada, su ekosisteminde yaşayan zebra balıklarının döllenmeden 96 saat sonra (hpf) larvalarına 50 ng/L ve 500 ng/L FLX konsantrasyonunun etkilerini değerlendirmek ve stres-anksiyete (*oxtl, prl2, npy, and ucn3l*), oksidatif stres (*sod1, sod2, cat, gpxa, and gst*) ve ana nörotransmitterlerin taşıyıcılarını kodlayan (*slc6a3, slc6a4a, slc6a4b, slc6a11*) genlerini araştırmayı amaçlamışlardır. Çalışmanın sonuçlarında SSGİ sınıfından olan fluoksetin maruziyetinin zebra balığı larvalarının yüzme davranışlarını değiştirdiğini ve bu değişimin oksidatif stres enzimlerinden *sod1, cat* ve *gpxa* genlerinin ekspresyonlarının artışı ile ilişkili olduğunu belirlemişlerdir. Bu sonuçlara ek olarak, FLX maruziyetinin *oxtl, slc6a4a, slc6a4b* ve *slc6a11* gen ekspresyonunu modüle ederek anksiyete ve nörotransmitter ile ilişkili genleri de etkileyebileceğini bildirmişlerdir (Parolini ve ark., 2019).

Antidepresan ilaçların antioksidan enzimler üzerine olan etkilerinin incelendiği hem biyokimyasal hem de moleküler araştırmaların bir arada yapıldığı çalışma sayısının literatürde kısıtlı olduğu görülmüştür. Model organizma üzerinde *in vivo* olarak tasarladığımız çalışmamızda, essitalopramın zebra balığındaki beyin ve karaciğer dokularında 4 ve 30 gün süreyle minimum ve maksimum seviyede uygulanan dozlar sonrasında, kontrol grubuna göre oksidatif stres parametreleri üzerine yapılan deneysel uygulamalarda biyokimyasal analizler yapılmıştır. Buna ek olarak *cat, ache* ve *gpx1a* genlerinin mRNA ekspresyon seviyeleri de beyin ve karaciğer dokularında araştırılmıştır.

Çalışmamızda zebra balığına 4 gün boyunca minimum essitalopram dozu uygulandıktan sonra beyin dokusunda; CAT, AChE ve MDA seviyelerinde artış gözlenmiştir ancak istatistiksel açıdan kontrol grubuna kıyasla istatistiksel açıdan anlamlı bir farklılık göstermediği belirlenmiştir ($p>0,05$). TP seviyesinde kontrol grubu ile karşılaştırıldığında düşüş meydana gelmiştir ($p>0,05$). GSH seviyesinde ise kontrol grubu ile kıyaslandığında istatistiksel açıdan anlamlı bir azalmanın meydana geldiği belirlenmiştir ($p<0,01$). GSH seviyesindeki bu düşüşün, MDA artışı ile ortaya çıkabilecek olan lipid peroksidasyonuna karşı, enzimatik olmayan bir antioksidan olarak savunma oluşturabileceğini göstermektedir. Aynı zamanda enzimatik aktivite gösteren CAT aktivitesindeki artışta antioksidan savunmanın çalıştığını desteklemektedir. mRNA ekspresyon seviyesi olarak değerlendirme sonuçlarında da antioksidan savunmanın etkisi gözlenmiştir. mRNA ekspresyon seviyelerinde *cat* ekspresyonu 1.16, *ache* 1.29 ve *gpx1a* ise 1.65 kat istatistiksel açıdan anlamlı olmayan bir artış tespit edilmiştir ($p>0,05$). Diğer yandan çalışmada beyin dokusunda 4 gün boyunca maksimum essitalopram dozu uygulandığında CAT aktivitesi ve MDA seviyelerinde artış belirlenmiştir ($p>0,05$). GSH seviyesinde ise düşüş gözlenmiştir ancak istatistiksel açıdan kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir farklılık göstermediği ($p>0,05$), AChE aktivitesinde ise anlamlı bir yükselmenin meydana geldiği tespit edilmiştir ($p<0,05$). TP seviyesinde ise istatistiksel olarak anlamlı bir azalma belirlenmiştir ($p<0,05$). Essitalopramın maksimum doz uygulanmasından sonra mRNA ekspresyon seviyelerinde de *cat* ekspresyonu 1.89, *ache* 1.37 ve *gpx1a* ise 1.61 kat kontrol grubuna göre anlamlı olmayan bir artış göstermiştir. Hem biyokimyasal hem de moleküler analizlerin sonuçlarında görülen parametrelerdeki bu durum antioksidan sistemlerin aktif bir şekilde çalıştığını ve 4 günlük minimum ve

maksimum essitalopram uygulaması sonrasında beyin dokusunda antioksidan dengenin bozulmadığını ifade etmektedir.

Zebra balığına 30 gün boyunca minimum essitalopram dozunun uygulanması sonrasında beyin dokusunda; kontrol grubuna göre AChE, GSH ve MDA seviyelerinde anlamlı olmayan bir artış olduğu ($p>0,05$), CAT aktivitesinde ise anlamlı bir yükselme olduğu belirlenmiştir ($p<0,01$). Ayrıca TP seviyesinde de kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel açıdan anlamlı bir artış olduğu belirlenmiştir ($p<0,001$). mRNA ekspresyon seviyelerinde 30 günlük doz uygulaması sonrasında *cat* ekspresyonu 0.83, *ache* 0.57 ve *gpx1a* ise 0.89 kat istatistiksel olarak anlamlı olmayan bir azalma görülmüştür ($p>0,05$). Bu durum antioksidan savunmanın etkilenmediğini ve aktif bir şekilde çalışmaya devam ettiğini göstermektedir. Maksimum essitalopram dozunun 30 gün süresince uygulanmasından sonra ise CAT aktivitesinde anlamlı bir azalma ($p<0,001$), AChE aktivitesinde anlamlı bir artış ($p<0,05$) ve MDA seviyesinde de anlamlı olmayan bir artış olduğu bulunmuştur ($p>0,05$). GSH seviyesinde de anlamlı olmayan bir artış tespit edilmiştir ($p>0,05$). TP seviyesinde ise istatistiksel olarak anlamlı bir yükselme görülmüştür ($p<0,05$). CAT ve AChE enzim aktivitelerinin mRNA ekspresyon seviyelerinde de *cat* ekspresyonunda 0.68 ve *ache* ekspresyonunda 0.57 kat azalma olduğu tespit edilirken ($p>0,05$), *gpx1a* da ise 1.02 kat olarak kontrol grubuna göre herhangi bir değişim olmadığı belirlenmiştir. mRNA ekspresyon seviyelerinin down-regüle olmasında 30 günlük maruziyet süresinin ve etken maddenin maksimum dozda uygulanmasının ekspresyonu baskılamaya yönelik bir etki gösterdiğini ve biyokimyasal sonuçlar ile birlikte değerlendirildiğinde bu durumun organizmada oksidatif stres tablosunu tetiklediği düşünülmektedir.

Karaciğer dokusu üzerine olan etkiyi görebilmek için, zebra balıklarına 4 gün boyunca minimum essitalopram dozu uygulanması sonucunda; MDA ve AChE seviyelerinde anlamlı olmayan bir artış gözlenirken ($p>0,05$), CAT ve GSH seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı olan bir artış tespit edilmiştir ($p<0,05$ ve $p<0,01$). TP seviyesi ise kontrol grubuna kıyasla anlamlı olmayan şekilde bir düşüş göstermiştir ($p>0,05$). mRNA ekspresyon seviyelerinde de bir artış olduğu görülmüştür sırasıyla *cat* 1.75, *ache* 1.75 ve *gpx1a* da 1.60 kat bir artış olduğu tespit edilmiştir ($p>0,05$). Sonuçlar özelinde bir değerlendirme yapıldığında, MDA seviyesinde belirlenen artışın lipid peroksidasyonunun bir belirteci olarak görülmesine karşın enzimatik açıdan katalaz ve

enzimatik olmayan antioksidan sistemlerden glutatyonun hem biyokimyasal hem de mRNA ekspresyonu açısından benzer şekilde kontrol grubuna kıyasla artış göstermesi sonrasında, oksidatif stresin engellendiği düşünülmektedir. Karaciğer dokusunda 4 gün süresince maksimum essitalopram uygulanmasından sonra elde edilen doku örneklerinde analizler yapılmıştır. Yapılan analizlerin sonuçları değerlendirildiğinde CAT, AChE aktivitelerinde ($p<0,01$) ve GSH, MDA seviyelerinde ($p<0,05$) istatistiksel açıdan anlamlı bir yükselme olduğu tespit edilmiştir. TP seviyesinde ise anlamlı olmayan bir azalma meydana gelmiştir ($p>0,05$). mRNA ekspresyon seviyelerinde de *gpx1a* 'da tespit edilen kontrol grubuna göre 0.97 katlık hafif bir düşüş hariç olmak üzere *cat* ve *ache* gen bölgelerinde ekspresyon seviyelerinin artışının sırasıyla *cat* 1.85 ve *ache* 2.21 kat olduğu belirlenmiştir ($p>0,05$). Kontrol grupları ile karşılaştırıldığında, hem biyokimyasal ölçümlerin hem de moleküler analizlerin sonrasında elde edilen sonuçlarda antioksidan sistemlerde belirlenen bu artışların, 4 günlük uygulama sonrasında karaciğer dokusunda oksidatif stres oluşumunun engellendiğini ve organizmadaki antioksidan sistemlerin etkisinin aktif bir şekilde devam ettiğini gösterebilmektedir. Zebra balığına 30 gün boyunca minimum essitalopram dozunun uygulanması sonrasında karaciğer dokusunda; CAT ve GSH seviyelerinde anlamlı olmayan bir artış gözlenirken ($p>0,05$), AChE aktivitesinde anlamlı bir artış tespit edilmiştir ($p<0,05$). MDA seviyesinde ise kontrol grubuna kıyasla büyük bir değişiklik tespit edilmemiştir ($p>0,05$). TP seviyesinde kontrol grubuna kıyasla anlamlı olmayan bir artış belirlenmiştir ($p>0,05$). mRNA ekspresyon seviyelerinde de *cat* ekspresyonu 1.43, *ache* 1.23 ve *gpx1a* ise 2.0 kat kontrol grubuna göre artış göstermiştir. Karaciğer dokusunda antioksidan enzimlerin mRNA ekspresyon seviyelerinde ki bu artışın oksidatif strese karşı savunma sisteminin aktif olduğunun göstergesi olarak görev yaptığını düşündürmektedir. Aynı zamanda biyokimyasal açıdan enzimatik antioksidan sistem olan CAT aktivitesinde artışın gözlenmesi ve enzimatik olmayan glutatyon seviyesinde artış olması antioksidan savunmanın oksidatif stresin etkisinde kalmadığını göstermektedir. 30 gün süresince maksimum essitalopram dozu uygulandıktan sonra elde edilen verilerde ise CAT aktivitesi ve GSH seviyesinde anlamlı olmayan bir artış ($p>0,05$), AChE seviyesinde ise istatistiksel açıdan anlamlı bir artış gözlenmektedir ($p<0,001$). MDA seviyesinde ve TP seviyesinde ise kontrol grubuna göre anlamlı olmayan düşük seviyede bir artış tespit edilmiştir ($p>0,05$). Zebra balığının karaciğer dokusunda yer alan antioksidan sistemler oksidatif stres dolayısı ile lipid

peroksidasyonunun ortaya çıkmasının önüne geçmiştir. Benzer şekilde, mRNA ekspresyon seviyelerinde de *cat* ekspresyonu 0.94 hafif bir azalma, *ache* 1.29 ve *gpx1a* da ise 1.28 kat artış gösterdiği tespit edilmiştir.

Amitriptilin, depresyon tedavisinde yaygın olarak kullanılan trisiklik bir antidepresandır. Hafif ve geçici olarak serum enzim yükselmelerine neden olabilir ve klinik olarak belirgin akut kolestatik karaciğer hasarının nadir bir nedeni olarak bilinmektedir. Merkezi sinir sistemindeki sinaptik yarıklarda serotonin ve norepinefrin geri alımını inhibe ederek hareket eden trisiklik bir antidepresandır, böylece bu nörotransmiterlerin beyin seviyelerini yükselterek etkisini göstermektedir. Literatür verileri incelendiğinde, 2008 yılında yayınlanan bir araştırmada, amitriptilinin insan fibroblast primer kültüründe potansiyel sitotoksik etkileri değerlendirilmiştir. Sağlıklı kişilerden elde edilen kültürlere 50 ve 100 µM amitriptilin uygulamışlardır. Lipid peroksidasyonu ve antioksidan enzimlerden katalaz ve süperoksit dismutaz için western blot çalışılmıştır. Çalışma sonucunda amitriptilinin insan fibroblastlarında güçlü bir sitotoksik etkiye sahip olduğunu, büyüme hızını ve mitokondriyal aktiviteyi azalttığını ve oksidatif stresi arttırdığını göstermektedir (Moreno-Fernández ve ark., 2008). 2009 yılında gerçekleştirilen bir çalışmada çok sık reçete edilen antidepresan ilaçlardan olan amitriptilinin toksisitesinin mekanizmalarını aydınlatmak amaçlanmıştır. Amitriptilin tedavisinin kültürlenmiş primer insan fibroblastları ve zebra balığı embriyoları üzerindeki sitotoksik etkileri, koenzim Q(10) ve alfa-tokoferol antioksidan üzerindeki koruyucu rolünü incelemişlerdir. Çalışma sonuçlarında amitriptilin tedavisinin primer insan fibroblastlarında oksidatif stres ve mitokondriyal disfonksiyona neden olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca amitriptilin embriyo toksisitesine karşı önemli bir antioksidan koruma sağlanmasına rağmen, amitriptilinin embriyonik hücre ölümü ve apoptoz oranını önemli ölçüde arttırdığı da çalışmada tespit edilmiştir (Cordero ve ark., 2009). Literatürde amitriptilinin insan hücre kültürlerinde sitotoksik etkiye sahip olduğunu, oksidatif stresi artırdığını ve mitokondriyal aktiviteyi azalttığı bildirilmiştir. Bunun üzerine 2011 yılında yapılan çalışmada iki hafta süreyle amitriptilin ile tedavi edilen farelerin karaciğer, akciğer, böbrek, beyin, kalp, iskelet kası ve serumunda oksidatif stresin bir sonucu olan lipid peroksidasyonu ve Koenzim Q (CoQ) seviyesi değerlendirilmiştir. Tüm dokular analiz edildiğinde lipid peroksidasyonunun doza bağımlı bir şekilde arttığını tespit etmişlerdir. CoQ seviyeleri ise beyin, kalp, iskelet kası ve serumda artmış ve karaciğer ve

akciğerde tam tersine büyük ölçüde azaldığını bildirmişlerdir (Bautista-Ferrufino ve ark., 2011). 2014 yılında yapılan bir başka çalışmada ise farklı bir bakış açısından bakarak sucul kaynaklar ile zebra balıklarının embriyolarının amitriptilin ile maruziyetinin akut toksisite testleri değerlendirilmiştir. Döllenmeden 4-124 saat sonra zebra balığı (*Danio rerio*) embriyoları kullanılarak su kaynaklı amitriptilin maruziyetinin akut toksisite testi yapılmıştır ve ilk sonuçlarında, amitriptilinin, konsantrasyona bağlı bir şekilde maruz kaldıktan sonra zebra balığı embriyolarının kuluçka süresinin ve vücut uzunluğunun önemli ölçüde azaldığını tespit etmişlerdir. Ayrıca maruziyet sonucunda adrenokortikotropik hormon (ACTH) seviyesi, oksidatif stres ve antioksidan parametrelerin yanı sıra nitrik oksit (NO) üretimi ve toplam nitrik oksit sentaz (TNOS) aktivitesi de dâhil olmak üzere zebra balığı embriyolarında fizyolojik ve biyokimyasal parametrelerin koordineli bir modülasyonunun uyarıldığını ortaya koydu. Son olarak yapılan bu çalışmada, zebra balığı embriyolarında ölçülen parametreler için etkili amitriptilin konsantrasyonlarının 10 ng/L kadar düşük olduğunu göstermiştir ve bu nedenle amitriptilin ve diğer antidepresanların sucul yaşam için potansiyel riski de olduğu aynı zamanda ortaya çıkartılmıştır (Yang ve ark., 2014) Farmasötiklerin yüzey suyunda düşük konsantrasyonlarda oluşmasına rağmen, yine de sucul biyota üzerinde olumsuz etkilere sahip olabilirler, çünkü bu maddeler düşük konsantrasyonlarda bile belirli bir etki tarzına sahip olacak şekilde tasarlanmıştır. Bu nedenle, 2017 yılında yapılan bir başka çalışmada, sazanın (*Cyprinus carpio*) erken yaşam aşamalarında seçilen trisiklik antidepresanlara (amitriptilin, nortriptilin ve klomipramin ve bunların karışımına) subkronik maruziyetin etkisinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Her biri 30 gün süren sazanlarda iki embriyo-larva toksisite testi gerçekleştirilmiştir. Deney için, üç trisiklik antidepresan ve bunların karışımları üç farklı konsantrasyonda test edilmiştir (10, 100 ve 500 μg / L). Testin sonunda, histopatolojik inceleme ve ayrıca antioksidan ve biyotransformasyon enzim aktivitesi ile lipid peroksidasyonu ve protein karbonilasyonunun belirlenmesi için ek örnekler alınmıştır. Uzun süreli maruz kalma, ölüm, gelişimsel gerilik, morfolojik anomaliler ve beyin, kalp ve kraniyal ve kaudal böbrekte patolojik değişikliklerde önemli bir artışa neden olduğu tespit edilmiştir. Ek olarak, test edilen en düşük konsantrasyonlarda bile antioksidan enzim aktivitesindeki değişiklikler ve lipid peroksidasyonunda artış gözlendiği rapor edilmiştir. Bu nedenle, çevreyle ilgili TCA konsantrasyonlarının balıkların yaşamlarının özellikle erken

aşamalarında zararlı etkilere neden olma potansiyeli olduğunu bildirmişlerdir (Sehonova ve ark., 2017). 2018 yılında yayınlanan bir başka araştırmada amitriptilin de dahil olmak üzere antidepresanların farmakolojik araştırmaları için hızla umut verici bir model organizma olarak kullanılan zebra balığı (*Danio rerio*) tercih edilmiştir. Zebra balığında serotonin ve norepinefrin geri alımını inhibe eden, yaygın olarak kullanılan bir trisiklik antidepresan olan amitriptilin etken maddesi kullanılmıştır. Yapılan araştırmada 10 ve 50 µg/L amitriptiline kronik 2 hafta maruz kalmanın zebra balığı davranışı ve monoamin nörotransmiterler üzerindeki etkileri incelenmiştir. Diğer TCA'lar gibi amitriptilinin de serotonin döngüsünü azalttığını, ancak aynı zamanda tüm beyin norepinefrin ve dopamin seviyelerini önemli ölçüde yükselttiğini tespit etmişlerdir. Ayrıca, katekolamin biyosentezinin hız sınırlayıcı bir enzimi tirozin hidroksilazın yüksek beyin ekspresyonunu, fakat dopamin metabolizmasının enzimleri olan dopamin-β-hidroksilaz ve monoamin oksidazın değişmemiş ekspresyonlarının olduğunu belirlemişlerdir. Tüm bulgusal süreçlerdeki yanıtlar değerlendirildiğinde, dopamin ve norepinefrin nörotransmisyonu üzerindeki kronik amitriptilin etkisinin olduğunu tespit etmişlerdir ve zebra balıklarında kaygı ile ilgili davranışın düzenlenmesinde monoamin modülasyonunun önemli rolünü doğrulamışlardır (Meshalkina ve ark., 2018). Antidepresan ilaçlarının reçetelenmesinin yaygınlaştığı görülmektedir ve aynı zamanda bu ilaçların cinsel işlevleri de etkilediği bilinmektedir. Bu sebeple 2018 yılında yapılan bir çalışmada amitriptilin ve venlafaksinin sperm parametreleri üzerindeki etkilerinin değerlendirilmesi ve BALB/fare spermatozoasında MDA ve 1, 1-Difenil-2-pikril-hidrazil değerlerinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Kırk yetişkin erkek BALB/c fare beş gruba ayrılarak grup I (kontrol) damıtılmış su; grup II amitriptilin (4 mg / kg); grup III amitriptilin (4 mg / kg) + C vitamini (10 mg / kg); grup IV venlafaksin (2 mg / kg); ve grup V, C vitamini (10 mg / kg) + venlafaksin (2 mg / kg) verilmiştir. Tüm bu ilaçlar 35 gün süreyle oral gavaj yoluyla uygulanmıştır. Uygulama sonrasında sperm parametrelerinin analizi yapıldı. Lipid peroksidasyonunu ve toplam antioksidan kapasiteyi incelemek için sırasıyla MDA ve 1, 1-Difenil-2-pikril-hidrazil ölçüldü. Amitriptilin ile tedavi edilen gruptaki ortalama sperm parametreleri diğer gruplara göre anlamlı derecede düşüktü. MDA testleri amitriptilin ve kontrol grupları arasında anlamlı bir fark gösterdi ($p = 0.007$). Çalışmanın sonuçları değerlendirildiğinde amitriptilin tüketimi sperm parametrelerinin zayıflamasına ve aynı zamanda ROS üretiminin de

artışına neden olmaktadır. Venlafaksin kullanılmasında ise sperm kalitelerinde iyileşme lipid peroksidasyonunda ise kontrol grubuna kıyasla herhangi bir farklılık gözlenmediğini ortaya çıkartmıştır (Bandegi ve ark., 2018). 2019 yılında yapılan bir başka çalışmada ise zebra balığının (*Danio rerio*) erken embriyonik gelişimi sırasında amitriptilinin antioksidan ve detoksifikasyon enzimlerinin (sitokrom P450 1A1, GST, GSH-Px, SOD ve CAT) mRNA ekspresyonu üzerindeki potansiyel etkisini değerlendirmişlerdir. Çalışmanın sonuçlarında amitriptilinin zebra balığının embriyonik gelişimi sırasında antioksidan ve detoksifikasyon enzimleri üzerinde etkisinin olduğu ancak katalaz enziminin amitriptilinden büyük oranda etkilenen bir belirteç olduğunu tespit etmişlerdir (Sehonova ve ark., 2019). Bizim çalışmamızda da benzer şekilde zebra balığına uygulanan farklı doz ve sürelerde amitriptilinin beyin ve karaciğer dokularında oksidatif stresi tetikleyebileceği görülebilmektedir.

Model organizma olan zebra balığı (*Danio rerio*) üzerinde *in vivo* olarak gerçekleştirilen çalışmamızda amitriptilin etken maddesinin zebra balığında ki beyin ve karaciğer dokularında 4 ve 30 gün süresince minimum ve maksimum seviyede uygulanan dozlar sonrasında, kontrol grubuna göre oksidatif stres parametreleri üzerine yapılan deneysel uygulamalarda biyokimyasal analizleri yapılmıştır. Buna ek olarak *cat, ache* ve *gpx1a* genlerinin mRNA ekspresyon seviyeleri de beyin ve karaciğer dokularında araştırılmıştır.

Çalışmamızda zebra balığına 4 gün boyunca minimum amitriptilin dozu uygulandıktan sonra beyin dokusunda; CAT aktivitesinde ve GSH seviyesinde kontrol grubuna göre kıyasla istatistiksel olarak anlamlı olmayan bir düşüş olduğu görülmüştür ($p>0,05$). AChE aktivitesi ve MDA seviyesinde ise anlamlı olmayan bir artış tespit edilmiştir ($p>0,05$). mRNA ekspresyon seviyelerinde de kontrol grubuna göre *cat* seviyesinin 1.33 kat, *ache* seviyesinin 1.22 kat ve *gpx1a* seviyesinin ise 1.07 kat hafif bir artış gösterdiği tespit edilmiştir ($p>0,05$). Bu tabloda MDA'nın anlamlı olmayan artışı ve oksidatif stres parametrelerinin anlamlı olmayan hafif azalma eğilimi savunma sisteminin aktif rol oynamaya devam ettiğini ve oksidatif stres tablosunun ortaya çıkmadığını gösterebilmektedir. Ek olarak, 4 günlük maksimum amitriptilin uygulamasından sonra ise CAT aktivitesinde anlamlı olmayan bir azalma ($p>0,05$) GSH 'da ise artış görülürken ($p>0,05$), AChE aktivitesi ve MDA seviyelerinde istatistiksel açıdan anlamlı bir artış olduğu belirlenmiştir ($p<0,05$). TP seviyesinde de kontrol grubuna kıyasla anlamlı

olmayan bir azalma olduğu belirlenmiştir ($p>0,05$). Dokuda artmış MDA seviyesi oksidatif stresin belirteci olarak görünmesine karşın, antioksidan savunma sistemi üyelerinden olan ortamdaki CAT enziminin aktivitesinde ve TP seviyesinde hafif bir düşüş ile GSH seviyesinde ki artış antioksidan savunmanın serbest radikal sayısını düşürmek üzere çalıştığını düşündürmektedir. Ayrıca AChE aktivitesinde ki artışta antioksidan savunma mekanizmasının aktif olduğunu ve oksidatif strese karşı savunmanın doz uygulanması sonrasında da üstün kalmaya devam ettiğini düşündürmektedir. Aynı zamanda, mRNA ekspresyon seviyelerinde benzer şekilde *cat* 1.08 kat ve *gpx1a* seviyesinin ise 1.64 kat anlamlı olmayan bir artış gösterdiği, ancak *ache* seviyesinin ise 0.87 kat istatistiksel açıdan anlamlı olmayan bir düşüş gösterdiği belirlenmiştir ($p>0,05$). Bu azalmanın, amitriptilinin maksimum doz uygulanması sonrasında *ache* gen bölgesindeki ekspresyon mekanizmasının baskılandığını gösterebilmektedir. mRNA ekspresyon sonuçları dâhil tüm sonuçlar değerlendirildiğinde oksidatif stres tablosunun oluşmadığı düşünülmektedir. Beyin dokusunda 30 gün minimum amitriptilin uygulamasından sonra yapılan ölçümde CAT aktivitesinde anlamlı bir şekilde azalma ($p<0,001$), TP seviyesinde ise artış meydana gelmiştir ($p<0,001$). AChE aktivitesi, GSH ve MDA seviyelerinde ise hafif bir yükselme olduğu tespit edilmiştir ($p>0,05$). mRNA ekspresyon seviyelerinde benzer şekilde kontrol grubuna göre *cat* seviyesinin 0.64 kat azaldığı, *ache* seviyesinin 0.69 kat azaldığı ve *gpx1a* seviyesinin ise 1.02 olarak kontrol grubuna göre hemen hemen herhangi bir değişikliğe uğramadığı belirlenmiştir ($p>0,05$). Elde edilen sonuçlar, amitriptilin etken maddesinin uzun süreli kullanımında, MDA seviyesinde kontrol grubuna göre artışın gözlenmesi, antioksidan savunma enzimlerinden birisi olan CAT enziminin aktivitesinin düşmesi ve aynı zamanda ekspresyon seviyelerinde azalmalara neden olması neticelerinde oksidatif stres oluşumunun gerçekleştiği düşünülmektedir. 30 gün boyunca maksimum amitriptilin dozu uygulanmasından sonra ise beyin dokusunda MDA seviyesinde istatistiksel olarak anlamlılık gösteren bir artış tespit edilmiştir ($p<0,001$). Bu artışa karşılık CAT aktivitesinde anlamlı bir azalma ($p<0,001$) ve GSH seviyesinde de düşüş olduğu gözlenmektedir ($p>0,05$). AChE aktivitesinde ve TP seviyesinde ise anlamlı bir artışın olduğu belirlenmiştir ($p<0,05$ ve $p<0,001$). MDA seviyesinde ki bu istatistiksel olarak anlamlı olan artış ile CAT enzim aktivitesindeki anlamlı azalmanın amitriptilin etken maddesinin maksimum seviyede beyin dokusunda oksidatif stres oluşumuna sebep

olduğunu göstermektedir. Benzer şekilde mRNA ekspresyonu sonuçları da göstermektedir ki kontrol grubuna göre *cat* seviyesinin 0.60 kat azaldığı, *ache* seviyesinin 0.56 kat azaldığı belirlenirken, *gpx1a* seviyesi ise hafif bir düşüş göstererek 0.95 olduğu tespit edilmiştir.

Karaciğer dokusunda yapılan ölçümlerde 4 gün boyunca minimum amitriptilin dozu uygulandıktan sonra kontrol grubuna kıyasla CAT aktivitesinde ve MDA seviyesinde anlamlı olmayan bir artış olduğu tespit edilmiştir ($p>0,05$). AChE aktivitesi, GSH ve TP seviyelerinde ise anlamlı olmayan bir azalma görülmüştür ($p>0,05$). mRNA ekspresyonu seviyelerinde kontrol grubuna göre *cat* seviyesinin 1.36 kat arttığı, *ache* seviyesinin 1.40 kat arttığı ve *gpx1a* seviyesinin ise herhangi bir değişme göstermediği tespit edilmiştir ($p>0,05$). Sonuçlar değerlendirildiğinde, MDA seviyesinde belirlenen artışın lipid peroksidasyonunun bir belirteci olarak düşünülmesine rağmen katalaz enziminde hem biyokimyasal hem de mRNA ekspresyonu açısından benzer şekilde kontrol grubuna kıyasla artış görülmesi sonrasında, oksidatif stresin engellendiği düşünülmektedir. 4 gün süresince maksimum amitriptilin dozu uygulandıktan sonra kontrol grubuna kıyasla MDA seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı olmayan bir artış tespit edilmiştir ($p>0,05$). Buna karşılık, kontrol grubuna göre karşılaştırdığımızda CAT aktivitesi, GSH ve TP seviyesinde ise anlamlı olmayan hafif bir düşüş, AChE aktivitesinde ise artış tespit edilmiştir ($p>0,05$). Karaciğer dokusunda maksimum amitriptilin dozunun lipid peroksidasyonunu ve dolayısıyla oksidatif stresi indüklediği düşünülmektedir. Ancak antioksidan savunmada anlamlı olmayan bu azalmanın antioksidan savunmanın çalışarak oksidatif stres oluşumuna karşı bir direnç gösterdiğini de düşündürmektedir. Bu minvalde mRNA ekspresyonu sonuçlarında da kontrol grubu ile karşılaştırma yapıldığında *cat* seviyesinin 1.09 ve *gpx1a* seviyesinin 1.30 kat artış gösterdiği, *ache* seviyesinin ise değişmediği belirlenmiştir. Bu durumda antioksidan dengenin bozulmadığı görülmektedir.

Karaciğer dokusunda yapılan ölçümlerde 30 gün boyunca minimum amitriptilin dozu uygulandıktan sonra kontrol grubuna kıyasla MDA seviyesinde anlamlı olmayan bir artış meydana gelirken ($p>0,05$), CAT aktivitesinde ise kontrol grubuna göre anlamlı olmayan bir hafif bir azalma tespit edilmiştir ($p>0,05$). TP seviyesinde de anlamlı bir yükselme belirlenirken ($p<0,001$), AChE aktivitesi ve GSH seviyelerinde hafif bir artış olduğu ölçümler sonucunda ortaya çıkmıştır ($p<0,05$). mRNA ekspresyon seviyelerinde

kontrol grubuna göre *cat* seviyesinin 0.87 kat düşüş gösterdiği, *ache* seviyesinin 1.60 kat ve *gpx1a* seviyesinin 2.54 kat arttığı tespit edilmiştir. Amitriptilin doz uygulanmasının süresindeki artışa bağlı olarak karaciğer dokusunda oksidatif stresin tetiklendiği düşünülmektedir. Ancak GSH seviyesinde anlamlı olmayan artış ve AChE aktivitesinin anlamlı artışı ve katalaz enziminde anlamlı olmayan hafif bir düşüş antioksidan savunmanın devam ettiğini ve oksidatif stres tablosunun oluşmadığını göstermektedir. Karaciğer dokusunda 30 günlük maksimum amitriptilin dozu uygulandıktan sonra kontrol grubu ile karşılaştırma yapıldığında süre ve doz miktarı da göz önüne alındığında MDA seviyesinde istatistiksel açıdan anlamlı bir artma söz konusudur ($p<0,001$). AChE aktivitesi ve TP seviyesinde ise istatistiksel açıdan anlamlı bir yükselme tespit edilmiştir ($p<0,001$ ve $p<0,05$). Ancak oksidatif stresin en önemli belirteçlerinden olan CAT aktivitesinde kontrol grubuna kıyasla düşüş olduğu ($p>0,05$), GSH seviyesinde ise anlamlı olmayan bir artış olduğu belirlenmiştir ($p>0,05$). mRNA ekspresyon seviyelerinde kontrol grubuna göre *cat* seviyesinin 0.77 kat düşüş gösterdiği, *ache* seviyesinin 1.78 kat ve *gpx1a* seviyesinin 3.63 kat arttığı tespit edilmiştir. Karaciğer dokusunda 30 günlük maksimum amitriptilin uygulanması sonucunda elde edilen bu veriler değerlendirildiğinde MDA seviyesinde ki anlamlı artış ve her ne kadar anlamlı olmasa da kontrol grubuna göre önemli bir CAT seviyesindeki azalma ile birlikte lipid peroksidasyonunun ortaya çıktığı düşünülmektedir. Benzer şekilde *cat* ekspresyonunda da düşüş gözlenmiştir ($p>0,05$). Antioksidan savunma sisteminin bu düşüşlere karşı savunma oluşturmak amacıyla *ache* ve *gpx1a* ekspresyon seviyelerinde up-regülasyon gösterdiği değerlendirilmektedir. Bizim çalışmamızda da oksidatif stres tablosunun ortaya çıkmasına rağmen, özellikle karaciğer dokusunda *gpx1a* ekspresyonunda ve GSH seviyesinde gözlemlenen bu artışın ise organizma tarafından oksidatif stresi bertaraf etmek amacıyla *gpx1a* mRNA ekspresyonunu aktifleştirdiğini düşündürmektedir (Bostancı, 2014; Yonar ve ark., 2014).

4. SONUÇLAR

Psikiyatrik hastalıkların süreçlerinde oksidatif stresinde rol oynayabileceği yapılan araştırmalarda bildirilmiştir. Bu konuyla ilgili birçok araştırma ve meta-analiz çalışmaları yapılmaktadır. Literatür verileri incelendiğinde, örneğin; antioksidan savunma sistemlerinin şizofreni de zayıfladığı (Boskovic ve ark., 2011) tarafından, bipolar bozukluk durumunda oksidatif göstergelerinin artış gösterdiği (Andreazza ve ark., 2008) tarafından ve majör depresyonda ise oksidatif stres belirteçlerinin yükseldiği buna karşın antioksidan sistemlerin ise azaldığı belirtilmektedir (Maes ve ark., 2011).

Omurgalı bir model organizma kullanılarak antidepresan ilaçların hem biyokimyasal hem de moleküler açıdan araştırıldığı *in vivo* çalışmaların az olması nedeniyle çalışmamızın bundan sonra yapılacak benzer araştırmalara ışık tutacağını düşündürmektedir. Çalışmamızda ilaç araştırmalarında son dönemlerde sıklıkla kullanılan zebra balığı (*Danio rerio*) tercih edilmiştir. Antidepresan ailesinden olan "seçici serotonin geri alım inhibitörleri" ve "trisiklik antidepresanlar" üyelerinden essitalopram ve amitriptilin etken maddeleri seçilmiştir. Zebra balıklarında 4-30 gün süreyle, bu etken maddelerin insanlarda kullanılan günlük minimum ve maksimum dozlarının uygulanması sonrasında beyin ve karaciğer dokularında oksidatif stres parametrelerine olan olası zararlı etkileri değerlendirilmiştir. Bu değerlendirme süreçlerinde biyokimyasal ve moleküler yöntemlerden faydalanılmıştır. 4-30 gün süreyle yapılan minimum ve maksimum doz uygulanması, deney gruplarının kontrol grubu ile karşılaştırılması sonucunda essitalopram ve amitriptilin etken maddelerinin farklı etkileri ortaya çıkartılmıştır. Bu karşılaştırmalar neticesinde elde edilen sonuçlar;

- Essitalopram ve amitriptilin etken maddelerinin zebra balığı (*Danio rerio*) türü balıkların beyin ve karaciğer dokularında 4 ve 30 gün süresince uygulanmasının ardından oksidatif stres parametreleri değerlendirilmiştir. Bu tez çalışmasında araştırılan parametreler sırasıyla; CAT ve AChE enzim aktiviteleri, GSH metabolizması, MDA ve TP seviyesi ve aynı zamanda *cat*, *ache* ve *gpx1a* genlerinin mRNA ekspresyon seviyeleridir.
- Elde edilen veriler ışığında, ilgili alanda çalışma planlayan araştırmacılara yol göstermek temel hedeflerimizden birisidir. Bu sebeple çalışmamızın literatüre

ve ileride yapılacak olan daha kapsamlı çalışmalara katkı sağlamasını amaçlıyoruz.

- Sonuçların değerlendirilmesiyle birlikte antidepresan etken maddelerinden özellikle trisiklik antidepresan sınıfına dâhil olan amitriptilinin, maksimum dozda ve subkronik olarak uygulanması sonucunda beyin ve karaciğer dokularında oksidatif stres parametrelerinde kontrol grubuna kıyasla özellikle katalaz aktivitesinde ciddi bir düşüş oluşturduğu gözlenmektedir. Katalaz aktivitesinde ki bu düşüşün yanı sıra lipid peroksidasyonu belirteçlerinden olan MDA seviyesinde de artışın meydana geldiği tespit edilmiştir. Bu total durum neticesinde antioksidan savunmanın dengesinin bozulduğu ve oksidatif stresin meydana geldiği değerlendirilmiştir.
- mRNA ekspresyon sonuçları değerlendirildiğinde, beyin dokusunda yüksek dozda ve subkronik olarak amitriptilin etken maddesinin uygulanması sonrasında, *cat* ve *ache* mRNA ekspresyon seviyelerinde kontrol grubuna göre anlamlı olmayan bir azalma ve *gpx1a* seviyesinde ise kontrol grubuna göre anlamlı bir değişim olmadığı tespit edilmiştir.
- Beyin dokusunda subkronik olarak minimum amitriptilin uygulanmasından sonra CAT aktivitesinde düşüşün, TP seviyesinde ise artışın olduğu belirlenmiştir. AChE aktivitesi, GSH ve MDA seviyelerinde ise hafif bir yükselme olduğu tespit edilmiştir. Amitriptilin etken maddesinin uzun süreli kullanımında, MDA seviyesinde kontrol grubuna göre artışın gözlenmesi, antioksidan savunma enzimlerinden birisi olan CAT enziminin aktivitesinin düşmesi ve aynı zamanda biyokimyasal sonuçlara ek olarak mRNA ekspresyon seviyesinde de down-regülasyonun tespit edilmesi ile birlikte oksidatif stres oluşumunun gerçekleştiği değerlendirilmiştir.
- Essitalopram etken maddesinin tüm doz ve süreleri değerlendirildiğinde, maksimum dozda ve subkronik olarak uygulanmasının ardından beyin dokusunda CAT aktivitesinde anlamlı bir azalma, MDA ve TP seviyesinde ise anlamlı bir artış tespit edilmiştir. mRNA ekspresyon seviyelerine etkisi açısından değerlendirildiğinde ise *cat* ve *ache* seviyesinde anlamlı olmayan bir azalma belirlenmiştir. Bu tablo neticesinde oksidatif stresin tetiklendiği değerlendirilmiştir.

- SSGİ grubu ile TSA grubu antidepresanların oksidatif stres açısından değerlendirildiği bu çalışmada, TSA grubunun oksidatif stres oluşturma potansiyelinin daha fazla olduğu belirlenmiştir. Grupların etken maddeleri açısından karşılaştırılmasında amitriptilin etken maddesinin oksidatif stres oluşturma potansiyelinin essitalopramdan daha fazla olduğu değerlendirilmiştir.
- Model organizma olan zebra balığında beyin ve karaciğer dokuları açısından değerlendirme yapıldığında beyin dokusunun etken maddelerden daha fazla etkilendiği doz ve süreye bağlı olarak oksidatif stres oluşumunun karaciğere oranla daha fazla olduğu değerlendirilmiştir.
- Her iki etken maddenin de minimum dozuna kıyasla maksimum dozunun uygulanması, oksidatif stres oluşumunu daha fazla tetiklediği değerlendirilmiştir.
- Essitalopram ve amitriptilin etken maddelerin 4 ve 30 günlük (subkronik) uygulamaları arasında sürenin uzaması ile birlikte oksidatif stres parametrelerinin etkilendiği ve oksidatif stres oluşumunun daha fazla tetiklendiği değerlendirilmiştir.
- Tedavi amacıyla kullanılan bu etken maddelere sahip antidepresan ilaçların günlük reçetelerde belirtilen dozların dışına çıkmadan, hekim önerilerine uyularak kullanılması konusunda dikkat edilmesi gerekliliğinin önemi çalışmamızın sonuçlarında özellikle bildirilmektedir.
- Tedavi amacıyla kullanılan bu etken maddelerin kullanım süreleri ile ilişkili olarak hekimlerinin belirttiği sürelerin dışına çıkmadan kullanılması gerekliliğini önemle ifade ediyoruz.
- Hastalık süreçlerinin çeşitli evrelerinde kullanılan tüm antidepresan ilaçların bir hekim kontrolü ile birlikte alınmasının büyük bir öneme sahip olduğunu ve insanların kesinlikle şahsi kararları ile bu ilaçları kullanmaması gerektiğini özellikle vurgulamak ve hatırlatmak istediğimizi bildiriyoruz.

KAYNAKLAR

Abdollahi, M., A. Bahreini-Moghadam, B. Emami, F. Fooladian and K. Zafari (2003) "Increasing intracellular cAMP and cGMP inhibits cadmium-induced oxidative stress in rat submandibular saliva." Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology, 135(3), 331-336.

Adams, S. M. (2002) Biological indicators of aquatic ecosystem stress, American Fisheries Society.

Aebi, H. (1974) Catalase. Methods of enzymatic analysis, Elsevier, 673-684.

Akan, T. (2012) Organofosforlu pestisitlerin arpa bitkisi (Hordeum vulgare L.) ve zebra balığı (*Danio rerio*) üzerindeki in vitro genotoksik etkilerinin comet testi ile araştırılması. Doctoral dissertation, Yüksek Lisans Tezi, Marmara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, İstanbul.

Andreazza, A. C., M. Kauer-Sant'Anna, B. N. Frey, D. J. Bond, F. Kapczinski, L. T. Young and L. N. Yatham (2008) Oxidative stress markers in bipolar disorder: a meta-analysis. Journal of affective disorders, 111(2-3), 135-144.

Arimochi, H. and K. Morita (2006) Characterization of cytotoxic actions of tricyclic antidepressants on human HT29 colon carcinoma cells. European journal of pharmacology, 541(1-2), 17-23.

Arnold, L. M., P. E. Keck and J. A. Welge (2000) Antidepressant treatment of fibromyalgia: a meta-analysis and review. Psychosomatics, 41(2), 104-113.

Atasayar, Z. (2011) Zebra balığında (*Danio rerio*) peroksiredoksin 6 geni rs41055489 polimorfizminin antioksidatif göstergeler ve ağır metal düzeyleri ile ilişkisi. Yüksek Lisans Tezi, Marmara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, İstanbul.

Atmaca, M., E. Tezcan, M. Kuloglu, B. Ustundag and H. Tunckol (2004) Antioxidant enzyme and malondialdehyde values in social phobia before and after citalopram treatment. European Archives of Psychiatry and Clinical Neuroscience, 254(4), 231-235.

Avşaroğlu, A. B. (2009) Obez Hastalarda Diyet, Egzersiz ve Antiobezite İlaç Uygulamalarının Oksidan Stres ve Antioksidan Savunma Mekanizmaları Üzerindeki Etkileri. Doktora Tezi, Gazi Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Farmakoloji Ana Bilim Dalı, Ankara.

Avdesh, A., Chen, M., Martin-Iverson, M. T., Mondal, A., Ong, D., Rainey-Smith, S., ... & Martins, R. N. (2012) Regular care and maintenance of a zebrafish (*Danio rerio*) laboratory: an introduction. JoVE (Journal of Visualized Experiments), (69), e4196.

Azevedo, R. D., K. V. Falcão, I. P. Amaral, A. C. Leite and R. S. Bezerra (2020) Mitochondria as targets for toxicity and metabolism research using zebrafish. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects, 129634.

Bandegi, L., M. Anvari, M. Vakili, A. Khoradmehr, A. Mirjalili and A. R. Talebi (2018) Effects of antidepressants on parameters, melondiadehyde, and diphenyl-2-picryl-hydrazyl levels in mice spermatozoa. International Journal of Reproductive BioMedicine, 16(6), 365.

Barbui, C. and M. Hotopf (2001) Amitriptyline v. the rest: still the leading antidepressant after 40 years of randomised controlled trials. The British Journal of Psychiatry, 178(2), 129-144.

Bautista-Ferrufino, M. R., M. D. Cordero, J. A. Sánchez-Alcázar, M. Illanes, A. Fernández-Rodríguez, P. Navas and M. de Miguel (2011) Amitriptyline induces coenzyme Q deficiency and oxidative damage in mouse lung and liver." Toxicology letters, 204(1), 32-37.

Beutler, E. (1984) Red cell metabolism: A manual of biochemical methods, 105-106.

Bilici, M., H. Efe, M. A. Köroğlu, H. A. Uydu, M. Bekaroğlu and O. Değer (2001). Antioxidative enzyme activities and lipid peroxidation in major depression: alterations by antidepressant treatments. Journal of affective disorders, 64(1), 43-51.

Blokhina, O., E. Virolainen and K. V. Fagerstedt (2003) Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. Annals of botany, 91(2), 179-194.

Bora, E. S. (2017) Sıçanlarda, amitriptiline bağlı gelişen uzamış QT ve akut kardiyotoksisitenin, Metaprolol, MgSO4 ve Yağ Emülsüyonu uygulaması sonrası elektriksel, biyokimyasal ve histolojik olarak araştırılması Uzmanlık Tezi, Sağlık Bilimleri Üniversitesi İzmir Bozyaka Eğt. ve Arş. Hast., Acil Tıp Ana Bilim Dalı, İstanbul.

Boskovic, M., T. Vovk, B. Kores Plesnicar and I. Grabnar (2011) Oxidative stress in schizophrenia. Current neuropharmacology, 9(2), 301-312.

Bostancı, H. E. (2014) Deneysel olarak diyabet oluşturulmuş sıçanlarda vitaminlerin oksidasyona etkisi. Yüksek Lisans Tezi, Pamukkale Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, Denizli.

Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical biochemistry, 72(1-2), 248-254.

Bruslé, J. and G. G. Anadon (1996) The structure and function of fish liver. Fish morphology, 76, 545-551.

Bustin, S. A. (2000) Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. Journal of molecular endocrinology, 25(2), 169-193.

Bülbül, F., Ü. Çakır, C. Ülkü, I. Üre, O. Karabatak and G. Alpak (2013) Yineleyen ve ilk atak depresyonda çocukluk çağı ruhsal travmalarının yeri. Anadolu Psikiyatri Dergisi, 14, 93-99.

Can, H., S. K. Chanumolu, E. Gonzalez-Muñoz, S. Prukudom, H. H. Otu and J. B. Cibelli (2020) Comparative analysis of single-cell transcriptomics in human and Zebrafish oocytes. BMC genomics, 21(1), 1-15.

Carod-Artal, F. J. (2014) Tackling chronic migraine: current perspectives. Journal of pain research, 7, 185.

Chang, Y., L. Mao, L. Zhang, Y. Zhang and H. Jiang (2020) Combined toxicity of imidacloprid, acetochlor, and tebuconazole to zebrafish (*Danio rerio*): acute toxicity and hepatotoxicity assessment. Environmental Science and Pollution Research, 1-10.

Chung, H. Y., S. H. Song, H. J. Kim, Y. Ikeno and B. P. Yu (1999) Modulation of renal xanthine oxidoreductase in aging: gene expression and reactive oxygen species generation. The journal of nutrition, health & aging, 3(1), 19.

Cordero, M. D., A. M. Moreno-Fernández, J. L. Gomez-Skarmeta, M. De Miguel, J. Garrido-Maraver, M. Oropesa-Ávila, Á. Rodríguez-Hernández, P. Navas and J. A. Sánchez-Alcázar (2009) Coenzyme Q10 and alpha-tocopherol protect against amitriptyline toxicity. Toxicology and applied pharmacology, 235(3), 329-337.

Çakatay, U. and R. Kayalı (2004). Protein oksidasyonunun klinik önemi. Cerrahpaşa Tıp Dergisi, 35(3).

Çetin, M. (2008) Antipsikotikler, Antidepresanlar: Meta-Analiz Güvenirliği. Klinik Psikofarmakoloji Bulteni, 18(4).

da Silva, B. F., A. Jelic, R. López-Serna, A. A. Mozeto, M. Petrovic and D. Barceló (2011) Occurrence and distribution of pharmaceuticals in surface water, suspended solids and sediments of the Ebro river basin, Spain. Chemosphere 85(8), 1331-1339.

Dalkılıç, C., G. Ö. Dengiz, M. İ. Cengiz, Z. Kurçer and Z. N. Banoğlu (2018) Amitriptilinin Deneysel Akut ve Kronik İnflamasyon Modelleri Üzerine Etkisi. Batı Karadeniz Tıp Dergisi 2(2), 160-172.

Ding, J., H. Zou, Q. Liu, S. Zhang and R. M. Razanajatovo (2017) Bioconcentration of the antidepressant fluoxetine and its effects on the physiological and biochemical status in Daphnia magna. Ecotoxicology and environmental safety, 142, 102-109.

Dooley, K. and L. I. Zon (2000) Zebrafish: a model system for the study of human disease. Current opinion in genetics & development, 10(3), 252-256.

Draz, E. I., A. M. Emara, K. M. Saad and A. Badaway (2009) Genotoxicity of some commonly used antidepressants (fluoxetine, sertraline and clomipramine). Mansoura Journal of forensic medicine and clinical toxicology, 17(2), 63-78.

Ekingen, G. (2001) Balık Anatomisi. Mersin Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi Yayınları, Mersin. No: 1.

Ellman, G. L., K. D. Courtney, V. Andres Jr and R. M. Featherstone (1961) A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. Biochemical pharmacology, 7(2), 88-95.

Emanuelsson, B.-M., E. Widerlöv, H. Walleus and L. Paalzow (1987) Determinations of 5-hydroxyindoleacetic acid and homovanillic acid in human CSF with monitoring of probenecid levels in CSF and plasma. Psychopharmacology, 92(2), 144-149.

Eren, İ., M. Nazıroğlu and A. Demirdaş (2007) Protective effects of lamotrigine, aripiprazole and escitalopram on depression-induced oxidative stress in rat brain. Neurochemical research, 32(7), 1188-1195.

Esmer, H. E. (2019) Ultrasese maruz kalan carassius auratus (pısces: cyprınıdae) türü balıklarda davranışsal, biyokimyasal ve histolojik değişimlerin incelenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Marmara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, İstanbul.

Ezra, Y., M. Gotkine, S. Goldman, H. M. Adahan and T. Ben-Hur (2012) Hypnotic relaxation vs amitriptyline for tension-type headache: Let the patient choose. Headache: The Journal of Head and Face Pain, 52(5), 785-791.

Farghaly, H. S., R. B. Abd-Ellatief, M. Z. Moftah, M. G. Mostafa, E. M. Khedr and H. I. Kotb (2014) The effects of dexmedetomidine alone and in combination with tramadol or amitriptyline in a neuropathic pain model. Pain Physician, 17(2), 187-195.

Ferguson, H. W. (1989) Systemic pathology of Fish. A text and atlas of comparative tissue responses in diseases of teleosts. lowa State University Press.

Frazer, A. (2000) Norepinephrine involvement in antidepressant action. The Journal of clinical psychiatry, 61, 25-30.

Galer, B. S. (1995) Neuropathic pain of peripheral origin: advances in pharmacologic treatment. Neurology, 45(12 Suppl 9), S17-S25.

Girotti, A. W. (1998) Lipid hydroperoxide generation, turnover, and effector action in biological systems. Journal of lipid research, 39(8), 1529-1542.

Gomes, M. C. and S. Mostowy (2020) The case for modeling human infection in zebrafish. Trends in microbiology, 28(1), 10-18.

Griffith, O. W. (1999) Biologic and pharmacologic regulation of mammalian glutathione synthesis." Free Radical Biology and Medicine, 27(9-10), 922-935.

Gümüş, C.B. (2010) Selektif Serotonin Geri Alım İnhibitörü Grubundan Essitalopram'ın Biyokimyasal Parametreler Üzerine Etkilerinin İncelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Eczacılık Biyokimya Anabilim Dalı, Kayseri

Güneş, M. L., E. Yazici, A. B. Yazıcı, I. Ferah and E. Çadırcı (2013) Antidepresan ilaçların gastrik ülser üzerine etkileri. Dicle Tıp Dergisi, 40(4), 691-699.

Halliwell, B. and J. M. Gutteridge (2015) Free radicals in biology and medicine, Oxford University Press, USA.

Harmancı, H. (2020) Essitalopram Kullanımı ile Gelişen Bel Ağrısı: Nadir Bir Yan Etki. KTO Karatay Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi, 1(2), 17-20.

Hill, A. J., H. Teraoka, W. Heideman and R. E. Peterson (2005) Zebrafish as a model vertebrate for investigating chemical toxicity. Toxicological sciences, 86(1), 6-19.

Hınton, D. and J. Couch (1984) Pathological measures of marine pollution effects. Concepts in marine pollution measurements,(ed) H. White. University of Maryland, Sea Grant College, College Park.

Howe, K., M. D. Clark, C. F. Torroja, J. Torrance, C. Berthelot, M. Muffato, J. E. Collins, S. Humphray, K. McLaren and L. Matthews (2013) The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. Nature, 496(7446), 498-503.

https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/146570) (22.06.2021)

https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/2160) (22.06.2021

IŞIK, E. and S. Candansayar (1993) Özgül Serotonin Geri Alım Engelleyicilerinin Yan Etkileri ve İlaç Etkileşimleri. Klinik Psikofarmakoloji Bülteni, 3, 1-2.

Işık, E., U. Işık and Y. Işık Taner (2013) Çoçuk, ergen, erişkin ve yaşlılarda depresif ve bipolar bozukluklar. Ankara, Rotatıp Kitapevi.

Jakubczyk, K., K. Dec, J. Kałduńska, D. Kawczuga, J. Kochman and K. Janda (2020) Reactive oxygen species-sources, functions, oxidative damage. Polski merkuriusz lekarski: organ Polskiego Towarzystwa Lekarskiego, 48(284), 124-127.

James, S. L., D. Abate, K. H. Abate, S. M. Abay, C. Abbafati, N. Abbasi, H. Abbastabar, F. Abd-Allah, J. Abdela and A. Abdelalim (2018) Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 354 diseases and injuries for 195 countries and territories, 1990–2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. The Lancet, 392(10159), 1789-1858.

Janowsky, D., J. Davis, M. K. El-Yousef and H. J. Sekerke (1972) A cholinergic-adrenergic hypothesis of mania and depression. The Lancet 300(7778), 632-635.

Kalichak, F., R. Idalencio, J. G. S. Rosa, T. A. de Oliveira, G. Koakoski, D. Gusso, M. S. de Abreu, A. C. V. Giacomini, H. H. Barcellos and M. Fagundes (2016) Waterborne psychoactive drugs impair the initial development of Zebrafish. Environmental Toxicology and Pharmacology, 41, 89-94.

Karabulut, H. and M. Ş. Gülay (2016) Antioksidanlar. Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 1(1), 65-76.

Kayaalp, S. O. (2012) Akılcı tedavi yönünden tıbbi farmakoloji, Pelikan Yayıncılık.

Kayhan, F. E., B. Süsleyici, G. Kaymak, M. Koldemir Gündüz, Ş. Tartar, H. E. Esmer, C. Akbulut, M. Cevik and N. Yön Ertuğ (2017) The sublethal disrupting effects of fluoxetine-HCl (FLX) on catalase (CAT) activity and malondialdeyde (MDA) levels in zebrafish *Danio rerio*. Fresenius Environmental Bulletin, 26(6), 3768-3772.

Keller, J. M. and E. T. Keller (2018) The use of mature zebrafish (*Danio rerio*) as a model for human aging and disease. Conn's handbook of models for human aging, Elsevier, 351-359.

Kelly, K., C. M. Havrilla, T. C. Brady, K. H. Abramo and E. D. Levin (1998) Oxidative stress in toxicology: established mammalian and emerging piscine model systems. Environmental health perspectives, 106(7), 375-384.

Khanzode, S. D., G. N. Dakhale, S. S. Khanzode, A. Saoji and R. Palasodkar (2003) Oxidative damage and major depression: the potential antioxidant action of selective serotonin re-uptake inhibitors. Redox Report, 8(6), 365-370.

Kirby, M., S. Morris, M. Hurst, S. Kirby, P. Neall, T. Tylor and A. Fagg (2000) The use of cholinesterase activity in flounder (Platichthys flesus) muscle tissue as a biomarker of neurotoxic contamination in UK estuaries. Marine pollution bulletin, 40(9), 780-791.

Kızıl, M. and M. Çay (2010) Benzo (A) piren Uygulanan Ratlarda E Vitamini ve Selenyumun Kan ve Dokularda Lipit Peroksidasyonu ve Bazı Antioksidan Enzimler Üzerine Koruyucu Etkileri. Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Veteriner Dergisi, 24(2), 81-85.

Kodydková, J., L. Vávrová, M. Zeman, R. Jirák, J. Macášek, B. Staňková, E. Tvrzická and A. Žák (2009) Antioxidative enzymes and increased oxidative stress in depressive women. Clinical biochemistry, 42(13-14), 1368-1374.

Kumar, H., Lim, H. W., More, S. V., Kim, B. W., Koppula, S., Kim, I. S., & Choi, D. K. (2012) The role of free radicals in the aging brain and Parkinson's disease: convergence and parallelism. International journal of molecular sciences, 13(8), 10478-10504.

Larson, R. A. (1997) Naturally occurring antioxidants, CRC Press.

Ledwozyw, A., J. Michalak, A. Stepień and A. Kadziołka (1986) The relationship between plasma triglycerides, cholesterol, total lipids and lipid peroxidation products during human atherosclerosis. Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry, 155(3), 275.

Lee, S., H.-S. Chun, J. Lee, H.-J. Park, K.-T. Kim, C.-H. Kim, S. Yoon and W.-K. Kim (2018) Plausibility of the zebrafish embryos/larvae as an alternative animal model for autism: A comparison study of transcriptome changes. PloS one, 13(9), e0203543.

Li, S., A. Pozhitkov, R. A. Ryan, C. S. Manning, N. Brown-Peterson and M. Brouwer (2010) Constructing a fish metabolic network model. Genome biology, 11(11), 1-15.

Lieschke, G. J. and P. D. Currie (2007) Animal models of human disease: zebrafish swim into view. Nature Reviews Genetics, 8(5), 353-367.

Li Y, Wang K, Chen L, Zhu X, Zhou J. (2016) Quantification of mRNA levels using Real-Time Polymerase Chain Reaction (PCR). Methods Mol Biol, 1406, 73- 9.

Livak, K. J., S. Flood, J. Marmaro, W. Giusti and K. Deetz (1995) Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization. Genome Research, 4(6), 357-362.

Livak, K. J. and T. D. Schmittgen (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. methods, 25(4), 402-408.

Luberda, Z. (2005) The role of glutathione in mammalian gametes. Reprod Biol, 5(1), 5-17.

Lucki, I. and O. F. O'Leary (2004) Distinguishing roles for norepinephrine and serotonin in the behavioral effects of antidepressant drugs. The Journal of clinical psychiatry, 65, 11.

Luis, A., L. M. Sandalio, F. J. Corpas, J. M. Palma and J. B. Barroso (2006) Reactive oxygen species and reactive nitrogen species in peroxisomes. Production, scavenging, and role in cell signaling. Plant physiology, 141(2), 330-335.

Lynch, M. E. (2001) Antidepressants as analgesics: a review of randomized controlled trials. Journal of Psychiatry and Neuroscience, 26(1), 30.

Machlin, L. J. and A. Bendich (1987) Free radical tissue damage: protective role of antioxidant nutrients 1. The FASEB journal, 1(6), 441-445.

Maes, M., P. Galecki, Y. S. Chang and M. Berk (2011) A review on the oxidative and nitrosative stress (O&NS) pathways in major depression and their possible contribution to the (neuro) degenerative processes in that illness. Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry, 35(3), 676-692.

Marnett, L. J., J. N. Riggins and J. D. West (2003) Endogenous generation of reactive oxidants and electrophiles and their reactions with DNA and protein. The Journal of clinical investigation, 111(5), 583-593.

Masella, R., R. Di Benedetto, R. Varì, C. Filesi and C. Giovannini (2005) Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: involvement of glutathione and glutathione-related enzymes. The Journal of nutritional biochemistry, 16(10), 577-586.

McQuay, H., M. Tramer, B. Nye, D. Carroll, P. Wiffen and R. Moore (1996) A systematic review of antidepressants in neuropathic pain. Pain, 68(2-3), 217-227.

Meshalkina, D. A., E. V. Kysil, K. A. Antonova, K. A. Demin, T. O. Kolesnikova, S. L. Khatsko, R. R. Gainetdinov, P. A. Alekseeva and A. V. Kalueff (2018) The effects of chronic amitriptyline on zebrafish behavior and monoamine neurochemistry. Neurochemical research, 43(6), 1191-1199.

Meyers, J. R. (2018) Zebrafish: development of a vertebrate model organism. Current Protocols Essential Laboratory Techniques, 16(1), e19.

Mishra, P., Z. Gong and B. C. Kelly (2017) Assessing biological effects of fluoxetine in developing zebrafish embryos using gas chromatography-mass spectrometry based metabolomics. Chemosphere, 188, 157-167.

Mohammad-Zadeh, L., L. Moses and S. Gwaltney-Brant (2008) Serotonin: a review. Journal of veterinary pharmacology and therapeutics, 31(3), 187-199.

Moreno-Fernández, A. M., M. D. Cordero, M. De Miguel, M. Delgado-Rufino, J. A. Sánchez-Alcázar and P. Navas (2008) Cytotoxic effects of amitriptyline in human fibroblasts. Toxicology, 243(1-2), 51-58.

Nathan, C. and A. Cunningham-Bussel (2013) Beyond oxidative stress: an immunologist's guide to reactive oxygen species. Nature Reviews Immunology, 13(5), 349-361.

Nathan, C. and A. Ding (2010) SnapShot: reactive oxygen intermediates (ROI). Cell, 140(6), 951-951. e952.

Nikam, S., P. Nikam, S. Ahaley and A. V. Sontakke (2009) Oxidative stress in Parkinson's disease. Indian Journal of Clinical Biochemistry, 24(1), 98-101.

Niki, E. (2009) Lipid peroxidation: physiological levels and dual biological effects. Free Radical Biology and Medicine, 47(5), 469-484.

OECD, O. guideline for the testing of chemicals (1992) Fish, Acute Toxicity Test, (203), Available online on http://www. oecdbookshop. org/oecd/index. asp.

Onat, T., K. Emerk and E. Y. Sözmen (2002) İnsan Biyokimyası, Palme Yayıncılık, Ankara, 711s.

Ölmez, A., M. Bayir, C. Wang and A. Bayir (2015) Effects of long-term starvation and refeeding on fatty acid metabolism-relatedgene expressions in the liver of zebrafish, *Danio rerio*. Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences, 39(6), 654-660.

Ören, P. (2009) Malathion'un Oreochromis Niloticus' ta Oksidatif Stres Kaynaklı Endokrin Bozucu Etkileri. Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Ana Bilim Dalı, Adana.

Özdemir, K. (2016) Kadmiyum ve arseniğin ergin zebra balığı (*Danio rerio*, Hamilton 1822) ısı şok protein genleri üzerindeki etkisi, Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Ana Bilim Dalı, Edirne.

Özkan, A. and K. Fışkın (2004) Serbest oksijen radikalleri, karsinogenez ve antioksidant enzimler. Türk Hematoloji Onkoloji Dergisi, 14, 52-60.

Parolini, M., A. Ghilardi, B. De Felice and L. Del Giacco (2019) Environmental concentration of fluoxetine disturbs larvae behavior and increases the defense response at molecular level in zebrafish (*Danio rerio*). Environmental Science and Pollution

Research, 26(34), 34943-34952.

Raeymaekers, L. (2000) Basic principles of quantitative PCR. Molecular biotechnology, 15(2), 115-122.

Rahal, A., A. Kumar, V. Singh, B. Yadav, R. Tiwari, S. Chakraborty and K. Dhama (2014) Oxidative stress, prooxidants, and antioxidants: the interplay. BioMed, research international, 2014.

Richardson, B. J., E. Mak, S. B. De Luca-Abbott, M. Martin, K. McClellan and P. K. Lam (2008) Antioxidant responses to polycyclic aromatic hydrocarbons and organochlorine pesticides in green-lipped mussels (Perna viridis): do mussels "integrate" biomarker responses ? Marine Pollution Bulletin, 57(6-12), 503-514.

Rubinstein, A. L. (2003) Zebrafish: from disease modeling to drug discovery. Current Opinion in Drug Discovery and Development, 6(2), 218-223.

Sachdev, S. and K. J. Davies (2008) Production, detection, and adaptive responses to free radicals in exercise. Free Radical Biology and Medicine, 44(2), 215-223.

Sehonova, P., L. Plhalova, J. Blahova, V. Doubkova, P. Marsalek, M. Prokes, F. Tichy, M. Skladana, E. Fiorino and P. Mikula (2017) Effects of selected tricyclic antidepressants on early-life stages of common carp (*Cyprinus carpio*). Chemosphere, 185, 1072-1080.

Sehonova, P., A. Zikova, J. Blahova, Z. Svobodova, P. Chloupek and W. Kloas (2019) mRNA expression of antioxidant and biotransformation enzymes in zebrafish (*Danio rerio*) embryos after exposure to the tricyclic antidepressant amitriptyline. Chemosphere, 21, 516-521.

Sen, C. K. and L. Packer (2000) Thiol homeostasis and supplements in physical exercise. The American journal of clinical nutrition, 72(2), 653S-669S.

Seven, A., O. Seymen, S. Hatemi, H. Hatemi, G. Yigit and G. Candan (1995) Lipid peroxidation and vitamin E supplementation in experimental hyperthyroid state. Turkish Journal of Medical Sciences, 25, 257-260.

Spitsbergen, J. M. and M. L. Kent (2003) The state of the art of the zebrafish model for toxicology and toxicologic pathology research—advantages and current limitations. Toxicologic pathology, 31(1_suppl), 62-87.

Sreejai, R. and D. Jaya (2010) Studies on the changes in lipid peroxidation and antioxidants in fishes exposed to hydrogen sulfide. Toxicology International, 17(2), 71.

Stahl, S. (2012) Stahl'ın Temel Psikofarmakolojisi (Çev. Ed. İT Uzbay). İstanbul Tıp Kitabevi, İstanbul.

Stoyek, M. R., M. G. Jonz, F. M. Smith and R. P. Croll (2017) Distribution and chronotropic effects of serotonin in the zebrafish heart. Autonomic Neuroscience, 206, 43-50.

Styrishave, B., B. Halling-Sørensen and F. Ingerslev (2011) Environmental risk assessment of three selective serotonin reuptake inhibitors in the aquatic environment: a case study including a cocktail scenario. Environmental Toxicology and Chemistry, 30(1), 254-261.

Tarhan, G. H. (2006) Antidepresan Olarak Kullanılan Prozac ve Paxil İlaçlarının İnsan Lenfosit Kültüründeki Genotoksik Etkileri. Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi.
Tatsumi, M., K. Groshan, R. D. Blakely and E. Richelson (1997) Pharmacological profile of antidepressants and related compounds at human monoamine transporters." European journal of pharmacology, 340(2-3), 249-258.

Tok, H. (2015) Antidepresan olarak kullanılan essitalopram etken maddeli cipralex ve doxepin etken maddeli sinequan ilaçlarının insan periferal lenfositlerinde in vitro genotoksik etkileri. Yüksek Lisans Tezi, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Ana Bilim Dalı, Çanakkale.

Tufan, A. and Ç. Yücel (2008) Buzağı Koksidiozisinde Lipid Peroksidasyon Düzeyi Ve Antioksidan Enzim Aktiviteleri." Sağlık Bilimleri Dergisi, 17(3), 131-136.

Valıpour, R. (2019) Antidepresan Escitalopramın Moleküler Modellemesi, Dna Etkileşim Özellikleri, Sitotoksisitesi ve Genotoksisitesi. Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoteknoloji Ana Bilim Dalı, Adana.

Turgut, A. O., & Ağaoğlu, Ö. K. (2020) Kantitatif RT-PCR (RT-qPCR) Uygulamalarında Kullanılan RNA'ların Kalite Kontrolleri ve Önemi. Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 17(3), 334-341.

Valko, M., D. Leibfritz, J. Moncol, M. T. Cronin, M. Mazur and J. Telser (2007) Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. The international journal of biochemistry & cell biology, 39(1), 44-84.

Van der Ven, L. T., H. Holbech, M. Fenske, E.-J. Van den Brandhof, F. K. Gielis-Proper and P. W. Wester (2003) Vitellogenin expression in zebrafish *Danio rerio*: evaluation by histochemistry, immunohistochemistry, and in situ mRNA hybridisation. Aquatic toxicology, 65(1), 1-11.

Van Praag, H. M., R. S. Kahn, G. M. Asnis, S. Wetzler, S. L. Brown, A. Bleich and M. L. Korn (1987) Denosologization of biological psychiatry or the specificity of 5-HT disturbances in psychiatric disorders. Journal of Affective Disorders, 13(1), 1-8.

Vaswani, M., F. K. Linda and S. Ramesh (2003) Role of selective serotonin reuptake inhibitors in psychiatric disorders: a comprehensive review. Progress in neuro-psychopharmacology and biological psychiatry, 27(1), 85-102.

Velazquez-Moctezuma, J., P. J. Shiromani and J. C. Gillin (1990) Acetylcholine and acetylcholine receptor subtypes in REM sleep generation. Progress in brain research Elsevier, 84, 407-413.

Watson, W. A., T. L. Litovitz, G. C. Rodgers, W. Klein-Schwartz, N. Reid, J. Youniss, A. Flanagan and K. M. Wruk (2005) 2004 annual report of the American association of poison control centers toxic exposure surveillance system. The American journal of emergency medicine, 23(5), 589-666.

Weber, W. (2001) Pharmacotherapy for neuropathic pain caused by injury to the afferent nerve fibers. Nederlands tijdschrift voor geneeskunde, 145(17), 813-817.

Wellner, V. P., M. E. Anderson, R. N. Puri, G. L. Jensen and A. Meister (1984). Radioprotection by glutathione ester: transport of glutathione ester into human lymphoid cells and fibroblasts. Proceedings of the National Academy of Sciences, 81(15), 4732-4735.

Wojtovich, A. P., S. M. Nadtochiy, P. S. Brookes and K. Nehrke (2012) Ischemic preconditioning: the role of mitochondria and aging. Experimental gerontology, 47(1), 1-7.

Wulliman, M. F., Rupp, B., & Reichert, H. (2012) Neuroanatomy of the zebrafish brain: a topological atlas, Birkhäuser.

Yamada, K., M. Takayanagi, H. Kamei, T. Nagai, M. Dohniwa, K. Kobayashi, S. Yoshida, T. Ohhara, K. Takauma and T. Nabeshima (2005) Effects of memantine and donepezil on amyloid β-induced memory impairment in a delayed-matching to position task in rats." Behavioural brain research, 162(2), 191-199.

Yang, M., W. Qiu, J. Chen, J. Zhan, C. Pan, X. Lei and M. Wu (2014) Growth inhibition and coordinated physiological regulation of zebrafish (*Danio rerio*) embryos upon sublethal exposure to antidepressant amitriptyline. Aquatic toxicology, 151, 68-76.

Yonar, S. M., N. Saglam, Y. Yöntürk, A. Aytemur and A. Kosar (2014) Formaldehıt Uygulanan Gökkusagı Alabalıgı (*Oncorhynchus Mykiss*) 'nda Bazı Hematolojık ve Antıoksıdan Parametrelerın Arastırılması. Journal of FisheriesSciences. com, 8(4), 317.

Yüzbaşıoğlu, D., E. A. Yılmaz and F. Ünal (2016) Antidepresan ilaçlar ve genotoksisite. TÜBAV Bilim Dergisi, 9(1), 17-28.

Zervos, I. A., E. Nikolaidis, S. N. Lavrentiadou, M. P. Tsantarliotou, E. K. Eleftheriadou, E. P. Papapanagiotou, D. J. Fletouris, M. Georgiadis and I. A. Taitzoglou (2011) Endosulfan-induced lipid peroxidation in rat brain and its effect on t-PA and PAI-1: ameliorating effect of vitamins C and E. The Journal of toxicological sciences, 36(4), 423-433.

ÖZGEÇMİŞ

1. Adı Soyadı: Ömer Faruk KARASAKAL

2. Doğum Tarihi:

3. Unvanı: Öğretim Görevlisi

4. Öğrenim Durumu:

Derece	Alan	Üniversite	Yıl
Lisans	Biyoloji	Balıkesir Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi	2007-2011
Yüksek Lisans	Biyoloji/Biyokimya	Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü	2011-2013
Doktora	Biyoloji/Biyokimya	Marmara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü	2015-

Yüksek Lisans Tezi: "Tarımda Kullanılan Bazı Pestisitlerin *Cyprinus carpio carpio*' daki Antioksidan Enzimlere Etkisinin Değerlendirilmesi", Balıkesir, 2013.

Doktora Tezi: "Bazı Antidepresan İlaçların Zebra Balığı (*Danio rerio*)'ndaki Oksidatif Stres Parametrelerine Olan Etkilerinin Biyokimyasal ve Moleküler Yöntemler İle Değerlendirilmesi "

5. Akademik Unvanlar

Öğretim Görevlisi – T.C. Üsküdar Üniversitesi Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu, Tıbbi Laboratuvar Teknikleri (2014 - Devam)

6. Yönetilen Yüksek Lisans ve Doktora Tezleri

7. Yayınlar

7.1. Uluslararası hakemli dergilerde yayınlanan makaleler (SCI & SSCI & Arts and Humanities)

7.1.1. Akgül Ö, Kart Yaşar K, Sapmaz B, Kırkoyun Uysal H, Yıldırmak T, Şimşek F, **Karasakal ÖF**, Çalışkan R, Öner YA. İzlemdeki HIV/AIDS Olgularındaki İntestinal Parazitlerin Konvansiyonel ve Moleküler Yöntemler ile Saptanması. *Mikrobiyol Bul* 2018; 52(3): 273-283.

7.1.2. KAMAN, T., **KARASAKAL, Ö. F**., OKTAY, E. Ö., Ulucan, K., & Konuk, M. (2019). *In silico* approach to the analysis of SNPs in the human APAF1 gene. *Turkish Journal of Biology*, 43(6), 371.

7.1.3. KARASAKAL, Ö. F. , KAYHAN, F. E. , & AKGÜL, Ö., (2020). Effects of Amitriptyline on oxidative stress parameters in brain tissue of zebrafish, *Danio rerio*.. *Fresenius Environmental Bulletin*, vol.29, no.7a, 6022-6027.

7.2. Uluslararası diğer hakemli dergilerde yayınlanan makaleler

7.2.1. Fadimana Çatal, Özer Akgül, Burcu Sapmaz, Turgut Çatal, **Ömer Faruk Karasakal**, Erhan Özyurt, Özlem Koyuncu Özyurt. The Colonization and Infection Relationship in Hospitalized Patients at Intensive Care Unit. *Indian Journal of Applied Research*. 2015; 5(9): 568-570.

7.2.2. Uysal HK, Akgül Ö, Metiner K, Bayırlıoğlu Ş, Babaoğlu ÜT, Purisa S, Çetinkaya H, **Karasakal ÖF**, Öner YA. Molecular detection of endemic listeriosis and toxoplasmosis in shelter dogs in Istanbul, Turkey. *Inter J Vet Sci.* 2017;6(1):36-40.

7.2.3. KAYHAN FİGEN ESİN, Tartar Kızılkaya Şeyma, Esmer Duruel Harika Eylül, **KARASAKAL ÖMER FARUK**, Kaymak Güllü. Potential toxic effects of mancozeb on catalase (CAT) activity and lipid peroxidation (LPO) on brain tissue of zebrafish, *Danio rerio*.. *Elixir Pollution.* Cilt 114. sf 49318-49322, 2018.

7.3. Uluslararası bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitabında (Proceedings) basılan bildiriler

7.3.1. Karasakal Ö. F., Alan Ü., Diken M., E., Bozdemir K., Güngör N., Doğan S., "Effects of Some Pesticides on Catalase and Glutathione S-Transferase in Cyprinus carpio carpio", 22nd IUBMB & 37th FEBS Congress, Sevilla/İspanya, 2012.

7.3.2. Karasakal Ö.F., Doğan S., Diken M.E., Alan Ü., Doğan M. and Arslan O., " Inhibition Effect of Some Pesticides on Glutathion Reductase and Glutathion Peroxidase" , 14th EuCheMS International Conference on Chemistry and the Environment(ICCE 2013), Barcelona,İspanya, 2013.

7.3.3. Karasakal Ö.F., Doğan S., Alan Ü., Diken M.E, Kocatürk B. and Alkan, M., " Effect of Some Pesticides on Antioxidant Enzymes Obtained from Cyprinus Carpio Carpio", 14th EuCheMS International Conference on Chemistry and the Environment(ICCE 2013), Barcelona/İspanya, 2013.

7.3.4. F.E. Kayhan, **Ö.F. Karasakal**, H.E. Esmer, S. Tartar, G. Kaymak " Potential toxic effects of mancozeb on catalase (CAT) activity and lipid peroxidation (LPO) on brain tissue of zebrafish, *Danio rerio. 41st FEBS Congress 3-8 September 2016 - Ephesus / Kuşadası, Turkey*.

7.3.5. Ö. Akgül, B. Sapmaz, F. Çatal, P. Yüksel, R. Çalışkan, H. Kırkoyun Uysal, **Ö.F. Karasakal**, G. Aygün. The Complex and Alarming Resistance Status on *Clostridium difficile* in Turkey. FEMS 2017 Congress, Valencia, Spain 2017.

7.3.6. Ö. Akgül, B. Sapmaz, **Ö.F. Karasakal**, H. Kırkoyun Uysal, Y.A. Öner. Detection of Intestinal Parasites with Conventional and Molecular Methods in Follow-up HIV/AIDS Cases. FEMS 2017 Congress, Valencia, Spain 2017.

7.4. Yazılan uluslararası kitaplar veya kitaplarda bölümler

7.4.1. Pişkinpaşa, N., & Karasakal, Ö. F. (2021). Introduction to Vaccination. In *Synthetic Peptide Vaccine Models* (pp. 10-25). CRC Press.

7.5. Ulusal hakemli dergilerde yayınlanan makaleler

7.5.1. OKTAY, E. Ö., KAMAN, T., **KARASAKAL, Ö. F**., ULUCAN, K., KONUK, M., & TARHAN, N. (2019). Alzheimer Hastalığı ile İlişkilendirilen APH1A Genindeki Zararlı SNP'lerin In Silico Yöntemler ile Belirlenmesi. *Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, *23*(2), 472-480.

7.6. Ulusal bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitabında basılan bildiriler

7.6.1. Diken, M. E., Doğan, S., Alan, Ü., Bozdemir, K., **Karasakal, Ö. F.,** Güngör, N., Doğan, M., "Sideritis athoa ' da Peroksidaz Aktivitesi", Kazdağları III. Ulusal Sempozyumu, Balıkesir, 2012

7.6.2. Diken, M. E., Doğan, S., Alan, Ü., **Karasakal, Ö. F.,** Güngör, N., Doğan, M., Kara, S., "Origanum onites L.' de Peroksidazın Bazı Kinetik Özellikleri", III. Fiziksel Kimya Günleri, Balikesir, 2012

7.6.3. Özer Akgül, Burcu Sapmaz, **Ömer Faruk Karasakal**, Reyhan Çalışkan, Hayriye Kırkoyun Uysal, Taner Yıldırmak, Yaşar Ali Öner. HIV/AIDS Olgularındaki *Giardia* spp. Sıklığının Konvansiyonel ve Moleküler Yöntemler ile Saptanması. HIV/AIDS Kongresi. Antalya, Türkiye, 2017.

7.6.4. Özer Akgül, Burcu Sapmaz, **Ömer Faruk Karasakal**, Reyhan Çalışkan, Hayriye Kırkoyun Uysal, Taner Yıldırmak, Yaşar Ali Öner. HIV/AIDS Olgularının Yönetimindeki Önemsenmeyen Problem: *Blastocystis* spp. HIV/AIDS Kongresi. Antalya, Türkiye, 2017.

7.6.5. Özer Akgül, Burcu Sapmaz, **Ömer Faruk Karasakal**, Reyhan Çalışkan, Hayriye Kırkoyun Uysal, Taner Yıldırmak, Yaşar Ali Öner. HIV/AIDS Olgularındaki Fırsatçı Bir Amip Türü: *Dientamoeba* spp. HIV/AIDS Kongresi. Antalya, Türkiye, 2017.

7.6.6. Özer Akgül, Burcu Sapmaz, **Ömer Faruk Karasakal**, Reyhan Çalışkan, Hayriye Kırkoyun Uysal, Taner Yıldırmak, Yaşar Ali Öner. İstanbul'da HIV ve *Entamoeba histolytica* Birlikteliği. HIV/AIDS Kongresi. Antalya, Türkiye, 2017.

7.6.7. Özer Akgül, Burcu Sapmaz, **Ömer Faruk Karasakal**, Reyhan Çalışkan, Hayriye Kırkoyun Uysal, Taner Yıldırmak, Yaşar Ali Öner. Lokal Bir AIDS Topluluğunda *Cryptosporidium* spp. Tanısı. HIV/AIDS Kongresi. Antalya, Türkiye, 2017.

7.6.8. Özer Akgül, Burcu Sapmaz, **Ömer Faruk Karasakal**, Reyhan Çalışkan, Hayriye Kırkoyun Uysal, Taner Yıldırmak, Yaşar Ali Öner. İstanbul'daki 7

HIV/AIDS Olgusunda Miks İntestinal Paraziter İnfeksiyon. HIV/AIDS Kongresi. Antalya, Türkiye, 2017.

7.6.9. Özer Akgül, Burcu Sapmaz, **Ömer Faruk Karasakal**, Reyhan Çalışkan, Hayriye Kırkoyun Uysal, Taner Yıldırmak, Yaşar Ali Öner. 90 HIV/AIDS Olgusunun 5 İntestinal Parazit Açısından Mikroskobik ve Moleküler Tanısı. HIV/AIDS Kongresi. Antalya, Türkiye, 2017.

7.6.10. Özer Akgül, Burcu Sapmaz, **Ömer Faruk Karasakal**, Reyhan Çalışkan, Hayriye Kırkoyun Uysal, Taner Yıldırmak, Yaşar Ali Öner. İntestinal Parazit İnfeksiyonlarının HIV/AIDS Olgularındaki Kliniği. HIV/AIDS Kongresi. Antalya, Türkiye, 2017.

7.6.11. Tuğba KAMAN, **Ömer Faruk KARASAKAL**, Ebru ÖZKAN OKTAY, Korkut ULUCAN, Muhsin KONUK. Estimation Of Functional SNPs in APH1B Gene by Using Computer Based Software Tools. 29th National Biochemistry Congress, Muğla, Turkey, 2018. (SÖZLÜ SUNUM)

7.6.12. **Ömer Faruk KARASAKAL**, Ebru ÖZKAN OKTAY, Tuğba KAMAN, Korkut ULUCAN, Muhsin KONUK. *In Silico* Analysis Of Beta-Secretase Gene (BACE1) Which Plays A Role In Alzheimer's Disease. 29th National Biochemistry Congress, Muğla, Turkey, 2018. (SÖZLÜ SUNUM)

7.7. Diğer yayınlar

8. Projeler

8.1. Tarımda Kullanılan Bazı Pestisitlerin *Cyprinus carpio carpio*' daki Antioksidan Enzimlere Etkisinin Değerlendirilmesi. Araştırmacı. Balıkesir Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi. Balıkesir, 2013.

8.2. Bazı Antidepresan İlaçların Zebra Balığı (*Danio rerio*)'ndaki Oksidatif Stres Parametrelerine Olan Etkilerinin Biyokimyasal ve Moleküler Yöntemler İle Değerlendirilmesi. Araştırmacı. Marmara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi. İstanbul, 2017- devam.

9. İdari Görevler

9.1. Üsküdar Üniversitesi, Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksek Okulu, Radyoterapi Program Başkanı,2015-2017

9.2. Üsküdar Üniversitesi, Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksek Okulu, Yatay Geçiş ve Muafiyet Koordinatörü, 2017- Halen

9.3. Üsküdar Üniversitesi, Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksek Okulu, Tıbbi Laboratuvar Teknikleri Program Başkanı, 2017- Halen

9.4. Üsküdar Üniversitesi, Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksek Okulu, Müdür Yardımcısı, 2019- Halen

9.5. Üsküdar Üniversitesi, Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksek Okulu, Tıbbi Hizmetler ve Teknikler Bölüm Başkanı, 2020-Halen

9.6. Üsküdar Üniversitesi, Uzaktan Eğitim Uygulama ve Araştırma Merkezi, Müdür Yardımcısı, 2020-Halen

10. Bilimsel ve Mesleki Kuruluşlara Üyelikler

10.1. Farmakogenomik ve Bireyselleştirilmiş Tedavi Derneği (TSPPT)

11. Ödüller

12. Son iki yılda verilen dersler:

Akademik Yıl	Dönem	Dersin Adı	T	U	Öğrenci Sayısı
2019-2020	Güz	Biyokimya	2	0	82
		Temel Anatomi ve Fizyoloji	3	0	55
		Laboratuvar Güvenliği	2	0	113
		Klinik Biyokimya	3	2	75
		Temel Laboratuvar Uygulamaları – I	0	8	75
	Bahar	Biyokimya (Önlisans-Lisans)	2	0	224
		Laboratuvar Aletlerinin Kullanımı ve Bakımı	3	0	127
		Çalışma Ortamlarında Biyolojik Etkenler	2	0	98
		Tıbbi Analiz Teknikleri	2	0	30
		Tıbbi Biyoloji ve Genetiğe Giriş	2	0	131
2020-2021	Güz	Laboratuvar Güvenliği	2	0	149
		Temel Anatomi ve Fizyoloji	3	0	62
		Biyokimya	2	0	220
		Klinik Biyokimya	3	2	125
	Bahar	Biyokimya (Önlisans-Lisans)	2	0	218
		Çalışma Ortamında Biyolojik ve Kimyasal Etkenler	2	0	94
		Laboratuvar Aletlerinin Kullanımı ve Bakımı	2	0	142
		Tıbbi Biyoloji ve Genetiğe Giriş	2	0	146
		Tıbbi Analiz Teknikleri	2	0	51

13. Hakemlik Deneyimleri

13.1. Journal of Life Sciences (http://dergipark.gov.tr/tjls)

13.2. The Journal of Neurobehavioral Sciences (https://www.jnbs.org/)

13.3. Results in Physics (https://www.journals.elsevier.com/results-in-physics)

14. Kurs ve Sertifikalar

14.1. Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi'nde 3-4 Mayıs 2012 tarihinde **"Biyokimya Laboratuvar Eğitimine Çok Disiplinli Yaklaşım Çalıştayı" na Katılım Belgesi**

14.2. Balıkesir Üniversitesi tarafından 24-25-26 Mayıs 2012 tarihlerinde düzenlenen **"Kazdağları III. Ulusal Sempozyumu Katılım Belgesi"**

14.3. Balıkesir Üniversitesi Merkez Araştırma Laboratuvarı kurulumunda düzenlenen sertifika eğitimi **"LC-MS/MS Sistemi, Bileşenleri ve Temel Kullanımı Kullanım Sertifikası"**

14.4. Balıkesir Üniversitesi Merkez Araştırma Laboratuvarı kurulumunda düzenlenen sertifika eğitimi **"Shimadzu Gaz Kromotografi Kütle Spektrometre Sistemi / GCMS-QP2010 Ultra Kullanım Sertifikası"**

14.5. Balıkesir Üniversitesi Merkez Araştırma Laboratuvarı kurulumunda düzenlenen sertifika eğitimi **"UVP marka Biospectrum Jel Görüntüleme Sistemi Kullanım Sertifikası"**

14.6. T.C. Çalışma ve Sosyal Güvenlik Bakanlığı tarafından yapılan eğitim ve sınav sonrası **C Sınıfı İş Güvenliği Uzmanı,** (2013- halen)

14.7. Üsküdar Üniversitesi Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksek Okulu ve Üsküdar Üniversitesi Medikal Radyasyon Uygulama ve Araştırma Merkezi (USMERA) tarafından 2017-2018 Akademik Yılı Güz Döneminde gerçekleştirilen **"Makale Çalıştayı" na (20 Saat) Katılım Belgesi**

14.8. Üsküdar Üniversitesi tarafından, 24 Nisan 2018 tarihinde düzenlenen **"İnsan Hayatı Mesleği: İş Sağlığı ve Güvenliği Semineri" ne Katılım Belgesi**

14.9. Bahçelievler Arama Kurtarma Birliği tarafından düzenlenen **"Genel Yangın Eğitimi ve Tatbikatı" Katılım Belgesi**

14.10. İstanbul Medipol Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu (HADYEK), 01.07.2019-11.07.2019 tarihlerinde, **Deney Hayvanları Kullanım Sertifikası,** sertifikanın geçerli olduğu hayvan türleri aşağıda sıralanmıştır. Bu türler, Kemirgenler/Rodents (Fare/Mouse (*Mus musculus*), Sıçan/Rat (*Rattus norvegicus*),ve/and Tavşan/Rabbit (*Oryctalogus cuniculus*), Su hayvanları/Water animals (*Fishes* (Pisces), Sürüngenler/amfibiler (Reptiller and amphibians (Amphibia) 'dır.

14.11. TÜBİTAK 2237-B, Fen ve Mühendislik Alanında, 13-15 Mart 2020 tarihinde, **Akademik Proje Hazırlama Eğitimi'ne Katılım Belgesi**