



**T.C.  
DÜZCE ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ RUH SAĞLIĞI VE HASTALIKLARI  
ANABİLİM DALI**

**SİRKADYEN GENLERİNİN METİLYASYONU İLE ANKSİYETE  
ARASINDAKİ İLİŞKİNİN ARAŞTIRILMASI**

**TIPTA UZMANLIK TEZİ  
DR. ERKİN KERİM**

**DÜZCE-2023**



**T.C.  
DÜZCE ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ RUH SAĞLIĞI VE HASTALIKLARI  
ANABİLİM DALI**

**SİRKADYEN GENLERİNİN METİLYASYONU İLE ANKSİYETE  
ARASINDAKİ İLİŞKİNİN ARAŞTIRILMASI**

**TIPTA UZMANLIK TEZİ**

**DR. ERKİN KERİM**

**Prof. Dr. ADNAN ÖZÇETİN**

**TEZ DANIŞMANI**

**DÜZCE-2023**

## ÖNSÖZ

Tez çalışmam boyunca bana rehberlik eden ve sürekli destek sağlayan değerli hocam Prof. Dr. Adnan ÖZÇETİN'e, asistanlık eğitimim süresince bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan saygıdeğer hocalarım Prof. Dr. Ahmet ATAÖĞLU ve Prof. Dr. Numan KONUK'a,

Asistanlık sürecinde birlikte çalıştığım, tüm doktor arkadaşlarıma, psikiyatri servisindeki fedakâr hemşire ve yardımcı sağlık personeline, psikiyatri polikliniğindeki özverili sekreterlerimize,

Daima arkamda olduklarını hissettiğim ve sevgiyle destekleyen değerli aileme,

**Minnettarlığımı ifade etmek isterim**

**30.04.2023**

**Erkin KERİM**

## **Sirkadyen Genlerinin Metilasyonu ile Anksiyete Arasındaki İlişkinin Araştırılması**

### **ÖZET**

**Amaç:** CRY2 ve PER3 gen mutasyonlarının sirkadyen ritim bozuklukları ve anksiyete ile ilişkisi bilinirken, bu genlerin çevresel faktörler tarafından etkilenen DNA metilasyon durumları hakkında sınırlı bilgi bulunmaktadır. Bu çalışma, CRY2 ve PER3 genlerinin metilasyon durumları ile anksiyete arasındaki ilişkiyi aydınlatmayı amaçlamaktadır.

**Gereç ve Yöntem:** Bu çalışmada, Wistar Albino sıçanlar üzerinde 21 gün boyunca sirkadyen ritim bozukluğu protokolü (6 saat aydınlık/18 saat karanlık) ve hareketsizliği sağlayan bir kemirgen restrainer kutusu kullanıldı. Deney sonlandırıldığında, Yükseltilmiş Artı Labirent, Zorunlu Yüzme Testi ve Aydınlık-Karanlık Kutusu testleri kullanarak anksiyete ve depresyon düzeyleri değerlendirildi. Beyin dokusu örneklerinden elde edilen DNA üzerinde gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) kullanılarak CRY2 ve PER3 genlerinin metilasyon yüzdesi belirlendi.

**Bulgular:** Analizlerimiz, 21 gün boyunca sirkadyen ritim bozukluğu ve kısıtlama stresine maruz kalan sıçanlarda, kontrol grubuna göre CRY2 ve PER3 genlerinin CpG metilasyon seviyelerinde sırasıyla 1,6 ve 1,4 kat artış olduğunu göstermiştir.

**Sonuç:** Bulgularımız, CRY2 ve PER3 gen metilasyon düzeylerinin anksiyete durumlarında önemli olduğunu vurgulamaktadır. Sirkadyen ritim bozukluğu ve kısıtlanma türü stres uygulanan sıçanlarda, bu genlerin metilasyon düzeyleri kontrol grubuna göre belirgin bir şekilde artmıştır. Bu, CRY2 ve PER3 genlerinin CpG metilasyon seviyelerinin potansiyel biyolojik belirteçler olarak kullanılma olasılığını gündeme

getirmektedir.

**ANAHTAR SÖZCÜKLER:** CRY2, PER3, Anksiyete,  
Metilasyon, Sirkadyen Ritim



## **Investigation of the Relationship Between Methylation of Circadian Genes and Anxiety**

### **ABSTRACT**

**Objective:** The role of CRY2 and PER3 gene mutations in circadian rhythm disorders and anxiety is recognized, yet there's limited knowledge concerning their DNA methylation patterns influenced by environmental factors. This study aspires to shed light on the connection between the methylation status of CRY2 and PER3 genes and anxiety.

**Materials and Methods:** In this study, a circadian rhythm disorder protocol (6 hours light/18 hours dark) was applied to Wistar Albino rats for 21 days, and a rodent restrainer box was used to induce immobility. At the end of the experiment, anxiety and depression levels were evaluated using the Elevated Plus Maze, Forced Swim Test, and Light-Dark Box tests. The methylation percentage of CRY2 and PER3 genes was determined by real-time polymerase chain reaction (PCR) on DNA obtained from brain tissue samples.

**Results:** Our analyses revealed that in rats subjected to circadian rhythm disorder and restraint stress for 21 days, the CpG methylation levels of CRY2 and PER3 genes increased by 1.6 and 1.4 times, respectively, compared to the control group.

**Conclusion:** Our findings underscore the significance of the methylation levels of CRY2 and PER3 genes in anxiety conditions. In rats subjected to circadian rhythm disorder and restraint type stress, the methylation levels of these genes were markedly higher than those of the control group. This suggests the possibility of using the CpG methylation levels of CRY2 and PER3 genes as potential biomarkers.

**KEYWORDS:** CRY2, PER3, Anxiety, Methylation, Circadian Rhythm

## İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ .....	i
ÖZET .....	ii
ABSTRACT.....	iv
İÇİNDEKİLER .....	v
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
1.1. Giriş.....	1
1.2. Amaç .....	2
2. GENEL BİLGİLER .....	4
2.1. Anksiyete ve İlişkili Bozukluklar.....	4
2.1.1. Tanım ve tarihçe .....	4
2.1.2. DSM'ye göre sınıflandırma.....	6
2.1.3. Epidemiyoloji .....	7
2.1.4. Etiyoloji .....	8
2.1.5. Anksiyeteye kuramsal yaklaşım.....	14
2.1.6. Prognoz ve tedavi .....	16
2.2. Sirkadyen Sistem.....	20
2.2.1. Tanım.....	21
2.2.2. Sirkadyen sistemin nörobiyolojisi .....	21
2.2.3. Sirkadyen sistemin genetiği ve moleküler döngüsü .....	24
2.2.4. Sirkadyen sistemin psikiyatrik hastalıklarla olan ilişkisi.....	27
2.3. Epigenetik .....	29
2.3.1. Epigenetik modifikasyonlar .....	30
2.3.2. Psikiyatrik hastalıklarda epigenetik modifikasyonların rolü.....	34
2.4. Sirkadyen Genlerin Anksiyete ile İlişkisi .....	35
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	40

3.1.	Araştırma Gruplarının Oluşturulması ve Deney Hayvanlarının Bakımı .....	40
3.2.	Kullanılan Davranış Testleri .....	41
3.3.	Örneklerin Alınması ve DNA İzolasyonu.....	44
3.4.	Metilasyon Analizi.....	45
3.5.	İstatistiksel Analiz ve Sonuçların Yorumlanması.....	53
4.	BULGULAR.....	53
4.1.	Yükseltilmiş Artı Labirent Testi .....	54
4.2.	Zorunlu Yüzme Testi .....	57
4.3.	Aydınlık-Karanlık Kutusu Testi.....	57
4.4.	PER3 ve CRY2 Metilasyon Oranlarının Eş Zamanlı PZR Analizi .....	59
4.5.	Korelasyon Analizi .....	61
5.	TARTIŞMA.....	64
5.1.	Çalışmanın Kısıtlılıkları.....	70
6.	SONUÇLAR.....	72
7.	KAYNAKLAR.....	73

## **SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ**

**AKK:** Aydınlık Karanlık Kutusu

**AR:** Adenozin Reseptörü

**BDT:** Bilişsel Davranışçı Terapi

**BZ:** Benzodiazepin

**BMAL1:** Brain and Muscle ARNT-like Protein-1

**CLOCK:** Circadian Locomotor Output Cycles Kaput

**CpG:** Cytosine Phospho Guanine (Sitozin Fosfo Guanin)

**CRY:** Cryptochrome (Kriptokrom)

**DSM:** Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (Mental Bozuklukların Tanısal ve Sayımsal El Kitabı)

**DNA:** Deoksiribo Nükleik Asit

**HPA:** Hypothalamic Pituitary Adrenal (Hipotalamus Hipofiz Adrenal)

**ICD:** International Classification of Disease (Uluslararası Hastalık Sınıflandırması)

**MDB:** Major Depresif Bozukluk

**MD-EAA:** Metilasyona Duyarlı Erime Eğrisi Analizi

**mRNA:** Mesajcı Ribo Nükleik Asit

**ÖF:** Özgül Fobi

**PB:** Panik Bozukluk

**PER:** Period (Periyod)

**RNA:** Ribo Nükleik Asit

**SAB:** Sosyal Anksiyete Bozukluğu

**SCN:** Suprachiasmatic Nucleus (Suprakiazmatik Çekirdek)

**VTA:** Ventral Tegmental Alan

**YAB:** Yaygın Anksiyete Bozukluğu

**YAL:** Yükseltilmiş Artı Labirent

**ZY:** Zorunlu Yüzme

# 1. GİRİŞ VE AMAÇ

## 1.1. Giriş

Anksiyete bozuklukları gibi zihinsel sağlık sorunlarında, uyku düzensizlikleri, dikkat dağınıklığı ve işlevsellik kaybı gibi bulgular oldukça yaygın görülür (1). Peki, bu bulgular neden oluşur ve altında yatan mekanizmalar nelerdir?

Son yıllarda yapılan araştırmalar, sirkadyen ritimlerin düzensizliğinin, anksiyete bozuklukları ve depresyon gibi bir çok psikiyatrik bozukluğun önemli bir parçası olduğunu ortaya koymuştur. Ancak, bu belirtinin neden mi yoksa sonuç mu olduğu hala tam olarak anlaşılamamıştır. Bazı araştırmalar, sirkadyen genlerindeki değişikliklerin, anksiyete bozuklukları ile ilişkili olduğunu öne sürmektedir. Ancak, bu ilişkilerin altında yatan mekanizmalar henüz net olarak belirlenememiştir (2,3).

Sirkadyen ritmin bozulmasının bir belirtisi olan uyku problemleri, genellikle çoğu psikiyatrik hastalıkların erken bulguları arasında yer alır. Sirkadyen ritimlerin bozulması, anksiyete bozuklukları, depresyon, bipolar bozukluk ile yakından ilişkilidir (4). Bu durumun nedeni, sirkadyen genlerinin DNA metilasyonu ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir (5). Daha önce yapılmış araştırmaların bazıları, sirkadyen genlerdeki epigenetik modifikasyonların, psikiyatrik hastalıkların oluşumu açısından önemli bir mekanizma olabileceği konusunda kanıtlar sunmuştur (6).

Epigenetik değişiklikler DNA sekansında herhangi bir değişime yol açmayan, onun yerine gen ekspresyonunu etkileyen kalıtsal değişikliklerdir (7). Epigenetik modifikasyonlar hücrel farklılaşma, embriyonik yeniden

programlama, X- kromozomu inaktivasyonu ve gen susturulmasını içeren birçok hücrel ve gelişimsel süreçlerde önemli rol oynar (8). Beyindeki strese kaynaklanan epigenetik değişikliklerin yakın zamandaki keşfi, stresin zihinsel sağlık sorunlarını hangi mekanizmayla tetikleyebileceği konusunda bize yol göstermiştir. Özellikle, stres kaynaklı DNA metilasyonu, davranış üzerinde önemli bir etkiye sahip olabilir (9–13). Bununla birlikte, son yıllarda yapılan araştırmalar, epigenetik değişikliklerin sadece DNA'da ki CpG adacıklarının metilasyonunu ve histon modifikasyonlarını içermediğini, non-CpG metilasyonlarının da bu süreçte rol oynayabileceğini göstermektedir (14,15).

Uyku, iş ve sosyal aktivitelerimiz gibi hayatımızın önemli parçalarında yaşanan sıkıntılar, zihinsel sağlık sorunları ile sıkı bir ilişki içindedir. Sirkadyen ritimlerin düzensizliği ve bunun sonucunda oluşan epigenetik değişiklikler ruhsal sorunların gelişiminde rol oynayan sebeplerden biri olabilir. Epigenetik değişikliklerden özellikle DNA metilasyonu ve histon modifikasyonları, bu mekanizmanın anlaşılmasına yardımcı olabilir. Ancak, sirkadyen ritim ile ilişkili olan genlerin CpG ve özellikle non-CpG metilasyonları hakkında henüz yeterli araştırma yapılmamıştır.

Anksiyete bozukluklarının giderek artan sıklığı ve yaygınlığı göz önünde bulundurulduğunda, bu konudaki araştırmaların toplum ruh sağlığı açısından önemli olduğu aşikârdır

## **1.2. Amaç**

Bu çalışma, geçmişteki benzer çalışmalarda kullanılan hayvan deney modelinden yararlanarak sirkadyen ritim bozukluğu oluşturmayı ve anksiyete seviyelerini ölçmeyi

hedeflemektedir. Bu süreç sonunda, hayvanların beyin dokularından izole edilen örnekler üzerinde belirli sirkadyen genlerin CpG ve non-CpG metilasyon profillerini incelemeyi planlıyoruz. Bu genler, literatür taranarak seçilmiş olup, sirkadyen ritimle yakından ilişkili olduğu bilinmektedir. Elde edilen veriler, uygun istatistiksel yöntemler kullanılarak analiz edilecektir. Yukarıda belirtilen varsayımlar ve önceki araştırmalar ışığında, bu çalışmanın nihai amacı, sirkadyen ritimle ilişkili belirli genlerin metilasyon profillerini ve bu profillerin anksiyete ile olan potansiyel ilişkisini araştırmaktır.



## **2. GENEL BİLGİLER**

### **2.1. Anksiyete ve İlişkili Bozukluklar**

Anksiyete, uzak veya belirsiz tehditlere yanıt olarak deneyimlenen bir durumdur ve bireyin öznel durumunda, davranışında ve fizyolojisinde değişikliklerle birlikte gelir (16,17). Savunma tepkileri olarak adlandırılan bu davranışsal ve fizyolojik değişiklikler, türler arasında korunmuştur (18,19). Genel olarak, kaygı durumu ve beraberindeki davranışsal ve fizyolojik değişiklikler uyum sağlamak için önemli bir işlev görmektedir. Örneğin, çevreyi aşırı dikkatli taramak, erken tehdit tespitinin olasılığını artırır ve tehdidin yakınlığına bağlı olarak uygun savunma stratejisinin geliştirilmesi açısından organizmaya yardımcı olabilir (20,21). Ancak, aşırı, ilgisiz ve rahatsızlık verici bir şekilde deneyimlendiğinde, bu tepkiler kişiyi çevresiyle uyumsuz hale getirebilir ve bir bireyin dünyayla istenilen şekilde etkileşim kurma potansiyelini engelleyebilir. Gerçekten de, aşırı ve uygun olmayan kaygı, anksiyete bozukluklarının temel bir özelliğidir.

Anksiyete bozuklukları yaygın görülen psikiyatrik hastalıklardandır ve başlangıç dönemi genellikle çocukluk yaşlarına denk gelir. Kısmen genetik bir temele sahip olan bu hastalıklar, tedavi edilmezlerse uzun süreli engelliliğe ve kişi açısından ızdıraplı bir sürecin yaşanmasına neden olabilir.

Bu yüzden, doğru tanı ve tedavi açısından, patolojik anksiyetenin nedenleri ve belirtileri hakkında gerekli bilgilere sahip olunması son derece önemlidir.

#### **2.1.1. Tanım ve tarihçe**

DSM-V'e göre anksiyete ile korku arasındaki temel fark algılanan tehdidin zamanlamasıdır. Anksiyete, gelecekteki

potansiyel tehditlere odaklanırken, korku mevcut veya yakın tehditlere odaklanır (22). Anksiyete, evrimsel olarak, hayatta kalma içgüdüsüne katkıda bulunduğu için ve insanları tehlikeli durumlardan kaçınmaya yönlendirdiği için adaptif olarak kabul edilen doğal bir duygudur. Ancak psikiyatri alanında 20. yüzyıldan bu yana anksiyete, bir bozukluk olarak da tanınmaktadır. Günlük hayatta normal ve uyumlu olan anksiyete ile sıkıntıya neden olan patolojik anksiyete arasındaki sınır, klinik değerlendirmelerle belirlenir.

Anksiyete kelimesinin, daraltmak, sıkılaştırmak veya boğmak anlamına gelen Hint-Avrupa kökenli ‘angh’ kelimesinden türediği düşünülüyor (23). Yüzyıllar boyunca anksiyete melankolinin bir parçası olarak kabul ediliyordu. Galen, melankoliklerde görülen anksiyetenin, siyah safradan kaynaklanan koyu renkli bir buhar olduğunu ve karın bölgesindeki lokal ısınma sonucu oluştuğunu düşünüyordu. Bu buhar, beyne yükselerek korku ve zihinsel karartı oluşturuyordu (24). On dokuzuncu yüzyılda, yorgunluk, sinirlilik ve anksiyete gibi belirtilerle karakterize edilen ‘nevrazeni’ kavramı ortaya çıktı. Bu durum modern hayatın gereksinimlerinden kaynaklanan bir bozukluk olarak görülüyordu ve sinir sistemi bozukluğu olarak kabul ediliyordu. Bu hastalık, özellikle merkezi sinir sistemi, sindirim sistemi ve üreme sistemi düzeyinde, çeşitli semptomlarla kendini gösteriyordu (25,26). Yirminci yüzyılın başlarında, Sigmund Freud, çözülmemiş çatışmaların ve bilinçdışı arzuların bir sonucu olarak görülen ‘anksiyete nevrozu’ kavramını ortaya sürdü. Nevrazeni somatik bir bozukluk olarak tanımlayan Freud, anksiyete nevrozunu ise psişik kökenli olduğunu iddia ederek bu iki kavramı birbirinden ayırmaya çalıştı. Freud, anksiyete nevrozunun temel semptomu olarak da beklenti kaygısını öne sürdü (27).

### 2.1.2. DSM'ye göre sınıflandırma

Bugün bildiğimiz anksiyete bozuklukları 20. yüzyılın ortalarına kadar tanınmamış ve sınıflandırılmamıştır. Anksiyete bozuklukları kavramı ilk olarak DSM-III'te kendine yer buldu, anksiyete nevrozu, fobik nevroz ve obsesif-kompulsif nevroz, anksiyete bozuklukları başlığı altında birleştirildi. Yeni bir tanı olan travma sonrası stres bozukluğu da anksiyete bozukluklarına eklendi. Anksiyete nevrozu panik bozukluğu ve yaygın anksiyete bozukluğuna, fobik nevroz ise agorafobi, basit fobiler ve sosyal fobiye bölündü (28,29).

Güncel olan DSM-V, önceki sürümlerde olduğu gibi, anksiyete bozukluklarını tek bir kategori altında toplamadı. Bunun yerine; anksiyete, obsesif-kompulsif bozukluklar ve travma ve stresörle ilişkili bozukluklar olmak üzere üç spektruma ayırdı. Bu yeni yaklaşım, benzer nörobiyolojik, genetik ve psikolojik özellikleri paylaşan bozuklukları bir araya getirdi. Ayrıca, çocuklarda veya yetişkinlerde ortaya çıkan bozukluklar bir arada sınıflandırıldı. Obsesif-kompulsif bozukluklar, vücut dismorfik bozukluğu, biriktiricilik bozukluğu, trikotillomani ve deri yolma bozukluğu gibi tekrarlayan düşünceler veya davranışlarla karakterize olan diğer bozukluklarla bir arada toplandı. Benzer şekilde, travma ve stresörle ilişkili bozukluklar, travma sonrası stres bozukluğu ve akut stres bozukluğuna ek olarak, tepkisel bağlanma bozukluğu, sınırsız toplumsal katılım bozukluğu ve uyum bozukluklarını içerir hale getirildi. Son olarak, seçici konuşmazlık ve ayrılma kaygısı bozukluğu, önceki sürümlerdeki gibi çocukluk çağı bozuklukları kategorisi yerine, diğer anksiyete bozukluklarıyla sınıflandırıldı (22).

### 2.1.3. Epidemiyoloji

Dünya Ruh Sağlığı Anketi'ne göre, bireylerin yaklaşık dörtte birisi muhtemelen bir anksiyete bozukluğuna sahip, veya daha öncesinde bu hastalıklardan birisinin tanısını almıştır (30). Yaşam boyu prevalans olarak herhangi bir anksiyete bozukluğu spektrumundaki hastalığa sahip olma olasılığı ise, Çin'de saptanan %4.8 oranından Amerika Birleşik Devletleri'ndeki %31 oranına kadar değişkenlik gösteriyor. Anksiyete bozukluklarının küresel 12 aylık prevalansının ise yaklaşık %14 olduğu tahmin edilmektedir (31).

Ülkeler arasında görülen bu farklı oranlar gerçek bir farktan kaynaklanabileceği gibi, bir dizi faktörden etkilenebilir. Bu faktörler arasında, kullanılan görüşme araçları ve tanı koyma dizgelerindeki farklılıklar, örneklem büyüklüğü, araştırma tasarımı ve seçilen örneklem grubu gibi unsurlar yer alabilir. Ayrıca kültürel ve sosyal faktörler de oranlardaki farklılıkları etkileyebilir (32).

Çoğu epidemiyolojik çalışma henüz DSM-5'in tanı sınıflandırmasını kullanmadığından, ayrılık anksiyetesi ve seçici konuşmamazlık prevalans tahminleri bu oranlara dahil değildir.

Anksiyete bozukluklarının başlangıç yaş ortalamasınının 11 olduğu tahmin ediliyor (33). Özgül fobiler (ÖF) ve ayrılık anksiyetesi en erken yaşta başlar ve başlangıç yaş ortalaması yedi dir. Sosyal anksiyete bozukluğu (SAB) için 13, agorafobi için 20 ve panik bozukluğu (PB) için ise başlangıç yaş ortalaması 24 olarak bulunmuştur. Yaygın anksiyete bozukluğu (YAB) başlangıç yaş ortalaması ise 31 ile en geç olanıdır.

Almanya'da yapılmış epidemiyolojik bir çalışmaya göre, SAB, YAB ve ÖF için 12 aylık yaygınlık oranları en yüksek 18-34 yaş aralığındayken, PB 35-49 yaş grubunda en

yüksek orandadır. 50-64 yaş aralığında anksiyete bozukluklarının yaygınlık oranları azalmıştır ve yaşlılarda (65-79 yaş) en düşük düzeydedir. Bu da demektir ki, yaşla beraber anksiyete bozukluklarının görülme sıklığı azalma eğilimindedir (34).

Cinsiyet dağılımına baktığımızda, kadınlar erkeklere göre neredeyse iki kat daha fazla anksiyete bozukluklarından muzdarip olmakta ve kadınların yaklaşık üçte biri hayatlarının bir döneminde anksiyete bozukluğu yaşayabilmektedir (35). Kadınlarda anksiyete riskinin artmasının nedeni kesin olarak belirlenememiştir. Şiddet, cinsel istismar, antenatal ve postnatal stres, sosyal ve kültürel ortam ve cinsiyet eşitsizliği gibi faktörler, kadınlar açısından risk artırıcı etkenler olarak değerlendirilebilir (36,37).

Dul veya bekar olmak, düşük sosyoekonomik ve eğitim düzeyi anksiyete bozuklukları açısından yüksek yaygınlıkla ilişkili bulunmuştur (38).

Türk toplumunu temsil edebilecek örnekleme olan ilk ve tek çalışma 1995 yılında yapılmış olup sonuçları 1998 yılında ‘Türkiye Ruh Sağlığı Profili’ adıyla yayımlanmıştır. İlgili çalışmada anksiyete bozukluğu kümesi ICD-10 baz alınarak ele alınmış, kadınlarda 12 aylık prevalans %7.1 erkeklerde ise %3.1 bulunmuştur. Ruh sağlığı hizmeti açısından yararlanma oranına bakıldığında, anksiyete bozukluklarının depresif bozukluklardan sonra en sık yararlanma oranına sahip olduğu görülmüştür (39).

#### **2.1.4. Etiyoloji**

Anksiyete bozukluklarının etiyolojisinde genetik, nörobiyolojik, psikososyal faktörler ve bunların karmaşık etkileşimi rol oynar (40).

#### 2.1.4.1. Genetik faktörler

Anksiyete bozukluklarında kalıtsallık oranı yüksektir; ikizler üzerinde yapılan çalışmaların verilerine dayanarak %30 ila %40 arasında kalıtsallık olduğu tahmin ediliyor (41,42). Ancak, diğer nöropsikiyatrik hastalıklarda olduğu gibi, özellikle hangi genetik risk lokuslarının ve ailevi aktarım mekanizmalarının rol oynadığı hala belirlenememiştir (43)

Anksiyete ile genetik arasındaki ilişkiyi daha iyi kurabilmek açısından anksiyete bozukluğunda etkilenen beyin bölgelerinin faaliyeti ve birbirleriyle olan bağlantıları ile ilişkili genleri tanımlamak önemli ipuçlar sağlayabilir (44). Örneğin, glukokortikoid reseptörünü düzenleyen bir molekül kodlayan FKBP5 , endokannabinoid parçalayan enzimi kodlayan FAAH ve PACAP genleri artmış amigdala aktivitesi ve amigdalanın diğer beyin bölgeleriyle olan bağlantısının zayıflamasıyla ilişkili bulunmuşlardır (45–47).

Genetik faktörler ayrıca çevrenin anksiyete üzerindeki etkisini modifiye edebilir (48,49). İkiz çalışmalarından elde edilen verilere göre, ebeveyn yaklaşımı ve olumsuz yaşam olayları gibi neredeyse tüm çevresel stres türlerinde kısmi genetik etkisi mevcuttur (50).

Gen-çevre ilişkisi ayrıca aday genler kullanılarak da araştırılmıştır. En yaygın incelenen genetik varyant SLC6A4'ün (serotonin taşıyıcısını kodlar) 5-HTTLPR polimorfizmidir. 5-HTTLPR polimorfizmi, olumsuz yaşam olaylarında daha yüksek anksiyete duyarlılığına neden olur ve bu da anksiyete bozuklukları için artan riskle ilişkilidir (51,52). Çevrenin genlerin ifadesini değiştirerek beyin fonksiyonlarında değişikliğe neden olabilen, davranış ve anksiyete bozukluğu riskini artırabilen mekanizma olarak epigenetiği örnek

verebiliriz (53,54). Stresin epigenetik etkilerine yatkın gen adayları arasında, glukokortikoid reseptörünü kodlayan NR3C1 ve glukokortikoid fonksiyonunu düzenleyen bir gen olan FKBP5 bulunuyor (55,56).

#### 2.1.4.2. Nörobiyolojik faktörler

Kaygı bozuklukları, çeşitli durumların neden olduğu, aşırı ve sürekli korku, endişe ve kaygı hislerini içeren bir ruh hastalığı kümesidir. Her kaygı bozukluğunun özgül nedenleri ve mekanizmaları olabilmekle beraber, yinede korku ve kaygının nörobiyolojisi hakkında belirli genellemeler yapılmıştır.

Nörobiyolojik çalışmalar, korku ve kaygının beyinde çeşitli bölgelerinde işlendiğini göstermiştir. Bu bölgeler arasında amigdala, prefrontal korteks ve hipokampus yer almaktadır. Amigdala özellikle korkunun işlenmesinde önemlidir, çünkü potansiyel tehditleri tespit eder ve vücudun korku tepkisini tetikler. Prefrontal korteks, duygusal tepkileri düzenlemede rol oynarken, hipokampus ise bağlamsal öğrenme ve bellek süreçlerinde rol oynar. İnsanlarda negatif duyguların işlenmesiyle ilgili araştırmalar, yüz ifadesi tanıma, duygusal kelime işleme ve duygusal imgeler gibi çeşitli görevleri kullanmıştır. Bu çalışmalar, kaygı bozukluğu olan kişilerin negatif duygusal uyarıları işlerken amigdalalarında artmış aktivite ve prefrontal kortekslerinde azalmış aktivite sergilediklerini göstermiştir (47,57,58). İnsanlarda ve kemirgenlerde Pavlovian korku/tehdit öğrenme tekniğiyle ilgili çalışmalar da kaygının nörobiyolojisi hakkındaki anlayışımıza katkıda bulunmuştur. Bu çalışmalar, nötr bir uyarının, yüksek ses veya hafif elektrik şoku gibi tatsız bir uyarıyla eşleştirilmesi sürecine dayanır. Zamanla, nötr uyarı tatsız

uyarıyla ilişkilendirilir ve nötr uyarının tek başına sunumu korku veya kaygı hissine neden olabilir. Amigdala, hipokampus ve medial prefrontal korteks (ventromedial prefrontal ve anterior cingulate korteks dahil), kaygı tepkilerinin ve potansiyel tehditlere verilen tepkilerin düzenlenmesinde yer alırlar. Ayrıca, hipotalamus, orta beyin (raphe çekirdekleri gibi) ve beyincik (periaqueductal gri gibi), kaygı bozuklukları ile de ilişkilidirler. (59,60).

Yukarıda belirtilen nöral sistemlerde ölçülebilir anormalliklerin ileride anksiyete bozukluğunun ortaya çıkma olasılığını öngörebileceği düşünülüyor. Özellikle, bir çalışmada tehlide karşı artan amigdala aktivasyonunun, çalışmadan sonraki yıllarda kaygı ve depresyon riskini öngördüğü bulunmuştur (61).

Kaygı bozukluklarının biyobelirteçlerini belirlemek için başka bir yaklaşım da hipotalamus-hipofiz-adrenal (HPA) aksındaki işlev bozukluğunu yansıtan, kan temelli parametreler olabilir. Preklinik literatürde, stres ve kaygı durumlarında HPA aksında hiperaktifite tespit edildiği gösterilmiştir (62).

Nörotransmitter düzeyinde ise anksiyete ile alakalı en eski ve en iyi bilineni  $\gamma$ -aminobütirik asittir (GABA). Özellikle GABA-A reseptörünün alfa 2 subünitesi anksiyolitik etkiyle ilişkilidir (63,64). Benzodiazepin (BZ) grubu ilaçlarının da anksiyolitik etkisinin, büyük ölçüde limbik sistemde bulunan GABA-A reseptörünün alfa 2 ünitesi üzerinden olduğu gösterilmiştir (63). Manyetik rezonans (MR) spektroskopisi kullanılarak, GABA'nın anksiyete bozukluklarındaki önemini gösteren bir diğer araştırmada, PB olan hastalarda kortikal GABA seviyesinde azalma gözlemlenmiştir (65).

Serotonin (5-HT), ruh halinin düzenlenmesinde, dürtü kontrolünde, uyku düzeninde, uyanıklıkta, iştahta, cinsel istekte ve hafıza ve öğrenme gibi bilişsel işlevlerde rol oynar. Ayrıca

serotonin, kaygı, korku gibi durumların düzenlenmesinde de yer alır (66). Birçok serotonin reseptörü olmasına rağmen anksiyete etiyojisinde 5-HT1A reseptörünün önemli bir rol oynadığı düşünülmektedir. Kısmi 5-HT1A reseptör agonistlerinin anksiyolitik olması bu teoriyi desteklemektedir (67). İşte bu yüzden ki seçici serotonin geri alım inhibitörleri (SSRI'lar), kaygı bozuklukları için birinci basamak tedavi haline gelmiştir. Bu ilaçlar, nöronlardan salınan serotonin'in geri alımını seçici olarak bloke ederek, beyinde 5-HT nörotransmisyonunu ve 5-HT1A reseptörüne bağlanmayı değiştirerek etki gösterirler (68,69). Yine yapılan prelinik çalışmalarda, genetik yolla 5-HT1A reseptörleri silinmiş olan farelerin, davranışsal testlerde daha az keşif aktivitesi ve daha fazla kaçınan tutum sergiledikleri gösterilmiştir (70,71).

Nöradrenalin ve dopamin gibi katekolaminler stres yanıtında önemli yere sahiptir. Stresli bir olaya tepki olarak katekolamin aktivitesi arttığında, prefrontal korteks fonksiyonunun bozulduğu, bu bozulmanın anksiyete bozukluklarının oluşumunu kolaylaştırdığına yönelik klinik çalışmalar mevcuttur (72).

Klinik çalışmalar yetersiz olsada prelinik çalışmalar, anksiyete bozukluklarının yönetiminde glutamat modülatörlerinin de yeri olduğuna dair bazı kanıtlar sunuyor (73,74). Stres, anksiyete bozukluklarının gelişiminde önemli bir faktördür ve bunu çeşitli hayvan stres modelleri kullanarak simüle etmek mümkündür. Yapılan hayvan deneylerinde, stresin sıçan beyninin prefrontal korteksinde glutamat salınımını uyardığı gösterilmiştir (75). Prefrontal korteks ve diğer limbik bölgelerde glutamaterjik iletimi artırdığı gösterilen akut stresin aksine, kronik stres, glutamat reseptörlerinde azalmaya neden olarak glutamat iletiminde bir düşüşe yol açmıştır (76).

Bir nöropeptid olan oksitosin YAB ve SAB ile ilişkili bulunmuştur. Yapılan hayvan ve insan çalışmalarında, endojen beyin oksitosin aktivitesindeki dengesizliğin, bu bozuklukların oluşumundan sorumlu olabileceği ve intranasal yolla uygulanan oksitosinin ilgili hastalıklarla alakalı semptomları azaltabileceği düşünüyor (77).

Adenozin, nöronal uyarılabilirliği kontrol eden ve nörotransmitter salınımını modüle eden bir nöromodülatördür ve merkezi sinir sisteminde yaygın olarak bulunur. Adenozinin etkisi, A1, A2A, A2B ve A3 isimli dört adet G proteinine bağlı reseptörler aracılığıyla gerçekleşir. Birçok çalışma, anksiyete yönetiminde yeni stratejilerin geliştirilmesi için potansiyel bir hedef olarak A1 adenozin reseptörünü (AR) tanımlamıştır (78). Özellikle, A1AR'ların olmadığı farelerde artmış anksiyete gözlemlenmiştir. Hipokampal kesitlerden elde edilen elektrofizyolojik kayıtlar, adenozinin uyarıcı glutamaterjik nörotransmisyonu inhibe edebildiğini göstermiştir. Ancak bu inhibisyon etkisi A1AR'in olmadığı farelerde ortadan kalkıyor olması, A1AR'ların bu etki için gerekli olduğu düşündürüyor (79).

#### 2.1.4.3. Psikososyal faktörler

Duygusal ihmal gibi stresli çocukluk deneyimlerine maruz kalma, normal sosyo-duygusal işlevi bozabilir (80,81). Bu bozulma, tehditkâr kişilerarası uyaranlara karşı duygusal reaktiviteyi artırır. Zamanla, bu yüksek duygusal reaktivite, stres ve korku tepkilerinin düzenlenmesinde bozulmaya neden olabilir ve sonuç olarak anksiyete semptomlarının ortaya çıkmasına katkıda bulunabilir (82). Ebeveynler arası çatışma, aşırı kontrolcü ebeveyn ve aile desteğinin eksikliği gibi faktörler, ileride anksiyete bozukluğunun oluşumu için risk

etkeni olarak belirlenmiştir (83,84) . Aşırı stres, yalnızlık (hem sosyal hem de duygusal) ve zorbalık deneyimi (fiziksel, sözlü veya psikolojik) anksiyete bozukluğu geliştirme riskinin artması ile ilişkili bulunmuştur (85,86).

## **2.1.5. Anksiyeteye kuramsal yaklaşım**

### 2.1.5.1. Psikodinamik kuram

Psikodinamik teorilerin kalbinde, Freud'un anksiyete semptomlarını, bilinçdışı çatışma ve bunu kontrol edebilmek için devreye giren savunma mekanizmaların etkileşimi yatar. Freud, anksiyetenin algılanan bir psikolojik tehlikeden kaynaklandığını ve bunun ego için bir tehdit sinyali olduğunu öne sürmektedir (87). Tehlike durumunun travmatik olmasını önlemek için savunmalar devreye girer, ancak işlevlerini yerine getiremezlerse bir anksiyete atağı gerçekleşir. Freud'a göre, ego için tehdit olarak algılanan durumlar, nesne kaybına yönelik endişeler, kastrasyon kaygısı ve süperego kaygısıdır. Nesne kaybı kaygısı, anne gibi bakım veren kişiden ayrılma korkusudur. Kastrasyon kaygısı ise değer verilen bir nesneden ayrılma korkusudur. Bu erkekler için genital organlarıyla ilgili bir endişedir ve kontrol ve güç kaybıyla ilgilidir. Son olarak, süperego kaygısı, vicdan veya toplumdan gelen olumsuz bir değerlendirme korkusudur (88).

Anksiyete hastaları için tipik çatışma alanlarının öfke, cinsel arzular ve ayrılık olduğu öne sürülmektedir. Araştırmalar anksiyete ile nesne ilişkileri veya kişiler arası ilişkiler arasındaki bağı desteklemiştir. Psikodinamik teoriler, anksiyetenin etiyolojisi ve patogenezi anlamının altında yatan sembolik anlamlarına, bilinçaltı çatışmalarına, savunmaya ve nesne ilişkilerine ve kişiler arası ilişkilere vurgu yapan bir

açıklama sunar (89–91).

#### 2.1.5.2. Davranışçı kuram

Davranışsal kuram, anksiyetenin belirli uyaranlara veya durumlara karşı öğrenilmiş bir tepki olduğunu öne sürmektedir. Bu teoriye göre, insanlar klasik koşullanma, işlemsel koşullanma ve gözlemlenebilirlik yoluyla belirli uyaranları veya durumları korku ve endişe ile ilişkilendirmeyi öğrenirler. Örneğin, kalabalık ve açık alanda panik atak geçiren bir kişi, kalabalıkları anksiyete ile ilişkilendirerek gelecekte bu tür durumlardan kaçınmayı öğrenebilir.

Klasik koşullanma, nötr bir uyarıcının (örneğin, bir ses veya bir yer) doğal bir tepkiyle (örneğin, korku) ilişkilendirilmesi yoluyla gerçekleşir. Örneğin, bir kişi bir köpek tarafından ısırılır ve korku tepkisi geliştirirse, köpek havlamasından, gerçek köpek ısırmasıyla tekrarlayan eşleştirmeler yoluyla korkmaya başlayabilir.

İşlemsel koşullanma, davranış sonuçları tarafından şekillendirilir. Örneğin, bir kişi sosyal durumlarda anksiyete yaşar ve bu durumlardan kaçınırsa, kaçınma davranışı anksiyete azalmasıyla pekiştirilir ve gelecekte daha olası hale gelir.

Gözlemlenebilirlik yoluyla öğrenme, bireylerin diğer insanların davranışlarını izleyerek öğrendikleri bir yöntemdir. Örneğin, bir çocuk, bir ebeveynin örümceklerle ilgili tepkisini izleyerek örümceklerden korkmayı öğrenebilir (92–96).

#### 2.1.5.3. Bilişsel kuram

Anksiyetenin bilişsel kuramı, kaygılı bireylerin kaygılarına katkıda bulunan belirli düşünce kalıplarına sahip

olduklarını öne sürer. Bu düşünce kalıpları, olumsuz ve tehditkâr uyarılara seçici bir şekilde dikkatte odaklanma, güvenlik ipuçlarını işleme yeteneğinin azalması, abartılı tehdit değerlendirmeleri ve potansiyel olarak tehdit oluşturabilecek durumların yanlış işlenmesi gibi unsurları içerir.

Bilişsel kurama göre kaygılı kişiler ayrıca anksiyete semptomlarını normal bireylere kıyasla çok daha olumsuz yorumlar, tehdit olarak gördükleri duruma karşı daha az etkili savunma stratejileri geliştirir, ilgili durumlarda daha düşük özgüvene sahiptirler ve kendilerini genellikle çaresiz hissederler. Bu bireyler olası tehditle ilgili sıklığı artmış, oldukça yoğun ve uzun süreli olumsuz otomatik düşüncelere ve imgelere sahiptir.

Ayrıca bu kuram, anksiyeteye yatkın olan bireylerin, belirli tehditler veya tehlikelerle ilgili önceden oluşturulmuş uyumsuz inanç veya şemalara sahip olduklarını iddia eder (97).

#### **2.1.6. Prognoz ve tedavi**

Anksiyete bozuklukları, semptomların remisyon ve nüks dönemleri arasında sönüp sonrasında alevlendiği, şiddetinin değişken olduğu, uzun yıllar boyunca devam edebilen hastalık grubu olarak kabul edilir. Hastalığın seyri farklı türdeki anksiyete bozuklukları arasında değişkenlik gösteriyor. YAB'da sürekli bir durum olarak kabul edilirken, PB ise öngörülemeyen bir seyir izleyebilir (98).

Anksiyete bozukluklarından herhangi birisine sahip olan hastalar, genellikle başka bir psikiyatrik bozukluk tanı kriterlerini de karşılar. Yüksek eştanı oranı, major depresif bozukluk (MDB), bipolar bozukluk, şizofreni, madde kötüye kullanımı ve fiziksel hastalıklar arasında mevcuttur (99–102). Eştanısı olan hastaların genellikle sadece anksiyete

bozukluğuna sahip hastalardan daha kötü prognoza sahip olduğu bulunmuştur (103).

SSRI'lar, kısa ve uzun süreli tedavide "geniş spektrumlu" etkinliğe sahip olmaları ve genellikle iyi tolere edilmeleri nedeniyle, anksiyete bozuklukları olan hastalarda ilk tercih farmakolojik yaklaşım olarak kabul edilir. SSRI'ların potansiyel yan etkileri arasında, tedavinin başlangıcında artan sinirlilik, uykusuzluk, bulantı ve cinsel işlev bozuklukları gibi etkiler yer alır (104,105). Bazıları karaciğer enzimlerini etkileyerek diğer ilaçların kan düzeylerini değiştirebilirler. Paroksetin gibi kısa yarı ömürlü SSRI grubu ilaçlar ani ve hatta yavaşça azaltıldığında bile, baş dönmesi, uyku sorunları ve grip benzeri semptomlarla karakterize edilen çekilme sendromuna neden olabilirler (106,107).

Serotonin ve norepinefrin geri alım inhibitörü (SNRI) olan duloksetin ve venlafaksin, YAB'ın kısa ve uzun süreli tedavisinde kanıtlanmış etkinliğe sahiptir (108). Bazı çalışmalar, venlafaksin PB tedavisinde ve nüksünün önlenmesinde etkili olduğunu göstermektedir (109). Anksiyete bozuklukları hastalarında SSRI ve SNRI'ların tolere edilebilirlik profilleri karşılaştırılmamış olsa da, depresyon hastalarıyla yapılan çalışmalar, duloksetin ve venlafaksin SSRI'lara göre daha az tolere edildiğine dair kanıtlar sunmuştur (110).

Trisiklik antidepresan (TA) ilaçlar bazı anksiyete bozukluklarında etkili olsalar da, SSRI/SNRI'lara göre daha ağır yan etkilere sahip olmaları, gün içerisinde performansı olumsuz etkilemeleri ve olası ilaçla intihar vakalarında yüksek toksisiteye sahip olmaları nedeniyle artık tedavide ilk tercih olarak kabul görmüyorlar (111–113). Monoamin oksidaz A'yı (MOA) geri dönüşümlü olarak inhibe eden Moklobemid, sosyal fobi tedavisinde etkili olduğu gösterilmiştir ve yine

PB'da bazı faydaları olduğuna dair kanıtlar vardır. Moklobemid'in geri dönüşümlü etkisi diğer MAOI göre avantaj sağlasada, yüksek dozlarda yinede tiramin içerikli gıdaların kısıtlanmasını gerektirir (114,115).

BZ'lerin PB, YAB ve SAB olan hastaların tedavisinde etkinlikleri mevcut olup, yalnız hem kısa hem de uzun süreli tedavide sedasyonda artışa, bilişsel bozulmaya ve uzun süreli kullanımda tolerans ve bağımlılığa yol açmaları nedeniyle daha çok dirençli vakalarda tercih edilirler (109,113,116). BZ'ler ayrıca yaşlı bireylerde düşme riskini ve olası kemik kırıkları riskini artırdıkları için ilgili popülasyonda sakıncalı kabul ediliyorlar (117). Antipsikotik ilaçlar arasında faydalı olduğuna dair en güçlü kanıt YAB tedavisinde akut tedavi ve nüksün önlenmesinde kullanılan Ketiapine aittir (108). Atipik antipsikotiklerle tedavi, kilo alımı ve metabolik sendrom riski ile ilişkili olduğu için, bu ilaçların ancak tedaviye dirençli hastalarda tercih edilmesi önerilmektedir. Beta adrenerjik reseptör blokörleride (Propranolol gibi) SAB gibi bazı anksiyete bozukluklarında kullanılabilir (118) .

Psikoterapi alanında en fazla etkinliğine dair kanıtı olan tedavi seçeneği bilişsel-davranışçı terapidir (BDT). BDT, çeşitli ülkelerde birçok sağlık uygulama kılavuzu tarafından önerildiği gibi, belirli anksiyete bozukluklarında birinci basamak tedavi yöntemi olarak da öneriliyor (119,120). BDT, bireylerin olumsuz düşünce ve davranış kalıplarını tespit ederek değiştirmelerine yardımcı olan bir psikoterapi yöntemidir. BDT, düşüncelerin, duyguların ve davranışların birbirleriyle bağlantılı olduğu ve birbirlerini etkileyebildiği fikrine dayanmaktadır. BDT'de, bireyler terapistleri ile birlikte, endişelerine veya diğer zihinsel sağlık sorunlarına katkıda bulunan olumsuz veya yararsız düşünceleri ve inançları tanımlarlar. Terapist daha sonra bireyin bu düşünceleri ve

inançları sorgulamasına ve daha gerçekçi ve olumlu düşünme yolları geliştirmesine yardımcı olur. Ayrıca bireylerin semptomlarını yönetmelerine ve genel refahlarını artırmalarına yardımcı olabilecek yeni başa çıkma becerileri ve davranışları öğretmeyi de içerir, örneğin rahatlama teknikleri veya problem çözme becerileri gibi (121).

BDT genel olarak tercih edilen psikoterapi yöntemi olsa da, etkinliği kanıtlanmış diğer yöntemler de anksiyete bozukluklarının tedavisinde kullanılıyor. Bunlardan birisi psikodinamik psikoterapidir. Psikodinamik psikoterapi, genellikle bilişsel davranışçı terapiler gibi yapılandırılmış ve kısa süreli terapilere kıyasla daha uzun ve daha az yapılandırılmış bir psikoterapi türüdür. Bu terapi, kişinin bilinçaltında yatan düşünceleri, duyguları ve deneyimleri keşfetmesine ve anlamlandırmasına odaklanır ve bu şekilde bireyin zihinsel sağlığına katkıda bulunmayı hedefler. Bireyin geçmiş yaşantıları ve ilişkileri, özellikle de aile dinamikleri ve çocukluk deneyimleri, bu terapiye önemli bir rol oynar (122). Psikodinamik yöntemlerin kullanıldığı araştırmalar umut verici sonuçlar vermiş olup, hastalığın şiddeti ve genel sıkıntı halinde anlamlı iyileşmelerin görülmesine neden olmuştur (89,90,123). Farkındalık Temelli Bilişsel Terapi (FTBT), bilişsel terapi ve mindfulness (farkındalık) tekniklerinin birleştirilmesiyle oluşan bir terapi yöntemidir. Temel amacı, kişinin düşüncelerine ve duygularına farkındalık kazanması ve onları kabul etmesini sağlamaktır. Bu yaklaşım yeni olmasına rağmen kalıntı semptomlar ve YAB'da etkili olduğuna dair çalışmalar mevcuttur (124,125). Göz hareketleriyle duyarsızlaştırma ve yeniden işleme tekniği (EMDR), anksiyete bozukluklarının tedavisinde kullanılan bir diğer yöntemdir. Terapi, kişinin belirli bir olay veya deneyimle bağlantılı olan duygusal ve zihinsel stresini azaltmak için göz hareketleri, sesler ve

dokunma gibi duyuşal uyarıları kullanmaktadır. Özellikle PB ve özgül fobide başarılı sonuçlar verdiğine dair çalışmalar mevcuttur (126,127).

Farmakoterapi, psikoterapi veya bunların kombinasyonlarının etkinliğini karşılaştıran bir çalışmada, BDT tek başına maliyet ve sağlık çıktısı dengesi bakımından en etkili yöntem olarak bulunmuşken, sadece sağlık kısmı ele alındığında BDT ve SSRI kombinasyonu en başarılı sonucu vermiştir (128).

Sonuç olarak anksiyete bozuklukları tedavisinde seçenekler çeşitli olup, tedavi yaklaşımını seçerken hastanın karar verme sürecine dahil etmek önemlidir. Seçim, hastalığın şiddeti, önceki tedaviye verilen yanıt, farklı tedavi seçeneklerinin erişebilirliği ve en önemlisi, hastanın tercihlerine göre belirlenmelidir. Hastanın karar verme sürecine dahil edilmesi, tedavinin hasta tarafından kabul edilme ve sürdürülme olasılığını artırır. Ayrıca, klinisyen ve hastanın işbirliği, tedavi sonuçlarını da iyileştirebilecek güvene dayalı bir ilişki kurulmasına yardımcı olabilir.

## **2.2. Sirkadyen Sistem**

Günlük hayatımız, çoğu kişi tarafından fark edilmeyen doğal bir olgu tarafından belirlenir, iç beden saati ya da diğer bir deyişle sirkadyen ritimler. Bu ritimler, uyku düzenlerimiz, vücut sıcaklığımız, hormon seviyelerimiz ve hatta ruh hâlimiz ile bilişsel yeteneklerimiz dahil olmak üzere vücudumuzdaki çeşitli fizyolojik ve davranışsal değişimleri 24 saatlik bir dönemde kontrol eder.

Bu doğal döngüleri kırmaya çalışsak ve gece boyunca uyanık kalsak bile, vücudumuz hala bu içsel döngülerden etkilenir. Bu yüzden, Çernobil gibi faciaların gece vardiyasında

gerçekleşmesi tesadüf değildir. Uyanıklığımız sabahın erken saatlerinde doğal olarak en düşük seviyesindedir ve günün diğer saatlerine göre sabah 03.00'te arabalarla meydana gelen kaza oranı gözle görülür şekilde daha yüksektir.

İnsanlar olarak, zamanımızın yaklaşık %36'sını uyuyarak ya da uyumaya çalışarak geçiriyoruz ve iç beden saatimiz bunda önemli rol oynuyor (129).

### **2.2.1. Tanım**

Vücudumuz, yaklaşık 24 saatlik bir döngü izleyen doğal bir ritme sahiptir, bu ritme sirkadyen ('circa diem' kelimelerinden türemiş olup 'yaklaşık bir gün' anlamına gelir) ritim denir. Ancak, 24 saatten daha kısa veya daha uzun süren döngüler de var olup, bunlara da ultradian (24 saatten kısa) ve infradian (24 saatten uzun) ritimler denir. Bu ritimler endojen mekanizmalar tarafından denetlenir ve ışık ve karanlık gibi dışsal uyaranlar olmasa bile sürdürülebilir (130). Bir moleküler ya da biyolojik sürecin döngüsel ritmikliği, bir osilatör veya ritmik bir çıkış üretmek için birlikte çalışan bileşenlerden oluşan bir sistem tarafından üretilir. Bu osilatörler çeşitli organizmalarda hücresel ve moleküler düzeyde, ayrıca vücuttaki çeşitli dokularda ve organlarda bulunabilir (131–133).

### **2.2.2. Sirkadyen sistemin nörobiyolojisi**

Hipotalamusun suprakiazmatik çekirdeği (SCN), memelilerde çeşitli biyolojik ritimleri, uyku ve uyanıklık döngülerini, hormon seviyelerini ve daha fazlasını kontrol ederek merkezi bir zamanlayıcı veya ana saat olarak işlev görür (134). Işık, en kuvvetli zamanlayıcı uyaran (zeitgeber) olup, 24

saatlik gece-gündüz döngüsüyle SCN'yi senkronize edebilir. SCN ayrıca fiziksel aktivite, sosyal etkileşimler, beslenme, ve sıcaklık gibi ışıksız uyarılarla da senkronize olabilir (135,136). Hayvanda SCN hasar gördüğünde sirkadyen ritimler bozulabilir, yalnız sağlıklı donörden SCN hücreleri nakledildiğinde sirkadyen ritmiklik geri kazanılır. Bu nakledilen canlı, donörün biyolojik ritimlerini benimser (137,138). Son çalışmalar, SCN olmadan da periferik osilatörlerin ritimlerini koruyabileceğini göstermektedir (139).

Retina ışık bilgisini alır ve melanopsin adlı bir tür fotopigment içeren, ışığa hassas retinal gangliyon hücreleriyle, retinohipotalamik yolu kullanarak SCN'ye iletir. Bu yol boyunca nörotransmitter olarak da glutamat kullanılır (140,141). Bu yol dışında SCN median raphe çekirdeğinden gelen yoğun bir serotonerjik etkiye de maruz kalır (142). SCN'ye uygulanan serotonin agonistleri sirkadyen ritimlerin zamanlamasını değiştirebilir ve bu yolun, SCN'ye ışıkla ilgisi olmayan zamanlama uyarılarını ilettiği düşünülmektedir. Ayrıca bu iki girdi, birbirinin faz kaydırma yapabilme yeteneğini de engelleyebilir (143,144).

Işık, uyku ve karanlıkla ilişkili bir hormon olan ve pineal bezden salgılanan melatonin'in üretimini etkiler. Melatonin üretimi, gündüzleri düşük seviyelerdeyken geceleyin hem diurnal hem de nokturnal yaşayan memelilerde artar (145). Melatonin, uyku/uyanıklık döngüsü de dahil olmak üzere birçok sirkadyen ritmi düzenlemeye yardımcı olur. İnsanlarda, melatonin üretiminin loş ortamlarda başlaması, sirkadyen faz pozisyonunun kullanışlı bir göstergesi olarak kabul edilir (146). Melatonin, memelilerin fizyolojisinde çeşitli etkilere sahiptir ve kör bireylerde serbest gidişli sirkadyen ritimlerin ayarlanmasına yardımcı olacak şekilde fizyolojik dozlarda uygulanabilir (147). Sirkadyen sistemler arasındaki

senkronizasyon eksikliği, sağlık açısından olumsuz etkilere sahip olabilir. Melatonin uygulaması, mevsimsel örüntü gösteren depresyon hastalarının, ruh hali semptomlarında olumlu etkilere sebep olabilir (148).

SCN, periferik osilatörlere hem humoral hem de nöronal yollar aracılığıyla zaman bilgisini gönderir. Hayvanların kan dolaşımını paylaştığı parabiozis tekniği ile yapılan son deneyler, bazı osilatörlerin sadece kan kaynaklı iletim yolları ile ayarlanabileceğini, bazılarının da nöronal yollara gerek duyduğunu belirtmiştir (139). SCN, subparaventriküler bölge, dorsomedial hipotalamus çekirdeği (DMH) ve paraventriküler çekirdek (PVN) gibi hipotalamusun çeşitli bölgelerine sinyaller gönderir (149,150). DMH, kortikosteroid ve diğer hormonların salgılanması, lokomotor aktivite ve uyku gibi döngüsel ritimlerin düzenlenmesinde önemlidir. PVN, hipofiz hormonlarının kontrolünde görevlidir ve pineal bezi tarafından üretilen melatoninin salınımını düzenler. Ek olarak, PVN'deki nöronlar, otonomik sinir sistemi ile sinyaller göndererek vücudun çeşitli dokularına ve organlarına bilgi iletilmesini sağlarlar. Farklı bölgelerdeki SCN nöronları, çeşitli döngüsel ritimlerin düzenlenmesinde görevlidir ve farklı yolları kullanırlar (149,151).

Uyku/uyanıklık döngüsü memeli sirkadyen sisteminin en belirgin etkilerden biridir. Uyku/uyanıklık döngüsünün kontrolü karmaşıktır ve çeşitli beyin bölgeleri ve yollarını içerir. Uyanıklık ve kortikal uyarılmışlık, pons tegmentum, locus coeruleus ve raphe çekirdeklerinden gelen kolinerjik ve aminerjik yolların sürekli aktivitesi ile ilişkilidir. Ventral yolak, locus coeruleus ve raphe'den başlar, periakuaduktal gri madde ve tuberomamiller nukleus'a, lateral hipotalamusa ve bazal ön beyine doğru gider (152). Lateral hipotalamus tarafından üretilen bir nöromodülatör olan oreksin/hipokretin,

uyanıklığın sürdürülmesi için hayati öneme sahiptir. Oreksin/hipokretin eksiklikleri, narkolepsi gibi uyanıklığın sürdürülmesinde bozukluklar olan hastalıklarla ilişkilidir (153,154). Ventrolateral preoptik alanın (VLPOA) nöronları, uyku oluşturmak ve sürdürmek için özel olarak tasarlanmış beyin hücre gruplarından biridir. VLPOA, doğrudan talamusa giden yollar aracılığıyla hipotalamik ve beyin sapı uyarılma merkezlerine çıktı sağlar. Ayrıca, VLPOA beyin sapı monoaminerjik sistemini ve hipotalamik oreksin/hipokretin sistemini, GABA ve galanın aracılı yolla inhibe eder. VLPOA ve lateral hipotalamustaki oreksin nöronları, aminerjik uyarılma sistemiyle birlikte karşılıklı inhibisyon bağlantıları paylaşırlar. Bu lateral hipotalamus ve VLPOA arasındaki inhibisyon bağlantıları, hızlı uyku/uyanıklık geçişlerini düzenleyen bir "uyku anahtarı" mekanizması olarak öne sürülmüştür. Normal uyku/uyanıklık sistemine sahip bireylerde, "açık" anahtar konumu uyanıklığı tetikler ve sürdürürken, "kapalı" anahtar konumu uykuyu tetikler ve sürdürür (152).

### **2.2.3. Sirkadyen sistemin genetiği ve moleküler döngüsü**

Memelilerde moleküler sirkadyen sistem, hipotalamik merkezi saatte, suprakiazmatik çekirdeklere ve ikincil saatlerin bulunduğu beynin diğer bölgeleri ve periferik organlarda mevcuttur (155).

Bir meyve sineği olan drosophila'da bulunan 'period' (PER) geni, sirkadyen ritimden sorumlu olduğu keşfedilen ilk gendir. Daha sonraki araştırmalar sirkadyen ritimle ilgili başka bir gen olan timeless (TIM) genini keşfetmişlerdir (133,156).

Circadian locomotor output cycles kaput (CLOCK) geni

memelilerdeki ilk saat genlerinden biri olarak tanımlandı ve bu genin mutasyonları uzamış dinlenme-aktivite döngüsünden sorumlu olduğu bulundu (157). Farelerde bulunan ve CLOCK geninin ortağı olan 'brain and muscle ARNT-like protein-1' (BMAL1), PER1 ve PER2, cryptochrome-1 (CRY1) ve CRY2 genlerinin de sirkadyen ritmi düzenlemede önemli rolere sahip oldukları anlaşılmıştır (158).

Bu genlerin homologları insanlarda da tanımlanmıştır. Sirkadyen ritmin düzenlenmesinde rol oynayan diğer genler arasında: retinoic acid receptor-related orphan receptor (ROR)-A ve ROR-B, reverse erythroblastosis virus (REV-ERB) ve kazein kinaz-1 (Ck1) $\epsilon$  ve Ck1 $\delta$  gibi BMAL1 geninin transkripsiyonunu kontrol eden genler bulunmaktadır. Bazı çalışmalar, örneğin vardiya çalışanlarında PER1 ve PER2 genlerinin ifadesinde değişiklikler olduğunu bildirmiştir (159,160).

Farklı saat genlerinin keşfi, 24 saatlik bir geri besleme döngüsüne dayanan bir moleküler saat modelinin geliştirilmesine yol açtı. Sirkadyen ritimleri düzenleyen moleküler mekanizmalar türler arasında benzerdir. Bu düzenleyici mekanizmalar arasında; güçlendirici etkenler, baskılayıcı etkenler ve fosforilasyon-defosforilasyon, metilasyon, asetilasyon reaksiyonları, belirli protein dimerizasyonunu içeren kontrol döngüleri mevcuttur (161,162).

Sirkadyen saat moleküler döngüsü, temel olarak iki tip mekanizma içermektedir: transkripsiyonel ve post-transkripsiyonel (163).

Transkripsiyonel mekanizmalar, iki çift pozitif ve negatif etkenden oluşan bir oto-regülatif geri bildirim döngüsünü içerir. Memelilerde pozitif etkenler, birbirleriyle heterodimerize olan CLOCK ve BMAL1 transkripsiyon

faktörleridir, negatif etkenler ise PER ve CRY proteinleridir. Suprakiazmatik çekirdekte sabahları az miktarda PER ve CRY bulunur, buna tepki olarak CLOCK-BMAL1 kompleksi, PER ve CRY genlerinin transkripsiyonunu artırmaya başlar. PER ve CRY proteinleri gün boyunca yavaş yavaş kararlı hale gelir, sonra heterodimerize olur ve nükleusa göç ederler, burada CLOCK-BMAL1 heterodimerinin transkripsiyonel aktivitesini ve haliyle kendi transkripsiyonlarını inhibe ederler. Sonuç olarak, moleküler saat mekanizması, pozitif (CLOCK-BMAL1 heterodimeri) ve negatif (PER-CRY heterodimeri) bileşenlerinin geri bildirim döngüsünden oluşur. Bu döngü yaklaşık 24 saat sürer, CLOCK-BMAL1 heterodimerleri ayrıca farklı dokularda da birçok saat kontrollü genin günlük transkripsiyonunda da yer alır. Başka bir düzenleyici geri bildirim döngüsü, REV-ERB $\alpha$  ve ROR $\alpha$  nükleer reseptörleri tarafından oluşturulur. ROR $\alpha$ , BMAL1'in transkripsiyonunu aktive ederken, REV-ERB $\alpha$  baskılar. Sonuç olarak, BMAL1'in döngüsel ifadesi, ROR'ların pozitif ve REV-ERB'lerin negatif düzenlemesiyle elde edilir. Bu ikincil geri bildirim döngüsü "stabilizasyon döngüsü" olarak adlandırılır (163–165).

Post-transkripsiyonel mekanizmalar, sirkadyen döngünün uygun şekilde çalışmasında kritik rol oynar. Yeni bir döngünün başlaması için, PER ve CRY proteinlerinin, pozitif elemanların (CLOCK ve BMAL1) aktivitesini inhibe ettikten sonra aktivitelerinin sonlanması gerekmektedir. PER ve CRY'nin, CLOCK ve BMAL1 üzerindeki etkisini modifiye eden çeşitli post-transkripsiyonel süreçler bulunmaktadır ve bunlardan en iyi bilinenleri fosforilasyon ve defosforilasyondur. Birden çok farklı bölgede fosforile edilebilen PER ve/veya CRY'yi hedef alan, çeşitli kinaz proteinleri bulunmaktadır. Yıkılması gereken proteinler ubiquitin tarafından işaretlenir ve proteazoma transferi

gerçekleşir. Ana moleküler döngüdeki saat proteinlerinin post-transkripsiyonel düzenlemeleri, saat proteinlerinin işlevselliği için önemlidir ve moleküler döngünün 24 saat boyunca işleyişi için kritiktir (163,165,166).

### **2.2.3. Sirkadyen sistemin psikiyatrik hastalıklarla olan ilişkisi**

Hemen hemen tüm psikiyatrik bozukluklarda, uyku-uyanıklık döngüsü, melatonin ve kortizol salgısının zamanlaması, vücut sıcaklığı değişiklikleri gibi sirkadyen ritimle ilişkili olaylarda bozulmalar görülür. Sirkadyen sistemdeki bozuklukların psikiyatrik hastalıkların gelişiminde ve ilerlemesindeki önemi tartışılmaktadır, bu bozuklukların farklı yollarla hastalık başlangıcına ve ilerlemesine katkıda bulunabileceği düşünülüyor: 1) doğrudan, sirkadyen sistemin genetik olarak hassasiyeti nedeniyle bireyleri psikiyatrik hastalığa yatkın hale getiren nedenler olarak; 2) dolaylı olarak, hastalıkla ilgili davranışların zamanlamasındaki değişikliklerin ritim bozukluğuna yol açması nedeniyle; veya 3) eş zamanlı olarak, psikiyatrik hastalık ve sirkadyen sistemdeki moleküler ve nörobiyolojik döngülerdeki örtüşmeler nedeniyle (167–171).

Psikiyatrik bozuklukların hayvan modellerinde, sirkadyen genler ile davranış bozuklukları arasında nedensel bir ilişki olduğuna dair kanıtlar bulunmaktadır, ancak insanlarda bu ilişki henüz net olarak gösterilememiştir. Bununla birlikte, sirkadyen bozukluğun çoğu psikiyatrik hastalıkta var olması ve kronobiyolojik müdahalelerin etkinliği, sirkadyen ritim bozukluklarının psikiyatrik bozuklukların başlangıcına, ilerlemesine, sürdürülmesine ve tedaviye yanıt vermesine nasıl etki ettiğiyse alakalı değişik varsayımların ortaya atılmasına neden olmuştur (172,173).

Antidepresan, antipsikotik ve duygudurum dengeleyici ilaçlar serotonin, dopamin ve norepinefrin gibi monoamin fonksiyonlarını etkiler. Örneğin, SSRI'lar antidepresan ve anksiyolitik olarak yaygın bir şekilde kullanılır. İnsanlarda görüntüleme çalışmaları, ruh hali bozukluğu olan kişilerde bu sistemlerde değişiklikler olduğunu ortaya koymuştur. Hayvan çalışmaları, monoaminerjik devrelerin ruh hali, ödül ve anksiyete ile ilişkili davranışlardaki rolünü doğrulamıştır (174).

Melatonin reseptör agonisti ve zayıf 5-HT<sub>2C</sub> reseptör antagonisti olan agomelatin, hem doğrudan hem de dolaylı olarak monoaminerjik nöron aktivitesinde artışa neden olur. Bu etkileşim, melatonin'in monoaminerjik aktivitesindeki düzenleyici rolünü destekliyor olup, sirkadyen sistem ile monoamin sistemlerinin nasıl birbirleriyle ilişkili olabileceği ile alakalı ipuçlar sağlamaktadır (175).

Çalışmalar serotonin, norepinefrin ve dopamin'in seviyelerinde, salınımında, sentezle ilişkili enzimlerinde ve reseptörlerinde sirkadyen ritmin olduğunu göstermiştir (176). Bu sistemler uyanıklık, motivasyon ve ödül ile ilgili olduğundan, yiyecek veya eş bulma motivasyonunun, uyku dürtüsü ile çelişmez şekilde diurnal ritme sahip olması önemlidir. Sirkadyen sistemle ilişkili nöronlar, monoamin sentezi ve salınımı ile ilgili genlerin doğrudan düzenlenmesinde rol oynayan genetik ifadeden sorumludur. Bu genlerden biri, MAO-A genidir ve monoamin metabolizmasında önemli bir role sahiptir. Bu gen, striatumdaki BMAL1 ve PER2 transkripsiyon faktörlerinin doğrudan hedefidir (177).

Kronik stres yanıtında, nükleus akkumbens (NAc) bölgesinde mPer1 ve mPer2 mRNA düzeyleri değişir. mPer1 ve mPer2'nin NAc'da baskılanması sonucu anksiyete benzeri davranışlarda artış görülür (178). Clock $\Delta$ 19 gen mutasyonlu

farelerde, dopamin sentezi ve dopaminerjik aktivite artmıştır, ayrıca ventral tegmental alanda (VTA) tirozin hidroksilazın (TH) artmış ekspresyonu gözlenir (179). Sirkadyen genler, anksiyete ve duygudurumla ilgili davranışların düzenlenmesinde VTA ve diğer monoaminerjik bölgelerde önemli rol oynar. VTA'da sadece CLOCK geninin ifadesinin baskılanması, fareleri daha az anksiyöz yaparken, aynı zamanda depresif bulgularını artırır. Ek olarak bu baskılanma sonucu VTA'daki sirkadyen ritimlerin periyot ve amplitüdünde değişiklikler gözlenmiştir (180).

### **2.3. Epigenetik**

Epigenetik, kalıtsal olarak aktarılan gen ifadesinde ve hücresel özelliklerde meydana gelen, DNA dizisinde değişikliğe neden olmayan modifikasyonları tanımlar. Bu değişiklikler bir hücre neslinden diğerine aktarılabilir ve bazen bir sonraki nesle miras kalabilir. Epigenetik modifikasyonlar, embriyonik gelişim sürecinde, çevresel faktörlere yanıt olarak ya da hastalık ve yaşlanmanın bir sonucu olarak ortaya çıkabilir.

Epigenetiğin adı, genler ve çevre arasındaki etkileşimleri tanımlayan Conrad Waddington tarafından 1942'de ortaya atıldı. Gelişim sürecinde, genetik faktörler ve çevresel etkilerin karmaşık bir etkileşim içinde olduğunu ve bu etkileşimin kalıcı gen ifadesi değişikliklerine neden olabileceğini savundu (181).

Epigenetiğin tanımı zaman içinde değişti ve DNA dizisi altında yatan değişiklikler olmadan, gen ifadesini değiştirebilen birçok farklı moleküler mekanizmayı içine aldı. DNA metilasyonu, histon modifikasyonu, kodlamayan RNA molekülleri ve kromatin remodelleme gibi mekanizmaların her

biri, DNA'nın transkripsiyon faktörleri ve diğer düzenleyici proteinlere erişimini değiştirerek, gen ifadesini etkileyerek epigenetik türde değişikliklere yol açabilir (182).

### **2.3.1. Epigenetik modifikasyonlar**

Epigenetik modifikasyonların en önemli özelliklerinden biri, geri döndürülebilir olmalarıdır. Genetik mutasyonlar tipik olarak kalıcı ve geri döndürülemezken, epigenetik modifikasyonlar çevresel değişikliklere veya diğer faktörlere yanıt olarak dinamik olarak değiştirilebilir. Kimyasal maddelere veya ilaçlara maruz kalmak, diyet veya yaşam tarzı değişiklikleri gibi faktörler, DNA metilasyonu veya histon modifikasyonunda değişikliklere neden olabilir ve gen ifadesini etkileyebilir (183,184).

Farklı mekanizmaları da kullansalar epigenetik ve genetik değişiklikler birbirine bağımlıdır; yani epigenetik modifikasyonlar belirli bölgelerde genetik mutasyonların olasılığını etkileyebilirken, genetik mutasyonlar da hücrelerin epigenetik değişimlere olan yatkınlıklarını değiştirebilir (185).

#### **2.3.1.1. DNA'nın epigenetik modifikasyonları**

Epigenetik DNA modifikasyonları, metilasyon ve hidroksimetilasyon gibi örnekleriyle gen ifadesini düzenlemede kritik rol oynarlar. Metilasyon, bir sitozin bazının karbon atomuna bir metil (CH<sub>3</sub>) grubunun eklenmesini içerirken, hidroksimetilasyon bir hidroksimetil (CH<sub>2</sub>OH) grubunun eklenmesiyle gerçekleşir. Bu modifikasyonlar genellikle CpG adacığı olarak adlandırılan, sitozin-guanin çiftleri açısından zengin kromozomal konumlarda sıkça görülürler.

En yaygın olarak araştırılan epigenetik modifikasyon

olan CpG metilasyonu, DNA-metiltransferazlar (DNMT'ler) tarafından gerçekleştirilirken, metil grubunun kaldırılması demetilasyon adı verilen bir işlemle, büyümeyi durdurucu ve DNA hasar-artırıcı protein 45 (Gadd45) ailesi enzimleri veya on onbir-translokasyon (TET) proteinleri tarafından indüklenir.

Bu modifikasyonların gen yapıları içindeki konumları, gen ifadesi üzerinde önemli bir etkiye sahip olabilir. Genlerin düzenleyici unsurları olan promotör ve enhancer bölgelerindeki metilasyon geni susturarak, transkripsiyon faktörlerinin ve diğer düzenleyici proteinlerin bağlanmasını engeller. Ancak, ekzonik ve intronik bölgelerdeki metilasyon, genin ifadesinde artışa neden olur. Çünkü bu bölgelerdeki metilasyon, transkripsiyon faktörlerinin daha iyi bağlanmasını ve DNA'nın transkripsiyon mekanizmasına daha kolay erişilebilmesini sağlayarak genin ifadesinde artışa yol açar. CpG hidroksimetilasyon gibi diğer epigenetik DNA modifikasyonlarının işlevsel sonuçları henüz tam olarak anlaşılmamış olsa da, bazı araştırmalar CpG metilasyonunun etkilerini tersine çevirebileceğini öne sürmektedir (186).

Memelilerde, DNA metilasyonu öncelikle fosfat grubuyla ayrılmış sitozin ve guanin bazlarını içeren CpG dinükleotitlerinde meydana gelir. Ancak, metilasyon aynı zamanda; sitozin-adenin, sitozin-timin ve sitozin-sitozin (CpA, CpT ve CpC) gibi non-CpG denilen bölgelerde de gerçekleşebilir. Non-CpG metilasyonun işlevi ve mekanizmaları henüz tam olarak anlaşılmamıştır ve araştırmacılar arasında bu konuda farklı görüşler bulunmaktadır. Bazı araştırmacılar, non-CpG metilasyonun sadece CpG bölgelerinin de novo metilasyonunun bir yan ürünü olduğunu öne sürerken, diğerleri ise bunun gen ifadesi ve doku özgünlüğü ile ilişkili olduğunu savunmaktadır. Son çalışmalar, non-CpG metilasyonun embriyonik kök hücreleri,

indüklenmiş pluripotent kök hücreleri, oositler, nöronlar ve glial hücreler gibi belirli hücre tiplerinde yoğun şekilde bulunduğunu göstermiştir (187–190).

İlginçtir ki, hem farelerde hem de insanlarda erişkin beyin dokusu genom genelinde non-CpG türü metilasyon sergiler. Beyin hücrelerinin farklı tipleri değişen non-CpG metilasyon düzeylerine sahiptir. Nöronların genel olarak glial hücrelerden daha yüksek miktarda non-CpG metilasyonuna sahip olması buna bir örnektir. Non-CpG metilasyon, postnatal hipokampus gelişimi sırasında artmaya başlar. Benzer şekilde, insan fetal ön kortekste non-CpG metilasyonu yaygın olarak bulunmamakla birlikte, yaşamın ilerleyen dönemlerinde önemli ölçüde artar. Non-CpG metilasyonundaki bu artış, sinapsların gelişimi ve sinaptik yoğunluğun artmasıyla aynı zamanda gerçekleşir. Bu durum, non-CpG metilasyonunun, sinaptik gelişim ve bağlantı gibi önemli süreçler dahil, beynin olgunlaşması ve işleyişinde bir rolü olabileceğini düşündürmektedir (191,192).

#### 2.3.1.2. Histon'un epigenetik modifikasyonları

DNA'nın histon proteinleri (H2A, H2B, H3, H4) ile paketlenme yoğunluğu değişebilir. Aktif olarak transkribe edilen genler, "açık kromatin" olarak adlandırılan ökromatin durumunda daha sık bulunurlar. Ökromatinde genler, boncuklar gibi bir dizi halinde sıralanır ve transkripsiyon mekanizmasına erişilebilir hale gelirler. Daha yoğun bir nükleozom durumu olan "kapalı" veya "heterokromatin" durumu ise transkripsiyonu engeller ve ilgili genlerin susturulmasına neden olur. Paketleme yoğunluğu, histon kodu olarak adlandırılan ve histonun kuyruk bölgesindeki amino asit kalıntılarının metilasyon, asetilasyon, fosforilasyon,

ubiquitilasyon ve ADP-ribozilasyonu dahil olmak üzere tüm kovalent histon modifikasyonlarının toplamıyla belirlenir.

Bu histon modifikasyonları, histonların kuyruk bölgelerindeki amino asit kalıntılarının elektronik yükünü etkileyerek, histon-DNA bağlanma affinitesini ve histonların genlerin susturulması ve aktivasyonunda rol alan diğer proteinlerle etkileşimini değiştirir (193).

Santral sinir sisteminde, histon asetilasyonu yaygın bir şekilde gözlenen post-translasyonel modifikasyondur. Bu işlem, hedef proteinlerdeki lizin kalıntılarına asetil grup aktaran lizin asetiltransferazlar (HAT'ler/KAT'ler) tarafından gerçekleştirilir. Öte yandan, lizin deasetilazlar (HDAC'ler/KDAC'ler) ters reaksiyonu katalizler. HAT'ler ve HDAC'ler arasındaki etkileşim, nöron fonksiyonu için kritik olan gen ifadesinin düzenlenmesine yardımcı olur. Histon asetilasyonu, histonlar ve DNA arasındaki etkileşimleri zayıflatır ve gevşek bir kromatin yapısı oluşturur, bu sayede transkripsiyon makinesinin DNA'ya erişmesi daha kolay hale gelir (194).

### 2.3.1.3 Kodlamayan RNA'lar

Non-coding RNA'lar (kodlamayan RNA'lar), DNA'dan transkribe edilen ancak protein kodlamayan RNA molekülleridir. Bu RNA'lara örnek olarak, uzun kodlamayan RNA'lar (lncRNA'lar) ve mikro RNA'lar (miRNA'lar) verilebilir (195).

lncRNA'lar, miRNA'lardan daha büyük moleküllerdir ve çeşitli işlevlere sahiptir. Epigenetik ve düzenleyici bileşenleri belirli genomik yerlere çekmek, splicing ve translasyonu düzenlemek gibi işlevleri vardır. Çekirdekte konumlandığında, lncRNA'lar kromatin yapısını değiştirerek

ve kromatin değiştirici enzimlerle etkileşime girerek gen ifadesini değiştirirler. Birçok lncRNA'nın işlevi henüz tam olarak anlaşılmamış olsa da, normal ve anormal hücrelerdeki bol miktarda varlıkları, birçok biyolojik yolakta önemli rolleri olduğunu düşündürmektedir (196,197).

Öte yandan, miRNA'lar, tipik olarak 22 nükleotid uzunluğunda olan küçük, tek sarmallı RNA molekülleridir. Çoğunlukla sitoplazmada bulunurlar ve gen ifadesini, mRNA moleküllerine bağlanarak translasyonu bastırarak veya mRNA'nın parçalanmasını sağlayarak düzenlerler (198).

### **2.3.2. Psikiyatrik hastalıklarda epigenetik modifikasyonların rolü**

Hayvan modelleri, stres tepkisinin moleküler temelini ve erken yaşam zorluklarının epigenetiğe etkisini incelemek için sıkça kullanılır. Sıçanlarda ve insanlarda tutarlı bir şekilde gözlenen bir bulgu, erken yaşam kötü muamelesine yanıt olarak, stres yanıtını düzenleyen HPA eksenine bağlı genlerin epigenetik olarak modifikasyonudur (199).

Hayvanlar üzerinde yapılan bir çalışmada, sıçan yavrularına verilen ebeveyn bakım kalitesinin, hipokampüsteki glukokortikoid reseptörü (GR) geni olan NR3C1'in epigenetik değişikleriyle ilgili olduğunu ve bu değişikliğin stres duyarlılığına neden olduğunu ortaya koymuştur (200). Bu gözlem, çocukluk çağı istismarı öyküsü olan intihar kurbanlarının hipokampüslerinde NR3C1 genindeki DNA metilasyon değişikliklerinin, çocukluk çağı istismarı öyküsü olmayan intihar kurbanları ve kontrol grubuna kıyasla farklı olduğunun tespit edilmesiyle insanlarda da doğrulanmıştır (201). Ek olarak, psikiyatrik hastalığı olan yetişkinlerdeki DNA metilasyonunun şiddeti ile çocuklukta maruz kalınan

kötü muamelenin şiddet ve sıklığı arasında doğrusal bir ilişki saptanmıştır (202).

Çocukluk dönemlerinde düşük düzeyde annelik bakımı alan yetişkinlerin kan hücreleri incelendiğinde, beyindeki birçok nöron türünün gelişimi, plastisitesi ve hayatta kalması için önemli olan bir büyüme faktörünü kodlayan, beyin kaynaklı nörotrofik faktör (BDNF) genindeki DNA metilasyon düzeyleri yüksek olarak bulunmuştur (203). Ayrıca, depresyonlu hastaların kanında, kontrol grubuna kıyasla BDNF geninin ifadesini bastıran metilasyon artışı saptanmış olup, bu değişiklik, intihar girişimi, düşüncesi ve antidepresan tedavisine kötü yanıtla ilişkilendirilmiştir (204).

SLC6A4 olarak adlandırılan serotonin taşıyıcı geninde, çeşitli çevresel stres faktörleriyle ilişkili olarak epigenetik değişiklikler gösterilmiştir. Bu durum, SLC6A4 promotöründeki polimorfizm ile çeşitli psikiyatrik durumlar arasında bir genetik ilişki olduğu için önemlidir (205).

Epigenomun geniş analizi, tek tek genler yerine nöroepigenomun daha kapsamlı bir şekilde haritalanmasına imkân verdi. Çocukluk istismarı, depresif bozukluk, bipolar bozukluk, şizofreni, otizm spektrum bozukluğu, yeme bozuklukları ve intihar eğilimi veya psikoz gibi ortak özelliklerin de dahil olduğu çeşitli psikiyatrik bozukluklarda, özgül türde epigenom bulunmuştur (206–211). Bu çalışmalar ayrıca önceden tanımlanmış HPA, monoaminerjik ve nörotrofik sistemlerin yanı sıra, etkilenen kişilerin beyinlerinde glutamaterjik, GABAerjik ve poliamin sistemlerine ait epigenetik değişikliklerin olduğunu ortaya koymuştur.

#### **2.4. Sirkadyen Genlerin Anksiyete ile İlişkisi**

Sirkadyen genler ile spesifik olarak anksiyete arasındaki

ilişkiyi araştıran çalışma sayısı az olsa da, diğer psikiyatrik bozukluklar araştırıldığı zaman anksiyetenin de değerlendirildiği bir çalışmada, CLOCK mutant (Clk $\Delta$ 19) farelerin kontrol grubuna göre, hayvanlarda anksiyete düzeyini ölçmek için kullanılan açık alan ve yükseltilmiş artı labirent testlerinde, daha düşük düzeyde anksiyete benzeri davranışlar sergilediği gösterilmiştir (212).

Merkezi sirkadyen düzenleyicinin bulunduğu SCN'nin sirkadyen ritmini bozmak, önemli davranış değişikliklerine yol açar. Sirkadyen ritimleri bozulmuş, SCN'si BMAL1'den yoksun fareler, kontrol farelerine göre daha fazla davranışsal umutsuzluk, anksiyete benzeri davranış ve çaresizlik gösterirler. BMAL1'in devredışı bırakılarak sirkadyen ritimlerin bozulması, farelerin potansiyel olarak tehlikeli ortamlardan kaçındığı aydınlık/karanlık kutu testinde anksiyete artışı lehine sonuç vermiştir (213).

Başka bir çalışmada, sirkadyen geni olan ROR $\beta$  delesyonuna uğramış farelerle normal fareler kıyaslanmış, delesyonlu farelerin uygulanan testlerde daha az anksiyöz davranışlar sergiledikleri tespit edilmiştir. Araştırmacılar bu çalışmada iki test kullanmış: açık alan testi ve yükseltilmiş artı labirent. Her iki test de fareleri yeni ve tanıdık olmayan ortamlara yerleştirerek, onlarda bir miktar kaygı hissi yaratmayı amaçlar. Açık alan testinde, genetik olarak değiştirilmiş fareler, normal farelerden daha korkusuz, daha meraklı ve yeni ortamı keşfetmeye daha istekli olarak gözlemlenmişler. Benzer şekilde, yükseltilmiş artı labirentte de bu fareler, daha az kaygı ile ilgili davranışlar sergileyerek, yeni durumlar ve ortamlara daha açık olarak değerlendirilmişler. Bu farelerin görme sorunları olduğu halde, genetik mutasyona ikincil yeni ortamlara karşı daha az kaygılı hale gelmeleri, sirkadyen gen ve anksiyete ilişkisi açısından önemli bir

bulgudur (214).

Sirkadyen ritim ve kaygı arasındaki olası bağlantının mekanizmasını anlayabilmek için, REV-ERB agonisti olan SR9011 deneysel ilacı fareler üzerinde denendi (215). Fareler, 3 ila 10 gün boyunca SR9011 ile tedavi edildi ve ardından kaygıya benzer davranışları çeşitli testler kullanarak değerlendirildi. Açık alan testinde, SR9011 ile tedavi edilen fareler, kaygılarının düşüklüğü ile uyumlu davranışlar sergileyerek, alanın merkezinde daha fazla zaman geçirdiler. İlacın kaygıyı azaltma etkisi, yükseltilmiş artı labirent, aydınlık/karanlık kutu testi gibi diğer testlerde de doğrulandı. Ayrıca, sosyal kaygıyı ölçen etkileşim testinde, tedavi edilmiş fareler ortama bırakılmış yeni fareyle daha fazla etkileşim gösterdiler. İlacın kaygıyı azaltma etkisi, yaygın olarak kullanılan bir kaygı ilacı olan klordiazepoksid ile gözlenen etkiye benzer büyüklükteydi. Çoğu anksiyolitik ajanın aksine, bu molekülün kaygıya benzer davranışları azaltırken, sirkadyen sistemide etkilediğini için uyanıklığı artırdığı da gözlemlendi. Sonuç olarak bu çalışma, REV-ERB agonisti olan SR9011 deneysel molekülünün, farelerde anksiyete benzeri davranışları azalttığı ve potansiyel olarak anksiyete tedavisine yeni bir yaklaşım sunabileceğini öne sürmektedir (216).

Araştırmacılar, sıçanlarda sirkadyen saat genlerinden olan CRY1 ve CRY2 ile psikiyatrik hastalıklarla ilgili davranışlar arasındaki bağlantıyı incelediklerinde, CRY 1 ve 2 proteinlerini üreten genlerdeki bozulmalarla, anksiyete ile ilgili davranışlar arasında doğrudan bir bağlantı olduğunu fark ettiler. CRY 1 ve 2 proteinlerinde eksikliği olan sıçanlar, anormal derecede yüksek anksiyete düzeyleri içeren davranışsal değişiklikler gösterdi. Bu, CRY 1 ve 2 proteinlerinin sadece sirkadyen ritimleri yöneten moleküler saati düzenlemede kritik bir rol oynamakla kalmayıp, aynı

zamanda anksiyete gibi duygusal durumları kontrol etmede de doğrudan etkisi olduğunu göstermiştir (207). Bir başka çalışmada, yüksek anksiyete düzeyine sahip (HAB) farelerdeki sirkadyen fenotipe gözlemlenen değişikliklerin moleküler mekanizmalarını anlamak için, duygudurum ve anksiyete bozukluklarında da önemli olan, hipokampus bölgesindeki sirkadyen düzeneklerin ifadesini incelediler. HAB farelerin hipokampal dokusunda hem mRNA hem de protein seviyelerinde CRY2 ifadesinde seçici bir azalma buldular. İlginç bir şekilde, HAB ve kontrol fareleri arasında anksiyete bozukluklarıyla ilgili bir başka beyin bölgesi olan frontal kortekste CRY2 ifadesinde herhangi bir fark bulunmadı. Bu farklılık, hipokampustan elde edilen sonuçların bölgeye özgü bir bulgu olduğunu ve anksiyete bozukluklarında değişmiş olabilecek hipokampusun seçici işlevlerinin düzenlenmesinde CRY2'nin bir rolü olabileceğine işaret etmektedir (2).

Hipokampus, stres yanıtının düzenlenmesinde kilit bir bölge olarak işlev görür ve kronik stres, nöronal aktivitede ve nöronal morfolojide değişikliklere yol açar. Hem insan hem de kemirgen çalışmaları, uzun süreli stres ve alkol maruziyetinin hipokampal atrofiye yol açtığını göstermiştir. Hayvan kullanılarak yapılan bir çalışmada, etanol ve stresin, hipokampal bölgedeki PER3 gen ifadesi üzerinde önemli etkileri olduğu görülmüştür. Etanol ve stresin PER3 ifadesini zıt yönde etkilediği, etanolün PER3'ün ifadesini artırdığı halde, kronik stres maruziyetinin tam tersi olarak azalttığı belirtilmektedir (217).

İnsanlar üzerinde yapılan bir çalışmada, PER3 genindeki tek nükleotid polimorfizminin (SNP) (rs228697) diurnal tercih ve artmış anksiyete ile önemli ölçüde ilişkili olduğu tespit edilmiştir. PER3 geni, sirkadyen dönemlerin uzunluğunun düzenlenmesinde rol oynar ve daha önce de insan

ruh hali üzerinde düzenleyici bir etkisi olduğu öne sürülmüştü (218).

Yakın zamanda yapılan bir çalışma, iyi tanımlanmış bir nüfus örneğinde, makine öğrenimini kullanarak, sirkadyen genlerle anksiyete belirtileri arasındaki ilişkiyi inceledi. Araştırma sonucuna göre: 1) PER3B, CLOCK3111, CRY1 ve CRY2 sirkadyen gen varyantlarının etkileşimi ile anksiyete belirtileri arasında güçlü bir ilişki mevcuttur; 2) Bu saat gen varyantlarının anksiyete belirtileri üzerinde cinsiyete özgü etkileri vardır, yani erkekler ve kadınlar üzerinde farklı etkileri bulunmaktadır. Kadınlarda, anksiyete ile ilişkisi en kuvvetli olan genler CLOCK3111 ve PER3B iken, erkeklerde ise PER2, PER3B, CRY2 ve CLOCK3111 ile kombinasyonlardır; 3) İç beden saati ve onun çevreyle uyumsuzluğu, özellikle akşamcıl kronotipine sahip bireylerde, anksiyete belirtileri ile bağlantılıdır. Bu çalışma, sirkadyen saat genlerindeki değişikliklerin, hem doğrudan, hem de dolaylı (iç saat aracılığıyla) şekilde anksiyete belirtileri üzerinde etkileri olduğunu öne sürmektedir (219).

### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu araştırma, Düzce Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun 17.11.2021 tarihli ve 2021-11-05 karar nolu onayı ile başlatılmıştır. Çalışmamız ayrıca, Düzce Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu tarafından 2022.04.03.1306 proje numarası ile desteklenmiştir. Deneyde kullanılan hayvanların temini ve deneyin kendisi Bezmialem Vakıf Üniversitesi Deney Hayvanları Laboratuvarında, metilasyon analizi ise İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Moleküler Hücre Araştırmaları Laboratuvarında gerçekleştirildi.

#### 3.1. Araştırma Gruplarının Oluşturulması ve Deney Hayvanlarının Bakımı

Bezmialem Vakıf Üniversitesi Deney Hayvanları Laboratuvarından temin edilen 4 aylık, 21 adet erişkin erkek Wistar Albino türü sıçanlar (250-300 gram) her bir grupta 7 adet olacak şekilde üç eşit gruba ayrıldı:

**1. Kontrol grubu** (Kontrol): 12/12 saat aydınlık/karanlık döngüsü uygulaması gerçekleştirildi.

**2. Deney grubu** (6A/18K): 12/12 saatlik aydınlık/karanlık döngüsü değiştirilerek, anksiyete oluşumunu tetiklemesi muhtemel olan aydınlıkta geçirilen sürenin kısaltılması hedeflendi. Bu amaçla, 6 saat aydınlık ve 18 saat karanlık olacak şekilde bu gruba yeni bir aydınlık/karanlık döngüsü uygulandı. (220,221).

**3. Deney grubu** (6A/18K + restrainer): 6/18 saatlik aydınlık/karanlık döngüsüne ek olarak, stres modeli oluşturulması amacıyla kullanılan ve hayvanın hareketsiz

kalmaya zorlandığı "rodent restrainer" kutusuna, gün içerisinde 4 saat süreyle hareketsiz kalacak şekilde yerleştirildi (222,223).

Çalışmada yer alan bütün sıçanlar 21 gün boyunca, 21-24°C'de, polikarbon kafeslerde, %18-20 protein içeren sıçan yemi ve su ile ad libitum olarak beslendi.

### 3.2. Kullanılan Davranış Testleri

Anksiyete ve depresyon ölçümü amacıyla, deneyde kullanılan sıçanların hepsine aşağıdaki tabloda yer alan üç farklı test uygulandı (Tablo 1).

**Tablo 1.** Kullanılan Davranış Testleri ve İlişkilendirildikleri Durumlar.

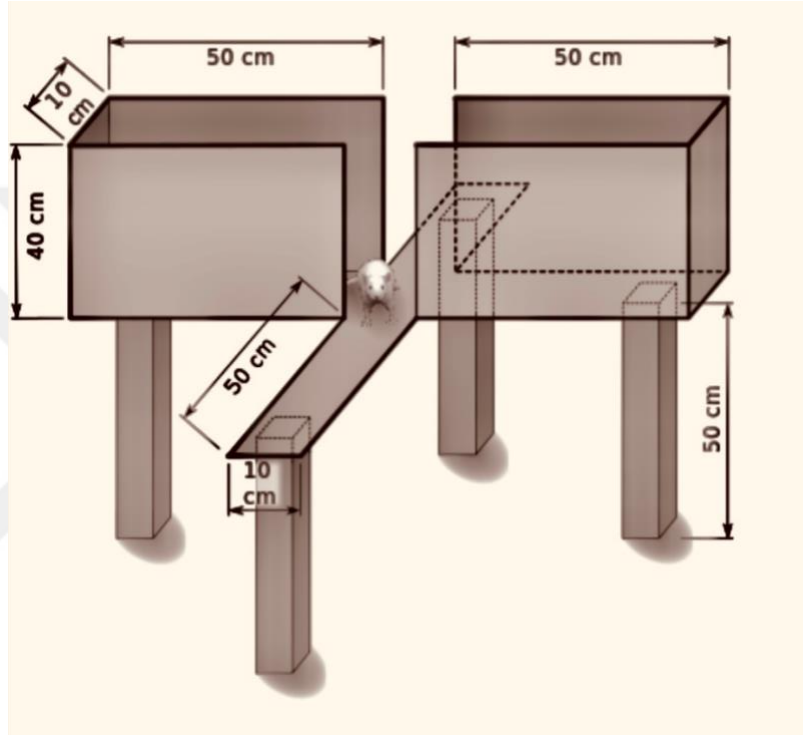
Anksiyete testleri	Depresyon Testi
Yükseltilmiş artı labirent testi	Zorunlu yüzme testi
Aydınlık-karanlık kutusu testi	

**Yükseltilmiş artı labirent (YAL) testi:** YAL artı (+) şeklinde karşılıklı iki açık ve iki kapalı koldan oluşur. Labirent yüksek bir konumda yer alır, bu da hayvanların korku ve anksiyete hislerini tetikler. (Şekil 1).

YAL testinde anksiyeteye işaret eden davranışlar değerlendirildi; kapalı ve açık kolda geçirilen süre, açık ve kapalı kollarda donakalma süresi ve şahlanma sayısı hesaplandı. Ek olarak sıçanlarda lokomotor aktiviteyle ilişkili olduğu varsayılan, açık ve kapalı kollara giriş sayısı da

hesaplandı.

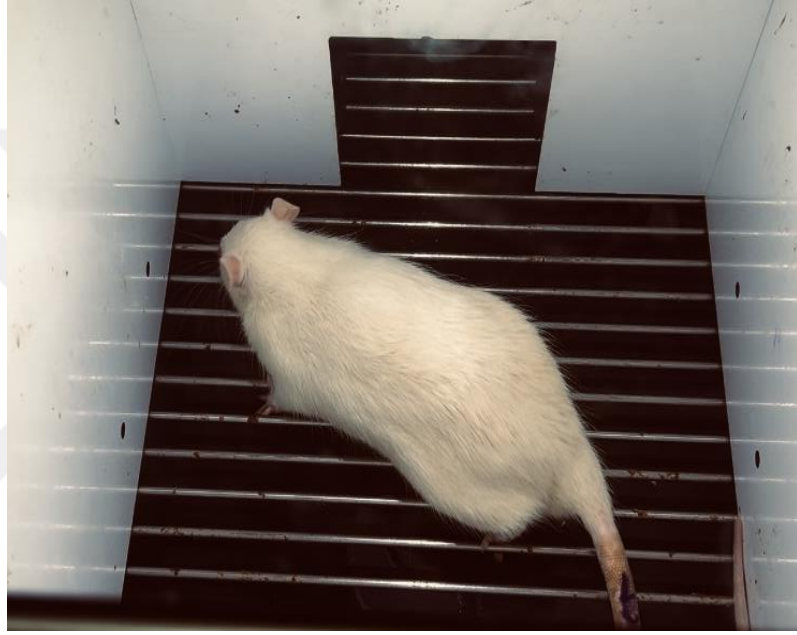
Her bir hayvan merkezi alana, yüzleri açık kola bakacak şekilde yerleştirildi. Beş dakika boyunca, Ethovision kamera sistemi deney sırasında hayvanların davranışlarının takip edilmesi için kullanıldı. Her denek sonrası, zemin %10'luk etanolle temizlendi, ardından temiz bezle kurulandı (224).



Şekil 1. YAL testi düzeneği ([https://en.wikipedia.org/wiki/Elevated\\_plus\\_maze](https://en.wikipedia.org/wiki/Elevated_plus_maze), Nisan 2023)

**Aydınlık-karanlık kutusu (AKK) testi:** Crawley ve arkadaşları tarafından geliştirilen test, anksiyete değerlendirmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu test, aydınlık (20x30x26 cm) ve karanlık (20x30x26 cm) odalar şeklinde iki bölüme sahip olan, hayvanların bölümler arası geçişine olanak sağlayan açıklığa (8x4,5 cm) sahip düzenek ile yapılmaktadır. Deney boyunca bölümler arasındaki geçiş açık

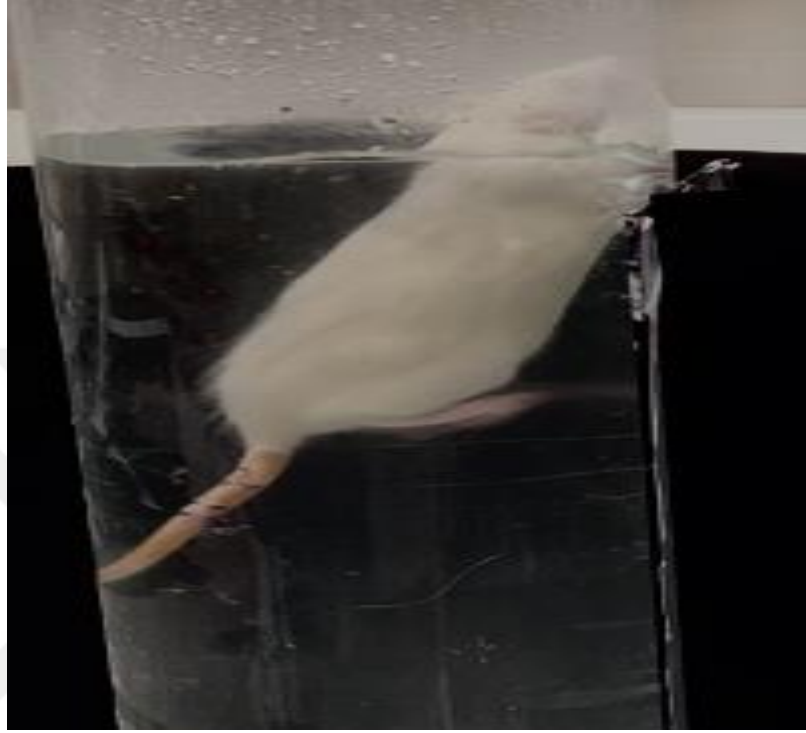
tutuldu (Şekil 2). Aydınlık odada başlanan testte, sıçanların davranışları beşer dakikalık sürelerle görüntülü olarak kayıt altına alındı. Aydınlık odada geçen süre, karanlık odada geçen süre ve bölmeler arası geçiş sayısı hesaplandı (225). Her denek sonrası AKK, hayvan feromonlarının test sonuçları etkilememesi için dışkı ve idrar kalıntıları açısından temizlendi, ardından zemin alkol bazlı dezenfektanla silindi ve kurulandı.



**Şekil 2.** Çalışmada kullanılan AKK testi (Aydınlık oda) uygulamasını gösteren temsili resim.

**Zorunlu yüzme (ZY) testi:** Hayvanın kaçamayacağı ve sabit tutunamayacağı genişlikte (60 cm yüksekliğinde ve 27 cm çapında), içindeki su sıcaklığı 20-25 °C arası olan bir silindir cam şişede zorunlu yüzme testi uygulandı (Şekil 3). İlk gün tüm sıçanlar, deney ortamına alışmaları amaçlanarak, ilgili yapıda 15 dakika boyunca yüzdürüldü. Yirmi dört saat sonra tekrar uygulanan bu testte, her bir sıçanın davranışları beşer dakikalık periyotlarla, görüntülü bir şekilde kayıt altına alındı.

Yüzme, tırmanma, sadece baş kısmının su üstünde olduğu ve hareketsiz kaldığı dönemler şeklinde davranışları skorlandı (226).



**Şekil 3.** Çalışmada kullanılan sıçanlar için ZY testi uygulamasını gösteren temsili resim.

### **3.3. Örneklerin Alınması ve DNA İzolasyonu**

Deney bitiminde, her bir kafesteki hayvan, ötanazi uygulamasından 12 saat önce aç bırakıldı. Ötanazi, intraperitoneal yolla 100-150 mg/kg pentobarbital uygulanarak ve sonrasında hayvanlara servikal dislokasyon yapılarak gerçekleştirildi. Sıçanlar dekapite edildikten sonra, kafa derileri yüzüldü ve medulla spinalis tarafından yaklaşılarak ince uçlu bir pensle kafatası uzaklaştırıldı. Beyinler, +4 °C HBSS (Hank's Balanced Salt Solution) içerisinde, final konsantrasyonu 5 mg/ml olacak şekilde, glikoz solüsyonuna

alındı ve sonrasında mikroskop altında, beyin atlası (Waxholm Space Sprague Dawley rat atlas) kullanarak Dumont No.5 forseps yardımıyla, amigdala, prefrontal korteks, hipokampus, dorsal raphe ve hipotalamusun bulunduğu bölgeler -80 derecede saklanmak üzere izole edildi. Metilasyon çalışmaları için geriye kalan beyin dokusu, buz üzerinde homojenizatör (Potter-Elvehjem Doku Homojenizatörü) kullanılarak homojenize edilmiştir.

Homojenize edilmiş beyin dokusundan, ticari bir kit (ZymoResearch Quick-DNA Miniprep Plus Kit) kullanılarak DNA izolasyonu yapıldı. DNA konsantrasyonlarının saflık ölçümleri, Thermo Fisher (Delaware, ABD) cihazında gerçekleştirildi. DNA örnekleri, NanoDrop aletine (Scientific™ 1000) 1'er µl yüklenerek konsantrasyonları belirlendi ve ardından örnekler -80 °C'de muhafaza edildi.

Metilasyon ölçümü için bisülfid modifikasyonu yöntemi altın standart olarak kabul edilmektedir (227). Bu yöntemde, DNA baz diziliminde metillenmemiş olan tüm sitozin bazları, kimyasal bir reaksiyonla urasile dönüştürülür. Metillenmiş sitozinler etkilenmez ve sitozin olarak kalır. Bu doğrultuda, DNA örnekleri (Zymo EZ DNA Methylation-Gold™ Kit) üretici firmanın tavsiye ettiği yöntemle tam uygun olarak işlendi. DNA konsantrasyonu ve saflık ölçümünden sonra örnekler -80 °C'de muhafaza edildi.

### **3.4. Metilasyon Analizi**

#### ***PZR Standart Değerlerinin Oluşturulması***

Standart oluşturulması için CpGenome Rat Unmethylated Genomic Standard DNA (Sigma) DNA'sı, metillenmemiş referans olarak kullanıldı. Metillenmiş referans

için CpGenome Rat Methylated Genomic Standard DNA (Sigma) kullanıldı. Standart DNA örneklerine bisülfite modifikasyon yöntemi uygulandı. Çalışmamızda plazmid kullanarak iki standart oluşturuldu; PER3 ve CRY2 metilasyon oranı tespiti için genin promotör bölgesinden MethPrimer (<https://www.urogene.org/cgi-bin/methprimer/methprimer.cgi>) programı ile primerler tasarlandı (Tablo 2).

**Tablo 2.** Primer dizisi elde edilecek ürün miktarı ve CpG adacık sayısı.

Gen adı	Primer dizileri	Elde edilen ürün miktarı	Elde edilen üründe CpG adacık sayısı
PER3	5'- TTTTGAGGTGTTTTGGATGTT -3' 5'- AAACACTTTTCTCCTCAACATATCC -3	182 bç	15 adet CpG adacığı
CRY2	5'-GTGAGGGGATTTTATTTTG-3' 5'-TAACCTCTATTCCCCAAACC-3'	142 bç	7 adet CpG adacığı

### ***PZR ve Agaroz Jel Elektroforezi***

- PZR işlemi ardından, agaroz jelden gene özgü PZR ürününün izolasyonu yapıldı.
- PZR sonrası ürünümüzün izolasyonu için “High Pure PCR Product Purification Kit“ (Roche) kullanıldı.
- PZR ürünü agaroz jelden gene özgül bant steril bisturi

- ile kesilerek tüpe aktarıldı.
- d. Her 100 mg agaroz başına 300 µl bağlanma tamponu eklendi.
  - e. 15-30 sn vortekslendi.
  - f. 56°C'de 10 dk inkübasyon yapıldı, ardından vortekslendi.
  - g. Her 100 mg için 150 µl izopropanol eklendi, vortekslendi.
  - h. Kit içinde bulunan toplama tüpüne filtreli kolon yerleştirildi ve örnek filtre üzerine aktarıldı.
  - i. Bir dakika boyunca santrifüj edildi ve alta biriken sıvı alındı.
  - j. Filtreli tüplerin üzerine 500 µl "Wash Buffer" eklendi ve 8000xg'de 1 dakika santrifüj edildi, bu iki kez tekrarlandı.
  - k. Filtreli tüpler santrifüjden çıkartılarak 1,5 ml'lik ependorf tüplerine yerleştirildi ve üzerine 200 µl "Elution Buffer" eklendi. 8000xg'de 1 dakika santrifüj edildi.
  - l. PZR ürünü -20°C' de muhafaza edildi.

### ***PER3 ve CRY2 Gen Dizisi Vektör Eşleme ve Transformasyon***

- a. PZR sonrası elde ettiğimiz 182 bç ve 142 bç'lik ürünler vektöre aktarıldı.
- b. Klonlanma pEGM-T Easy klonlama kiti (Promega) kullanarak yapıldı.
- c. Seçilen gen bölgesi, PZR ve klonlama işlemlerine başlamadan önce kontrol amaçlı klonlandı; plazmid izolasyonu yapıldıktan sonra elde edilen bölge,

dizileme yöntemi ile doğrulandı ve ardından ligasyon işlemi gerçekleştirildi.

- d. Ligasyonun ardından kısa santrifüj yapıldı, ardından her ligasyon reaksiyonundan 2 µl alınıp 15 ml'lik steril polipropilen tüplere aktarıldı.
- e. Kompetan hücreler -70°C'den alınıp buz üzerinde çözüldü ve her ligasyon reaksiyonuna 50 µl hücre eklendi.
- f. Pipetaj yapıldı ve buz üzerine alınarak 20 dk bekletildi.
- g. Isı şoku için 42 °C'de 45 saniye ardından tekrar buz üzerinde 1 dk bekletildi.
- h. 950 µl SOS medyumundan tüplere eklendi ve 37 °C'de 150 rpm'de çalkalamalı inkübatörde 1,5 saat inkübasyon yapıldı.
- i. Kültürden SOS medyumunu ile 1:1, 1:10, ve 1:50'lik dilüsyonlar yapıldı ve ardından 100 µl olarak LB/ampisilin/IPTC/X-gal petrilere yayıldı.
- j. STBL3 (Stable) kompetan hücrelerine transforme edildi ve üreyen beyaz renkli koloniler seçilerek sıvı besiyerine aktarıldı.

### ***Plazmid DNA Elde Etme ve Gerçek Zamanlı PZR ile CpG Metilasyon Oranının Belirlenmesi***

- a. 5 ml'lik ampisilinli LB içeren petrilere seçmiş olduğumuz bir koloni tüpe alındı ve gece boyu çalkalamalı inkübatörde (220 rpm) bekletildi.
- b. 1,5 ml'lik tüpler içine konulan karışım 5 dk 3000 rpm'de santrifüj edildi.
- c. Çöken hücreler 250 µl'lik P1(RNase) tamponu ile karıştırıldı.
- d. 250 µl P2 (lizis) tamponu eklendi ve iyice karıştırıldı.

- e. 350 µl N3 (SDS) tamponu eklendi ve iyice karıştırıldı (solüsyon beyaz bir renk alır).
- f. 10 dk 13000 rpm'de santrifüj edildi.
- g. Süpernatant spin kolonlarına aktarıldı ve 1 dk 13000 rpm'de santrifüj edildi.
- h. 0,75 ml PE yıkama tamponu eklenerek 1 dk 13000 rpm'de santrifüj edildi.
- i. Etanolü uzaklaştırmak için ekstradan 1 dk santrifüj yapıldı.
- j. Kolonlar 1,5 ml'lik tüplere yerleştirilerek üzerine 50 µl EB (10 mM Tris•Cl, pH 8.5) tamponu eklendi ve 1 dk bekleme süresinin ardından 1 dk santrifüj edildi.

İzolasyonda Qiagen QIAprep Miniprep Kiti kullanıldı. Standart eğri'nin hazırlanması için pGEM vektörüne klonlanmış olan, 182 bp'lik (PER3 temsil eden) ve 142 bp'lik (CRY2 temsil eden) ürün kullanıldı. PER3 ve CRY2 metilasyonu, Methylation Sensitive Melt Curve Analysis (Metilasyona Duyarlı Erime Eğrisi Analizi, MD-EEA) tekniği kullanarak değerlendirildi.

DNA erime eğrileri doğrusal bir sıcaklık geçişi sırasında flüoresan şiddeti ölçülerek elde edilir. Metillenmiş DNA, bisülfid modifikasyonundan sonra daha yüksek CpG içerdiği için erimeye karşı daha dayanıklı hale gelir. Sonuç olarak, flüoresan sinyali daha yüksek erime sıcaklıklarında kaydedilir. Bilinmeyen bir örneğin metilasyon durumu daha sonra erime profili ile karşılaştırılarak belirlenir. MD-EEA'da bisülfid ile muamele edilmiş DNA, metilasyondan bağımsız primerler ve EVA GREEN gibi çift sarmallı interkalasyon boyası ile PZR ile amplifiye edilir.

Çalışmamızda MD-EEA yönteminde kullanmak üzere CpG içermeyen fakat elde edilen üründe fazla miktarda CpG

adacağı bulunan primerler tasarlandı (Tablo 2). Gerçek zamanlı PZR tekniği kullanılmak suretiyle bir örnekteki bilinmeyen PER3, CRY2 metilasyon oranının bulunması için en uygun yol standart eğrileri kullanmaktır. Bu nedenle çalışmamızda daha önce bahsettiğimiz hem metillenmiş hem de metillenmemiş plazmidlerden %100, %75, %50, %25, %10, %0 metil oranında standartlar oluşturuldu. Elde ettiğimiz verilerden metilasyon yüzdesi belirlemek için oluşturduğumuz % standart kullanmak sureti ile hesaplandı. Bisülfittenmiş DNA aynı orana getirildikten sonra eşit şekilde dağıtıldı.

PZR protokolü (içeriği ve uygulanan işlemler) aşağıda verilmiştir.

**PZR Protokolü:**

Mix	5µl
H2O	2,8µl
Primer (F)	0,6µl
Primer (R)	0,6µl
DNA (10ng)	2µl

	<u>Sıcaklık</u>	<u>Zaman</u>	
Ön Denatürasyon	+95 °C	10 dk.	
Denatürasyon	+95 °C	15 sn.	} 40 döngü
Primer Bağlanması	+52 °C	30 sn.	
Zincir Uzaması	+60 °C	30 sn.	

Erime Eğrisi (Melt curve) analizleri için termal profil 95°C-15 sn, 60°C-1 dk, 0,2 derece artış ile 90°C-15sn olacak şekilde programlanmıştır.

***PER3 ve CRY2 Genlerinin Non-CpG Metilasyonu Açısından Değerlendirilmesi***

***Primer Tasarımı:***

PER3 ve CRY2 Non-CpG metilasyon durumunu belirlemek için kullanılan primer dizileri, ilgili bölgedeki non-CpG

adalarına özgül metile ve unmetile bölgeleri çoğaltmaya yönelik olarak, Methprimer (<https://www.urogene.org/cgi-bin/methprimer/methprimer.cgi>) ile dizayn edildi. Bu doğrultuda çalışmada kullanılan *PER3* ve *CRY2* non-CpG metile ve unmetile bölgelere özgü primer dizileri, Tablo 3 de verildi.

**Tablo 3:** Primer dizisi ve elde edilecek ürün miktarı

Gen adı	Primer dizileri	Elde edilen ürün miktarı
<i>PER3</i> Non-CpG Unmetile	5'- TTTTGAGGTGTTTTGGA -3'  5'- CTGAGGGGCACTTTTCTCCT -3'	189 bç
<i>PER3</i> Non-CpG Metile	5'- CGCTCTGAGGTGTTTCTGGA -3'  5'- CTGAGGGGCACTTTTCTCCT -3'	189bç
<i>CRY2</i> Non-CpG Unmetile	5'- TTGTTGATTAATGGAAT -3'  5'- GTTTTGGTTTGTTGTT - 3'	173 bç
<i>CRY2</i> Non-CpG Metile	5'- GCTGCCGACCAATGGAAC - 3'  5'- GGGTCTTGGTCTGCTGCT -3'	173 bç

### ***Gerçek zamanlı PZR ile CRY2 ve PER3 Non-CpG Metilasyon Oranının Belirlenmesi***

CRY2 ve PER3 non-CpG metilasyon miktarı eş zamanlı PZR yöntemiyle belirlendi. Bunun için uygun olan eksternal standart eğrileri hazırlandı. Standart referans DNA'ları kullanarak, hem PER3 hem de CRY2 genlerinin metile ve unmetile bölgelerini ayırdık. Bu süreçte, PER3 için hem metile hem de unmetile bölgeler, CRY2 için de metile ve unmetile bölgeler belirlendi. Bu işlem, daha önce belirttiğimiz protokolü izleyerek gerçekleştirildi. İşlem sonucunda, PER3 için 189 baz çifti ve CRY2 için 173 baz çifti uzunluğunda plazmidler elde edildi. Hem metile hem de unmetile özellik gösteren plazmidler, bakterilerde çoğaltıldı ve daha sonra ekstrakte edildi. Bu plazmidlerden, standartları temsil etmek üzere, 5 farklı konsantrasyon hazırlanmak için seri dilüsyonlar yapıldı. Her dilüsyonun Ct (Cycle threshold) değerlerini kullanarak, belirli bir standart eğrisi oluşturuldu. Bu eğri, her bir konsantrasyonun hesaplanması için kullanıldı. Bu yaklaşım, metile ve unmetile DNA miktarlarının hassas bir şekilde belirlenmesini sağladı.

Metile ve unmetile DNA profillerinin analizinde, örnekler eş zamanlı PZR yöntemi ile ABI StepOne Plus cihazında incelendi. Bu analizler, aşağıda belirtilen reaksiyon karışımı kullanılarak yapıldı. Bu yaklaşım, DNA'nın metile ve unmetile durumlarının aynı anda ve hassas bir şekilde belirlenmesini sağladı.

#### **PZR Protokolü:**

Mix	5µl
H2O	2,8µl
Primer (F)	0,6µl
Primer (R)	0,6µl
DNA (10ng)	2µl

	<u>Sıcaklık</u>	<u>Zaman</u>	
Ön Denatürasyon	+95 °C	10 dk.	
Denatürasyon	+95 °C	15 sn.	} 40 döngü
Primer Bağlanması	+57 °C	30 sn.	
Zincir Uzaması	+60 °C	30 sn.	

Çalışmada elde ettiğimiz konsantrasyonlardan kopya sayısı belirleyebilmek için ilgili web bağlantısını kullandık: <https://cels.uri.edu/gsc/cndna.html>. Metilasyon miktarı (%) =  $(\text{non-CpG metile kopya sayısı} / \text{non-CpG unmetile kopya sayısı} + \text{non-CpG metile kopya sayısı} \times 100)$  formülünden hesaplandı.

### 3.5. İstatistiksel Analiz ve Sonuçların Yorumlanması

Deneysel verilerin istatistiksel analizleri için GraphPad Prism 6 (deneme sürümü) programı kullanıldı. İlk olarak, verilerin normal dağılım gösterip göstermediği Shapiro Wilk testi ile kontrol edildi. Veriler normal dağılım gösteriyorsa, gruplar arasındaki farklar ANOVA testiyle, eğer normal dağılım göstermiyorsa Kruskal Wallis testiyle belirlendi. Anlamlı farklılıkların belirlenmesi için Bonferroni veya Dunn's testi gibi post-hoc analizler uygulandı. Veriler arasındaki korelasyon değerlendirilmesi için ise Spearman's Rho testi kullanıldı. Sonuçlar ortalama değer ve standart sapma olarak verildi. İstatistiksel anlamlılık için  $p < 0.05$  olan sonuçlar kabul edildi.

## 4. BULGULAR

ZY testi, YAL testi ve AKK testi yöntemleri, belirtilen prosedürlere uygun olarak gerçekleştirildi. Tüm grupların değerlendirmeleri, tarafsız bir gözlemci tarafından yapıldı. Grafiklerde sunulan veriler, ortalama ( $\pm$  SD) şeklinde gösterilmiştir ve anlamlılık değerleri \* sembolü ile belirtilmiştir.

### 4.1. Yükseltilmiş Artı Labirent Testi

Lokomotor aktivitenin değerlendirilmesinde parametre olarak kabul edilen YAL testi süresince kat edilen toplam mesafe, üç grup arasında benzer bulundu: 6A/18K + restrainer grubu test boyunca ortalama 1273 ( $\pm$ 434,9) cm hareket ederken, kontrol grubu 1238 ( $\pm$ 260,3) cm ve 6A/18K grubu ise toplamda 1372 ( $\pm$ 375,9) cm mesafe katetti ( $p>0,05$ ).

Çalışmamızdaki grupların açık kolda geçirdikleri süre göz önünde bulundurulduğunda, 6A/18K + restrainer grubunun kontrol grubuna göre açık kolda daha az süre geçirdiği görüldü ve ilgili süre istatistiksel açıdan anlamlı bulundu ( $p=0,0454$ ). 6A/18K grubunun ise kontrol grubuna göre açık kol üzerinde geçirdiği süre istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ( $p>0,05$ ) (Şekil 4A). YAL'daki kapalı kolda geçirilen süreyi değerlendirdiğimizde, gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır ( $p>0,05$ ) (Şekil 4B).

Gruplar arasındaki açık kola giriş sayılarını değerlendirdiğimizde, 6A/18K + restrainer grubunun kontrol grubuna göre daha az giriş yaptığı görüldü, ilgili durum istatistiksel olarak anlamlı bulundu ( $p=0,0336$ ). 6A/18K grubunun kontrol grubuna göre açık kola giriş sayısı ise istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ( $p>0,05$ ) (Şekil 5A).

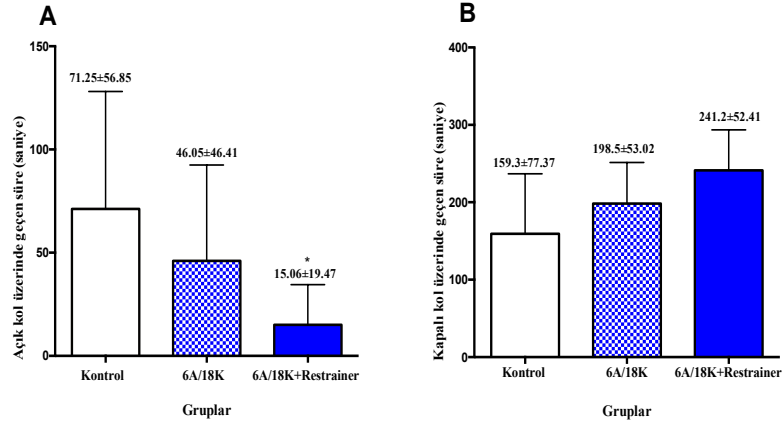
YAL'de kapalı kola giriş sayısına baktığımızda, gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ( $p>0,05$ ) (Şekil 5B).

Anksiyeteyi ifade eden diğer bir parametre olan şahlanma sayısı, gruplar arasında istatistiksel açıdan anlamsız bulundu ( $p>0,05$ ) (Tablo 4). Kapalı kol üzerinde donakalma süresi, gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farka neden olmadı ( $p>0,05$ ) (Tablo 4).

**Tablo 4:** Uyku ritmi bozukluğu ve hareket kısıtlaması ile oluşturulan anksiyete rat modellerinde YAL ve ZYT testlerinin bulguları

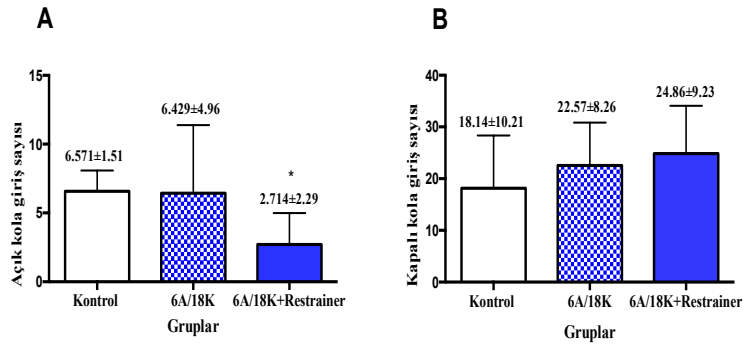
Anksiyete ve davranış ölçüm parametreleri	Gruplar	Ortalama $\pm$ standart sapma değerleri	P değeri
ZYT Hareketsiz Kalma (sn)	Kontrol	4,0 $\pm$ 1,4	$p>0,05$
	6A/18K	4,4 $\pm$ 1,7	
	6A/18K+Restrainer	4,1 $\pm$ 1,6	
ZYT Yüzme (sn)	Kontrol	280,10 $\pm$ 4,29	$p>0,05$
	6A/18K	280,40 $\pm$ 3,15	
	6A/18K+Restrainer	280,30 $\pm$ 3,90	
ZYT Tırmanma (sn)	Kontrol	15,86 $\pm$ 4,06	$p>0,05$
	6A/18K	15,14 $\pm$ 3,19	
	6A/18K+Restrainer	15,57 $\pm$ 3,78	
YAL Açık kolda şahlanma sayısı	Kontrol	0,28 $\pm$ 0,49	$p>0,05$
	6A/18K	0,43 $\pm$ 0,78	
	6A/18K+Restrainer	0,14 $\pm$ 0,38	
YAL Kapalı kolda şahlanma sayısı	Kontrol	10,29 $\pm$ 5,31	$p>0,05$
	6A/18K	13,00 $\pm$ 2,23	
	6A/18K+Restrainer	13,86 $\pm$ 4,45	
YAL Kapalı kolda donakalma süresi (sn)	Kontrol	2,714 $\pm$ 2,81	$p>0,05$
	6A/18K	8,14 $\pm$ 6,98	
	6A/18K+Restrainer	12,43 $\pm$ 21,20	
YAL Kat edilen toplam mesafe (cm)	Kontrol	1238 $\pm$ 260	$p>0,05$
	6A/18K	1372 $\pm$ 375	
	6A/18K+Restrainer	1273 $\pm$ 434	
YAL Deneklerin hızı (cm/sn)	Kontrol	4,51 $\pm$ 0,99	$p>0,05$
	6A/18K	4,84 $\pm$ 1,22	
	6A/18K+Restrainer	4,84 $\pm$ 1,02	
YAL Orta alanda geçen süre (sn)	Kontrol	76,41 $\pm$ 66,23	$p>0,05$
	6A/18K	39,13 $\pm$ 21,79	
	6A/18K+Restrainer	26,12 $\pm$ 27,82	

Anksiyete indeksi parametrelerden YAL testi süresince kat edilen toplam mesafe, hız, ZYT testinin ise tüm verileri gruplara göre normal dağıldığı belirlenmiştir. Elde edilen verilerin gruplara göre karşılaştırılmasında normal dağılım şartını sağlayan değişkenler için Ordinary one-way ANOVA (gruplar arasındaki anlamlı olan karşılaştırmalar Bonferroni) kullanılırken normal dağılım varsayımını sağlamayan değişkenler için Kruskal-Wallis (gruplar arasındaki anlamlı olan karşılaştırmalar Dunn's) testi kullanılmıştır. Gruplar arasındaki anlamlılık  $p<0,05$ .



İlgili verilerin normal dağılım göstermediği tespit edildi. Bu nedenle, gruplar arasındaki farklılıkları değerlendirmek için Kruskal-Wallis testi kullanıldı ve önemli farklılıklar Dunn's testi ile belirlendi. Grafiklerde yer alan rakamlar, ilgili grubun ortalama ± standart sapma (SD) değerlerini temsil etmektedir. Anlamlılık seviyesi  $p<0,05$  olarak belirtildi. Gruplar arasındaki anlamlılık düzeyleri şu şekildedir:  $p<0,05$  (\*) ve  $p<0,01$  (\*\*).

**Şekil 4.** YAL testinde açık (A) ve kapalı (B) kolda geçirilen süreler



YAL testinde açık (A) ve kapalı (B) kollara yapılan giriş sayıları için, verilerin normal dağılım göstermediği belirlendi. Bu durumda, gruplar arasındaki farkları belirlemek için Kruskal-Wallis testi kullanıldı ve önemli farklılıklar Dunn's testi ile tespit edildi. Grafiklerin üzerindeki rakamlar ilgili grubun ortalama ±SD değerleridir. Anlamlılık düzeyi  $p<0,05$  olarak belirtildi. Anlamlılık seviyeleri şu şekildedir:  $p<0,05$  (\*) ve  $p<0,01$  (\*\*).

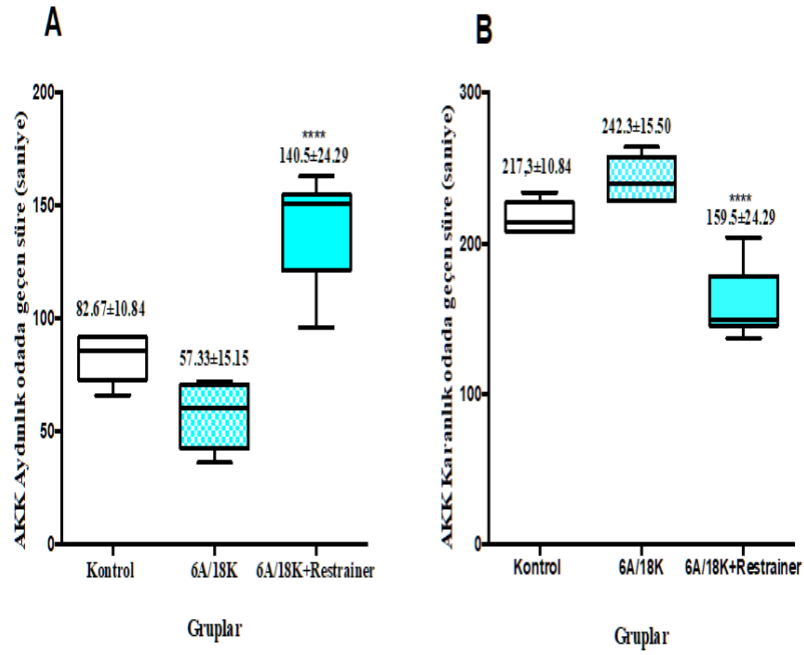
**Şekil 5.** YAL kollarına giriş sayısı. A) YAL üzerinde açık kola giriş sayısı B) YAL üzerinde kapalı kola giriş sayısı

## 4.2. Zorunlu Yüzme Testi

Depresyon açısından davranışların değerlendirmesi için kullanılan ZY testi sonuçlarına göre, gruplar arasında yüzme, tırmanma ve hareketsiz kalma hareketleri temel alındığında, hiçbiri istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar göstermedi ( $p>0,05$ ) (Tablo 4).

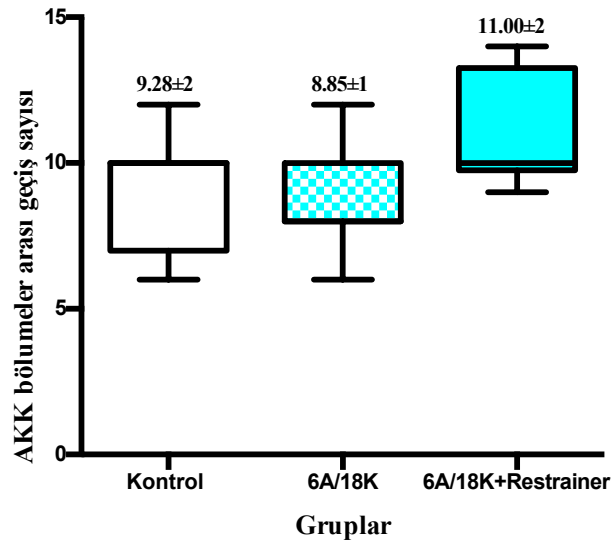
## 4.3. Aydınlık-Karanlık Kutusu Testi

AKK bulgularına göre, üç grup arasında 6A/18K + restrainer grubunun, kontrol ve 6A/18K grubuna göre aydınlık bölmede geçirdiği süre daha uzundu ve istatistiksel olarak anlamlı bulundu ( $p<0,001$ ) (Şekil 6A). Karanlık bölmede geçirdikleri süre karşılaştırılmasında, üç grup arasında 6A/18K + restrainer grubunun değerleri kontrol ve 6A/18K grubuna göre daha kısa ve istatistiksel olarak anlamlıydı ( $p<0,001$ ) (Şekil 6B). Bölmeler arası giriş-çıkış sayıları, gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark göstermedi ( $p>0,05$ ) (Şekil 7).



Veriler normal dağılım gösterdiği için, gruplar arasındaki farkları belirlemek amacıyla tek yönlü (one-way) ANOVA testi kullanıldı. Anlamlı farklılıklar Bonferroni testi ile tespit edildi. Değerler, ortalama ± standart sapma (SD) ve saniye cinsinden verilmiştir. Anlamlılık seviyeleri şu şekildedir:  $p < 0,05$  \* için anlamlı,  $p < 0,01$  \*\* için çok anlamlı,  $p < 0,001$  \*\*\* için oldukça anlamlı ve  $p < 0,0001$  \*\*\*\* için son derece anlamlı.

**Şekil 6.** AKK’da geçen süre. A) Aydınlık odada geçirilen süre  
B) Karanlık odada geçirilen süre (değerler sn olarak verilmiştir)



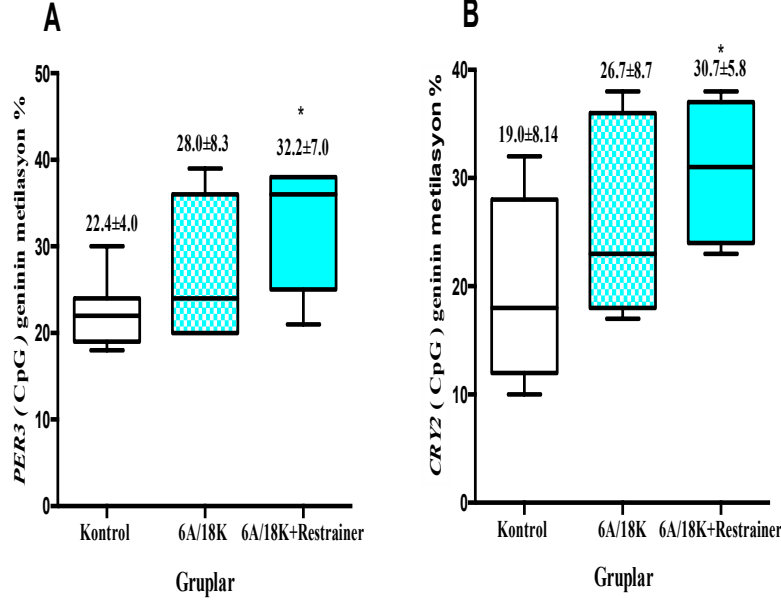
Verilerin normal dağılım gösterdiği görüldü, bu yüzden gruplar arasındaki farklılıkları belirlemek için tek yönlü ANOVA testi kullanıldı. Sonuçlar, ortalama ± standart sapma (SD) şeklinde ve saniye cinsinden sunuldu. Gruplar arasındaki farklılıkların istatistiksel anlamlılığı  $p>0,05$  seviyesinde değerlendirildi.

**Şekil 7.** Deney gruplarının AKK'da odalar arası geçiş sayısı.

#### 4.4 PER3 ve CRY2 Metilasyon Oranlarının Eş Zamanlı PZR Analizi

Üç grubun ilgili genlerinin metilasyon % miktarları ayrı ayrı karşılaştırıldı. Çalışma sonuçlarına göre, 6A/18K + restrainer grubunun CRY2 CpG metilasyon oranı kontrol grubuna göre daha yüksek bulundu ve bu fark istatistiksel olarak anlamlıydı. ( $p=0,0467$ ). CRY2 CpG metilasyon oranı açısından 6A/18K grubu, kontrol grubu ile karşılaştırmada istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermedi ( $p>0,05$ ) (Şekil 8B). PER3 CpG metilasyon oranı değerlendirildiğinde ise, 6A/18K + restrainer grubunun kontrol grubuna göre daha yüksek metilasyon oranına sahip olduğu ve bunun istatistiksel olarak anlamlı olduğu tespit edildi ( $p=0,0419$ ). PER3 CpG metilasyonu oranı açısından, 6A/18K grubu ile kontrol grubu

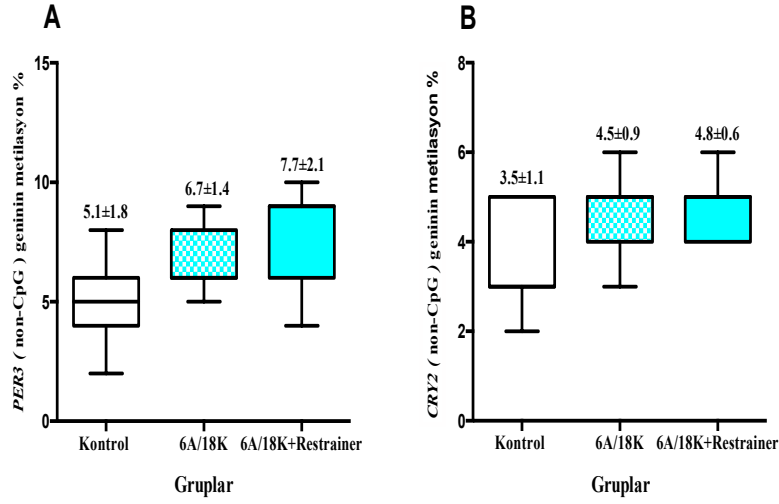
arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlenmedi. ( $p>0,05$ ) (Şekil 8A).



İlgili gen bölgelerinin metilasyon yüzdesi verileri normal dağılım göstermedi. Dolayısıyla, bu verilerin gruplar arası karşılaştırılmasında Kruskal-Wallis testi kullanıldı. Gruplar arasındaki anlamlı farklılıkları belirlemek için Dunn testi kullanıldı. Grafiklerin üzerindeki rakamlar ilgili grubun ortalama  $\pm$ SD değeridir. İstatistiksel anlamlılık seviyesi olarak  $p<0,05$  kabul edildi

**Şekil 8.** Uyku ritmi bozukluğu ve hareket kısıtlaması ile oluşturulan anksiyete rat modellerinde PER3 (A) ve CRY2 (B) genlerinin CpG metilasyon düzeyleri üzerine etkisi

Çalışmada üç grup arasında ayrı ayrı yapılan karşılaştırmalarda, PER3 non-CpG metilasyon oranları açısından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı ( $p>0,05$ ) (Şekil 9A). Benzer şekilde, CRY2 non-CpG metilasyon oranları da gruplar arası karşılaştırmada istatistiksel olarak anlamlı bir fark göstermedi ( $p>0,05$ ) (Şekil 9B).



Gruplar arasında belirli gen bölgelerinin metilasyon yüzdesi açısından normal bir dağılım gözlenmediği saptandı. Bu verilerin analizinde Kruskal-Wallis testi kullanıldı ve gruplar arasındaki önemli farklılıklar Dunn's testi ile belirlendi. İstatistiksel anlamlılık düzeyi  $p < 0,05$  olarak belirlendi.

**Şekil 9:** Uyku ritmi bozukluğu ve hareket kısıtlaması ile oluşturulan anksiyete rat modellerinde PER3 (A) ve CRY2 (B) genlerinin non-CpG metilasyon düzeyleri üzerine etkisi. Grafiklerin üzerindeki rakamlar ilgili grubun ortalama  $\pm$ SD değeridir.

#### 4.5. Korelasyon analizi

PER3 ve CRY2 CpG metilasyon seviyeleri ile anksiyete davranış (YAL ve AKK) testlerinin verilerinin korelasyon analizinde; kontrol grubunda PER3 CpG metilasyonu ile YAL'da açık kolda şahlanma sayısı arasında negatif korelasyon istatistiksel olarak anlamlı bulundu. Kapalı kola giriş sayıları ise PER3 CpG metilasyonu % ile pozitif korelasyon gösterdi (Tablo 5). Kontrol grubunda, diğer parametreler PER3 CpG metilasyonu korelasyonları açısından istatistiksel olarak anlamsızdı.

6A/18K grubunun PER3 CpG metilasyon seviyeleri ile anksiyete davranış testlerinden YAL'da açık kolda geçen süre arasındaki negatif korelasyon istatistiksel olarak anlamlı bulundu; diğer bütün parametreler korelasyon açısından istatistiksel olarak anlamsızdı.

6A/18K + restrainer grubunun PER3 CpG metilasyon seviyeleri ile YAL testinin açık kolda geçen süresi, açık kola giriş sayısı ve açık kolda şahlanma sayısı arasındaki negatif korelasyon istatistiksel olarak anlamlı bulundu (Tablo 5).

Kontrol grubunun CRY2 CpG metilasyonu ile YAL'da açık kolda geçirilen süre arasındaki negatif korelasyon istatistiksel olarak anlamlı bulundu (Tablo 5). Kontrol grubunda, diğer parametreler CRY2 CpG metilasyonu korelasyonları açısından istatistiksel olarak ilişkili bulunmadı.

6A/18K grubunun CRY2 CpG seviyeleri ile anksiyete davranış testlerinden YAL'da açık kolda geçen süre ve açık kolda şahlanma sayısı arasındaki negatif korelasyon istatistiksel olarak anlamlı bulundu. (Tablo 5).

6A/18K + restrainer grubunun CRY2 CpG metilasyon seviyeleri ile YAL testinde açık kolda geçirdiği süresi, açık kola giriş sayısı ve açık kolda şahlanma sayısı arasındaki negatif korelasyon istatistiksel olarak anlamlı bulundu (Tablo 5).

**Tablo 5:** Uyku ritmi bozukluğu ve hareket kısıtlaması ile oluşturulan rat modellerinde CRY2 ve PER3 genlerinin CpG metilasyon % düzeyleri ile anksiyete index değerlerinin korelasyon analizi

	Kontrol PER3 CpG metilasyon n%	6A/18K PER3 CpG metilasyon n%	6A/18K + Restrained PER3 CpG metilasyon n%	Kontrol CRY2 CpG metilasyon n%	6A/18K CRY2 CpG metilasyon n%	6A/18K + Restrained CRY2 CpG metilasyon n%
YAL açık kol üzerinde geçen süre (saniye)	r= -0,558 p=0,185	r=-0,857 p=0,023*	r=-0,923 p=0,014*	r=-0,937 p=0,003**	r= -1 p=0,0004***	r= -0,852 p=0,014*
YAL açık kola giriş sayısı	r=0,321 p=0,482	r=-0,396 p=0,355	r=-0,952 p<0,0001****	r=-0,146 p=0,731	r=-0,630 p=0,126	r=-0,752 p=0,04*
YAL açık kolda şahlanma sayısı	r=-0,797 p<0,0001****	r=-0,534 p=0,095	r=-0,635 p<0,0001****	r=-0,478 p=0,09	r=-0,668 p<0,001**	r=-0,612 p<0,0001****
YAL kapalı kol üzerinde geçen süre (saniye)	r=0,450 p=0,315	r=0,892 p=0,012	r=0,815 p=0,038*	r=0,684 p=0,1	r=0,928 p=0,006*	r=0,785 p=0,04*
YAL kapalı kola giriş sayısı	r=0,846 p=0,024*	r=0,072 p=0,892	r=-0,542 p=0,169	r=0,522 p=0,239	r=-0,109 p=0,781	r=-0,396 p=0,357
YAL kapalı kolda şahlanma sayısı	r=0,554 p=0,202	r=-0,555 p=0,183	r=0,243 p=0,60	r=0,745 p=0,061	r=-0,4818 p=0,2595	r=0,522 p=0,234
YAL Kapalı kolda donakalma süresi (saniye)	r=0,633 p=0,142	r=0,810 p=0,038	r=0,077 p=0,057	r=0,165 p=0,696	r=0,558 p=0,205	r=0,535 p=0,235
AKK aydınlık kutuda geçen süre (saniye)	r=0,695 p=0,144	r=0,542 p=0,297	r=-0,154 p=0,633	r=0,811 p=0,072	r=0,828 p=0,058	r=-0,695 p=0,105
AKK karanlık geçen süre (saniye)	r=-0,695 p=0,122	r=-0,405 p=0,388	r=0,154 p=0,80	r=-0,753 p=0,077	r=-0,521 p=0,272	r=0,696 p=0,138
AKK kutular arası giriş çıkış sayısı	r=0,338 p=0,666	r=0,470 p=0,344	r=0,548 p=0,350	r=0,338 p=0,666	r=0,441 p=0,411	r=0,431 p=0,393

Elde edilen verilerin gruplara göre korelasyon değerlendirilmesi Spearman's Rho testi ile yapılmıştır. Korelasyon p<\*0,05, \*\*0,01, \*\*\*0,001, \*\*\*\*0,0001 düzeyinde anlamlıdır

## 5. TARTIŞMA

Son yıllarda, giderek artan sayıda kanıt, sirkadyen genler ve anksiyete arasında önemli bir ilişki olduğunu öne sürmektedir. Sirkadyen sistem, uyku ve uyanıklık ritimleri, hormonların salgılanma zamanlaması ve duygusal durumun kontrolü gibi hayati davranışları ve fizyolojik işlevleri düzenleyen karmaşık bir dizi moleküler, hücresel ve fizyolojik etkileşimlerden oluşur (166,228). CLOCK, BMAL1, PER1-3 ve CRY1-2 gibi sirkadyen genler, bu sistemin kritik bileşenleridir ve sirkadyen ritimlerin oluşumunda ve düzenlenmesinde önemli roller oynar (229,230). Bu genlerin yapısının veya ifadelerinin bozulması, duygudurum ve anksiyete bozukluklarının gelişimine yol açmaktadır (231,232).

Bu çalışmada, sirkadyen genler ve anksiyete arasındaki ilişkiyi daha ayrıntılı incelemeyi amaçladık. Artan sayıda literatür, sirkadyen genlerdeki değişikliklerin, özellikle CRY2 ve PER3'ün, hayvan modellerinde ve insanlarda anksiyete benzeri davranışlarla ilişkili olduğunu ortaya koymaktadır (218,233–235). Ayrıca, son araştırmalar, DNA metilasyonu gibi epigenetik değişikliklerin, gen ekspresyonunu düzenlemede ve anksiyete bozukluklarının patofizyolojisine katkıda bulunmada önemli olduğunu vurgulamaktadır (236,237).

Bu bulgular ışığında, çalışmamız, CRY2 ve PER3 genlerinin metilasyonu ile kemirgen modelinde anksiyete benzeri davranışlar arasındaki ilişkiyi incelemeyi amaçlamıştır. Ayrıca, stres ve diğer çevresel faktörlerin epigenetik değişiklikleri indükleyerek gen ekspresyonunu düzenleyebileceğini ve anksiyete bozukluklarının gelişimine katkıda bulunabileceğini belirten önceki araştırmalara

dayanarak, çevresel faktörlerin bu ilişkileri düzenlemedeki potansiyel rolünü incelemeyi hedefledik.

YAL testinde, hem sirkadyen ritim bozukluğuna hem de kısıtlama stresine maruz kalan deney grubu (6A/18K + restrainer grubu), kontrol grubuna kıyasla artmış anksiyete benzeri davranışlar sergiledi. Bu durum, YAL testinde anksiyete lehine yorumlanan, açık kollarda geçirilen sürenin azalması ve açık kol girişlerinin azalması ile ilişkilendirildi. Önceki araştırmalar, sirkadyen ritim bozukluğunun ve kısıtlama stresinin, hayvan modellerinde bağımsız olarak anksiyete benzeri davranışlara katkıda bulunabileceğini göstermiştir (233,238). Bununla birlikte, çalışmamız anksiyete gelişiminde tek faktör yerine birden fazla çevresel olayın patogeneizde rol oynadığı varsayımına dayanarak aynı anda iki farklı stresöre maruz kalmanın sinerjistik etki ile anksiyete bulgularını artırdığını göstermiştir. Ek olarak, yalnızca sirkadyen ritim bozukluğuna maruz kalan grup (6A/18K grup), kontrol grubuyla karşılaştırıldığında anksiyete benzeri davranışlarda anlamlı bir fark göstermedi. Bu bulgu, bu özel deneysel düzende, sirkadyen ritmi tek başına manipüle etmenin anksiyete benzeri davranışları ortaya çıkarmak için yeterli olmayabileceğini göstermektedir.

AKK testindeki bulguları incelediğimizde, 6A/18K + restrainer grubu, aydınlık odada daha fazla zaman geçirerek, YAL testinde sergilediği anksiyöz davranışı destekleyen bulgulara aksi bir davranış sergilemiştir. Bu farklılığın olası bir açıklaması, ek stres faktörün (kısıtlama stresinin), AKK testinde farklı bir yanıtta katkıda bulunarak, aydınlık bölmede geçirilen sürenin artmasına neden olmasıdır. Önceki çalışmalar, kısıtlama stresinin bazı bağlamlarda AKK testinde anksiyolitik etkilere yol açabileceğini bildirmiştir. Cancela ve ark. tarafından yapılan çalışmada, 7 ardışık kısıtlama uygulamasına

maruz kalan Wistar türü sıçanlar, AKK testindeki aydınlatılmış alanda geçirilen süre ve geçiş sayısında önemli bir artış göstererek, anksiyolitik etkiye benzer davranışlar sergilediler (239).

Araştırmalar, anksiyete bozukluğu teşhisi konmuş bireylerin yaklaşık yarısında depresyon belirtilerinin de bulunduğunu ve bunun tam tersinin de geçerli olduğunu göstermektedir (102,240). Bu komorbiditeyi tespit edebilmek için preklinik çalışmalar, ZY ve YAL gibi davranış testlerini kullanarak, hayvan modellerinde anksiyete ve depresyon benzeri davranışları değerlendirmeye çalışmışlardır. Çalışmamızda da benzer şekilde bu komorbiditenin olası varlığını sorgulamak amacıyla depresyon açısından en sık kullanılan davranış testi olan ZY kullanılmıştır (241). Sonuçlara bakıldığında, yüzme, tırmanma ve hareketsizlik davranışları açısından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık görülmedi. Daha önce yapılan bazı araştırmalarda, stres kaynaklı davranış değişikliklerinin, örneğin kaygı gibi, her zaman depresyon benzeri davranışlarla ilişkili olmadığı bulunmuştur (242,243). Bu da stresin anksiyete ve depresyon üzerindeki etkilerinin farklı deneysel ortamlarda farklı şekillerde ortaya çıkabileceğini veya uygulanan spesifik stres faktörlerine bağlı olabileceğini düşündürmektedir. Sonuç olarak, ZY testinde anlamlı farklılıkların olmaması, bu çalışmada kullanılan stres manipülasyonlarının depresyon benzeri davranışlar üzerinde çok daha az etkili olduğunu ve daha çok anksiyete benzeri davranışları tetiklediğini göstermektedir.

Çalışmamız, kontrol grubuna kıyasla, 6A/18K + restrainer grubunun CRY2 ve PER3 CpG metilasyon oranlarında anlamlı bir artış olduğunu ortaya koymaktadır. Bu sonuç, stresin sirkadyen ritim manipülasyonu ile

birleştirildiğinde, sirkadyen genlerin metilasyon seviyelerinde değişikliklere yol açabileceğini göstermektedir. Bununla birlikte, kontrol grubu ile 6A/18K grubu arasında CRY2 ve PER3 genlerinin CpG metilasyon oranları açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmemiştir. Bu bulgu, ek bir stresörün olmaması durumunda, sirkadyen ritim manipülasyonunun, tek başına ilgili sirkadyen genlerin metilasyon seviyelerinde önemli değişikliklere yol açma konusunda yeterli olmayabileceğini düşündürmektedir.

PER3 ve CRY2 genlerinin non-CpG metilasyon oranları incelendiğinde ise gruplar arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark olmadığı görüldü. Anlamlı bir farkın olmaması, çalışmada göz önünde bulundurulmuş faktörlerin, ilgili genlerin non-CpG metilasyon oranları üzerinde önemli bir etkiye sahip olmadığını ima etmektedir.

Stres ve sirkadyen ritim manipülasyonları ile sirkadyen gen metilasyonları arasındaki ilişkiyi direkt olarak inceleyen araştırma sayısı yetersiz olsa da, mevcut literatür ışığında, bulgularımız stres maruziyeti ve sirkadyen gen ifadesindeki değişiklikler arasındaki ilişkiyi gösteren önceki çalışmalarla uyumludur. Örneğin, Zohar ve ark. (2011) tarafından yapılan bir çalışma, avcı koku stresine maruz kalmanın, PER1 ve PER2 sirkadyen saat genlerinin protein ve mRNA seviyelerindeki değişikliklerle ilişkili olduğunu göstermiştir. Bulgular, stres maruziyetinden kaynaklanan davranışsal bozulmanın derecesi ile hipokampal alt bölgelerde ve aynı zamanda frontal korteks ve SCN alanlarında sirkadyen ritimle ilgili gen ifadesinin uzun vadeli değişimleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki olduğunu göstermiştir. İlgili çalışma, stresin sirkadyen genlerin düzenlenmesi üzerinde önemli bir etkisi olabileceğini ve bu durumun bireyin davranış ve fizyolojisi üzerinde çeşitli yönlerde etkili olabileceğini belirtmektedir. İncelenen özel

genler ve stresörler farklı olsa da, ilgili araştırmada da stres maruziyeti ile sirkadyen gen düzenlemesindeki değişiklikler arasında bağlantı dikkat çekiyor (244).

Çalışmamız, PER3 ve CRY2 genlerinin CpG metilasyon seviyeleri ve anksiyete belirtileri gösteren davranışlar arasında belirgin ilişkiler saptamıştır. Bu ilişkiler, hem 6A/18K sirkadyen ritim değişikliğini hem de fiziksel kısıtlamayı deneyimleyen grup içinde özellikle belirgindi. Bu bulgu, sirkadyen ritimlerin bozulması ve stresle karşılaşmanın anksiyete benzeri davranışları etkileyebileceğini ileri süren geniş çaplı bilimsel literatürle tutarlıdır (245–248).

Kontrol grubunda - yani ne sirkadyen ritim değişikliği ne de kısıtlama stresi yaşayan sıçanlarda - PER3 geninin CpG metilasyon seviyeleri ve YAL açık koldaki şahlanma sayısı arasında negatif bir ilişki bulduk. Bu, daha yüksek metilasyon seviyelerinin azalmış keşfetme davranışıyla ilişkili olabileceğini, yani artan anksiyete belirtisi olabileceğini gösteriyor (249). Benzer şekilde, PER3 geninin CpG metilasyon seviyeleri ve YAL'ın kapalı koluna girme sayısı arasında pozitif bir ilişki gözlemlendi. Bu bulgu, anksiyete belirtisi olan sıçanların genellikle güvenli kapalı alanları tercih ettiklerini destekleyen literatür bilgisiyle uyumludur (224). İlginçtir ki, sadece sirkadyen ritim değişikliği yaşayan 6A/18K grubunda bu tür ilişkiler gözlenmemiştir. Bu, sirkadyen ritim değişikliğinin tek başına bu davranışları önemli ölçüde etkilemeyebileceğini düşündürmektedir. Buna karşın, hem sirkadyen ritim değişikliği hem de fiziksel kısıtlama yaşayan 6A/18K + restrainer grubunda, hem PER3 hem de CRY2 genlerinin CpG metilasyon seviyeleri ve anksiyete belirtisi gösteren birkaç davranış ölçütü arasında negatif bir ilişki gözlemlendi. Bu ölçütler, YAL'ın açık kolunda geçirilen süre, açık kola girme sayısı ve açık kolda yapılan şahlanma sayısını

içeriyordu. Bu bulgular, sirkadyen ritim bozukluğunun ve stres maruziyetinin birleşiminin, PER3 ve CRY2 genlerinin CpG metilasyon seviyelerinde görülen önemli epigenetik değişikliklere yol açabileceğini ve bu değişikliklerin sırayla anksiyete ile ilişkili davranışları etkileyebileceğini göstermektedir.

Bulgularımız, sirkadyen ritim bozuklukları, epigenetik değişiklikler ve anksiyete benzeri davranışlar arasındaki karmaşık ilişkiyi vurgulayan literatürle benzerlikler taşıyor. PER3 ve CRY2 genlerinin CpG metilasyon seviyeleri ile anksiyete benzeri davranışlar arasında gözlemlediğimiz belirgin korelasyonlar, uyku kalitesi ve genç yetişkinlerdeki zihinsel sağlık arasında çift yönlü ilişkiler olduğunu öneren araştırmalarla paralellik gösteriyor (250). Li ve ark. çalışması, hem zayıf uyku kalitesinin zihinsel sağlık belirtilerini kötüleştirebileceğini hem de tersinin doğru olabileceğini göstermiştir. Bu çalışmada ve bizim çalışmamızda ortak bir faktör, epigenetik değişiklikler gibi görünüyor. Li ve arkadaşları, uyku kalitesi ve zihinsel sağlık arasındaki bağlantının altında yatan potansiyel bir mekanizma olarak özellikle PER3 genindeki DNA metilasyon değişikliklerini belirlemiştir. Benzer şekilde, bizim çalışmamızda da, PER3 geninin yüksek metilasyon seviyesinin, özellikle hem sirkadyen ritim bozukluğuna hem de stres maruziyetine uğrayan grupta, artmış anksiyete benzeri davranışlarla ilişkili olduğunu bulduk. Bu, uyku kalitesi, zihinsel sağlık ve sirkadyen ritim bozuklukları arasındaki etkileşimin, en azından kısmen, epigenetik değişiklikler aracılığıyla gerçekleşebileceğini düşündürmektedir. Dahası, çalışmamız bu anlayışı genişleterek, sirkadyen ritim bozukluğu ve stres maruziyetinin birleşik etkisinin, anksiyete benzeri davranışları etkileyen önemli epigenetik değişikliklere yol açabileceğini

önermektedir.

CRY1-2 mutantları üzerinde yapılan bir çalışmada, bu kritik sirkadyen genlerinin eksikliği durumunda bilişsel işlev bozukluğu ve anksiyete ile ilişkili davranışlar gözlenmiştir (235). Araştırmamız, CRY2 geninde hipermetilasyonun artan anksiyete benzeri davranışlarla ilişkisini tespit etmiş olup, ilgili araştırmadaki bulgularla paralellik göstermektedir. CpG adacıklarında hipermetilasyon genellikle gen ifadesinin azalmasına yol açar (251). Bu nedenle, çalışmamızda gözlemlediğimiz hipermetilasyonun, CRY2 geninin daha düşük ekspresyonuna yol açarak, kriptokrom silme çalışmasında görülen etkileri taklit etme olasılığı vardır.

### **5.1. Çalışmanın Kısıtlılıkları**

Araştırmamızın kısıtlılıkları belirli unsurlar üzerine odaklanmış olmaktan kaynaklanmaktadır. Çalışmamızda belirli bir yaş ve cinsiyetteki sıçanları inceledik, bu durum sonuçların genelleştirilebilirliğini sınırlamaktadır. Cinsiyet ve yaş farklılıklarının epigenetik mekanizmalar ve anksiyete benzeri davranışlar üzerindeki potansiyel etkisini göz ardı etmiş olabiliriz. Ayrıca, yalnızca belirli sirkadyen ritim genlerinin metilasyonunu analiz ettik. Ancak, sirkadyen ritimlerin düzenlenmesi ve anksiyete benzeri davranışlar arasındaki ilişki, muhtemelen çok daha karmaşık bir genetik ve epigenetik düzlemde gerçekleşir. Bu nedenle, gelecek çalışmaların çok daha geniş bir gen setini ve belki de farklı epigenetik mekanizmaları incelemesi gerekmektedir.

Anksiyete belirtilerini değerlendirmek için kullandığımız davranış testleri sayısı da sınırlıydı, bu durum daha geniş bir davranış spektrumunu incelememize engel

olmuştur. Sıçanların gece aktif (nokturnal) hayvanlar olması ve deneylerin gündüz saatlerinde gerçekleştirilmesi, sonuçları etkilemiş olabilir. Çalışmamızda sadece kısıtlama türü strese maruz kalan bir grubun yokluğu, kısıtlama türü stresinin tek başına anksiyete belirtilerini ve sirkadyen genlerde metilasyonu ne ölçüde etkilediği konusunda net bir fikir edinmemizi engellemiştir.

Dahası, hayvan modelleri, biyolojik mekanizmaları ve karmaşık davranışları inceleme konusunda değerli araçlar olmasına rağmen, elde ettiğimiz bulguların insanlarda anksiyete belirtileri ile sirkadyen ritim genleri arasındaki potansiyel ilişkiyi doğrudan sorgulama yeteneği sınırlıdır. Yani, hayvanlarda elde ettiğimiz bulgular, insanlarda tam olarak aynı sonuçlara yol açmayabilir. Bu sebeplerle, çalışmamızın sonuçlarının genelleştirilmesi ve yorumlanması konusunda dikkatli olunması gerekmektedir.

## 6. SONUÇLAR

Çalışmamız, sirkadyen genlerin metilasyon düzeyleri ve anksiyete benzeri davranışlar arasındaki ilişkiyi incelemiştir. Bulgularımız, CRY2 ve PER3 genlerindeki CpG metilasyon değişikliklerinin, anksiyete benzeri davranışlarda belirgin bir artışla ilişkili olduğunu göstermiştir.

Bu sonuçlar, sirkadyen ritim bozukluğu ile birlikte kısıtlama stresine maruz kalan hayvanlarda en belirgindir. İlginç bir şekilde, sadece sirkadyen ritim bozukluğuna maruz kalan grupta, anksiyete benzeri davranışlar açısından istatistiksel olarak anlamlı bir artış görülmemiştir. Bu, sirkadyen ritim bozukluklarının tek başına anksiyete benzeri davranışları tetiklemek için yeterli olmayabileceğini düşündürmektedir.

Ayrıca araştırmamız, gen metilasyon seviyelerindeki değişikliklerin, stres ve sirkadyen ritim bozukluklarının sinerjistik etkisiyle oluşabileceğine dair bazı kanıtlar sunmaktadır.

Sonuç olarak, bu çalışma, sirkadyen genler ve anksiyete arasındaki ilişkiyi daha iyi anlamamıza katkı sağlayabilecek yeni veriler sunmaktadır. Çalışmamızda incelenen CRY2 ve PER3 genlerinin CpG metilasyon düzeylerinin, anksiyete bozukluklarının patofizyolojisi ve tedavisinde potansiyel bir hedef olabileceğini düşündürmektedir. Ancak, mevcut sonuçları genellemek için daha geniş ölçekli çalışmalara ve farklı popülasyonlarda doğrulamaya ihtiyaç vardır. Ayrıca, gen metilasyonunun anksiyete bozukluklarının patofizyolojisi üzerindeki etkisini tamamen anlamak için daha fazla çalışma yapılması gerekmektedir. Bu, gelecekteki tedavi stratejilerinin geliştirilmesine yardımcı olabilir.

## 7. KAYNAKLAR

1. Sipilä T, Kananen L, Greco D, Donner J, Silander K, Terwilliger JD, et al. An association analysis of circadian genes in anxiety disorders. *Biol Psychiatry*. 2010 Jun 15;67(12):1163–70.
2. Griesauer I, Diao W, Ronovsky M, Elbau I, Sartori S, Singewald N, et al. Circadian abnormalities in a mouse model of high trait anxiety and depression. *Ann Med*. 2014 May;46(3):148–54.
3. Schuch JB, Genro JP, Bastos CR, Ghisleni G, Tovo-Rodrigues L. The role of CLOCK gene in psychiatric disorders: Evidence from human and animal research. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*. 2018 Mar;177(2):181–98.
4. Bron TI, Bijlenga D, Kooij JJS, Vogel SWN, Wynchank D, Beekman ATF, et al. Attention-deficit hyperactivity disorder symptoms add risk to circadian rhythm sleep problems in depression and anxiety. *J Affect Disord*. 2016 Aug;200:74–81.
5. Jansen EC, Dolinoy D, Peterson KE, O'Brien LM, Chervin RD, Cantoral A, et al. Adolescent sleep timing and dietary patterns in relation to DNA methylation of core circadian genes: a pilot study of Mexican youth. *Epigenetics*. 2021 Aug;16(8):894–907.
6. Hing B, Gardner C, Potash JB. Effects of negative stressors on DNA methylation in the brain: implications for mood and anxiety disorders. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*. 2014 Oct;165B(7):541–54.
7. Tunc O, Tremellen K. Oxidative DNA damage impairs global sperm DNA methylation in infertile men. *J Assist Reprod Genet*. 2009;26(9–10):537–44.
8. Cornuet JM, Garnery L, Solignac M. Putative origin and function of the intergenic region between COI and COII of *Apis mellifera* L. mitochondrial DNA. *Genetics*. 1991 Jun;128(2):393–403.
9. Difrancesco S, Lamers F, Riese H, Merikangas KR, Beekman ATF, van Hemert AM, et al. Sleep, circadian rhythm, and physical activity patterns in depressive and anxiety disorders: A 2-week ambulatory assessment study. *Depress Anxiety*. 2019 Oct;36(10):975–86.
10. Difrancesco S, Penninx BWJH, Riese H, Giltay EJ, Lamers F. The role of depressive symptoms and symptom dimensions in actigraphy-assessed sleep, circadian rhythm, and physical activity. *Psychol Med*. 2022 Oct;52(13):2760–6.
11. Charrier A, Olliac B, Roubertoux P, Tordjman S. Clock Genes and Altered Sleep-Wake Rhythms: Their Role in the Development of Psychiatric Disorders. *Int J Mol Sci*. 2017 Apr 29;18(5):938.
12. Tapia-Osorio A, Salgado-Delgado R, Angeles-Castellanos M, Escobar C.

- Disruption of circadian rhythms due to chronic constant light leads to depressive and anxiety-like behaviors in the rat. *Behav Brain Res.* 2013 Sep 1;252:1–9.
13. Tal-Krivisky K, Kronfeld-Schor N, Einat H. Voluntary exercise enhances activity rhythms and ameliorates anxiety- and depression-like behaviors in the sand rat model of circadian rhythm-related mood changes. *Physiol Behav.* 2015 Nov 1;151:441–7.
  14. Jang HS, Shin WJ, Lee JE, Do JT. CpG and Non-CpG Methylation in Epigenetic Gene Regulation and Brain Function. *Genes (Basel).* 2017 May 23;8(6):148.
  15. Fuso A, Lucarelli M. CpG and Non-CpG Methylation in the Diet-Epigenetics-Neurodegeneration Connection. *Curr Nutr Rep.* 2019 Jun;8(2):74–82.
  16. D M, R A, Ms F, Lf B, Je L, K R, et al. Viewpoints: Approaches to defining and investigating fear. *Nature neuroscience* [Internet]. 2019 Aug [cited 2023 Feb 22];22(8). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31332374/>
  17. Blanchard DC, Blanchard RJ. Defensive behaviors, fear, and anxiety. In: *Handbook of anxiety and fear.* San Diego, CA, US: Elsevier Academic Press; 2008. p. 63–79. (Handbook of behavioral neuroscience).
  18. Kalin NH. Mechanisms Underlying the Early Risk to Develop Anxiety and Depression: A Translational Approach. *Eur Neuropsychopharmacol.* 2017 Jun;27(6):543–53.
  19. Fox AS, Kalin NH. A translational neuroscience approach to understanding the development of social anxiety disorder and its pathophysiology. *Am J Psychiatry.* 2014 Nov 1;171(11):1162–73.
  20. Mobbs D, Hagan CC, Dalgleish T, Silston B, Prévost C. The ecology of human fear: survival optimization and the nervous system. *Front Neurosci.* 2015 Mar 18;9:55.
  21. Fanselow MS, Lester LS. A functional behavioristic approach to aversively motivated behavior: Predatory imminence as a determinant of the topography of defensive behavior. In: *Evolution and learning.* Hillsdale, NJ, US: Lawrence Erlbaum Associates, Inc; 1988. p. 185–212.
  22. Köroğlu E. DSM-5 Ruhsal Bozuklukların Tanısal ve Sayımsal Elkitabı, American Psikiyatri Birliği. Ankara: Hekimler Yayın Birliği; 2014.
  23. Lewis A. Problems presented by the ambiguous word “anxiety” as used in psychopathology. *Isr Ann Psychiatr Relat Discip.* 1967;5(2):105–21.
  24. Radden J, Radden J, editors. Diseases of the Black Bile: Galen. In: *The Nature of Melancholy: From Aristotle to Kristeva* [Internet]. Oxford University Press; 2002 [cited 2023 Mar 6]. p. 0. Available from: <https://doi.org/10.1093/acprof:oso/9780195151657.003.0003>

25. Beard, G. M. A Practical Treatise on Nervous Exhaustion (Neurasthenia). Its Symptoms, Nature, Sequences, Treatment (ed. A. D. Rockwell). H. K. Lewis, London. 1890;
26. Crocq MA. A history of anxiety: from Hippocrates to DSM. *Dialogues Clin Neurosci*. 2015 Sep;17(3):319–25.
27. Pizarro Obaid F. Neurotic Anxiety. In: Zeigler-Hill V, Shackelford TK, editors. *Encyclopedia of Personality and Individual Differences* [Internet]. Cham: Springer International Publishing; 2017 [cited 2023 Mar 6]. p. 1–4. Available from: [https://doi.org/10.1007/978-3-319-28099-8\\_1401-1](https://doi.org/10.1007/978-3-319-28099-8_1401-1)
28. Spitzer RL, Williams JBW. Proposed Revisions in the DSM-III Classification of Anxiety Disorders Based on Research and Clinical Experience. In: Shaw BF, Segal ZV, Vallis TM, Cashman FE, editors. *Anxiety Disorders: Psychological and Biological Perspectives* [Internet]. Boston, MA: Springer US; 1986 [cited 2023 Mar 6]. p. 1–19. Available from: [https://doi.org/10.1007/978-1-4684-5254-9\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-4684-5254-9_1)
29. Torgersen S. Anxiety neuroses and DSM-III. *Acta Psychiatr Scand Suppl*. 1986;328:54–6.
30. KESSLER RC, ANGERMEYER M, ANTHONY JC, DE GRAAF R, DEMYTTENAERE K, GASQUET I, et al. Lifetime prevalence and age-of-onset distributions of mental disorders in the World Health Organization’s World Mental Health Survey Initiative. *World Psychiatry*. 2007 Oct;6(3):168–76.
31. Baxter AJ, Scott KM, Vos T, Whiteford HA. Global prevalence of anxiety disorders: a systematic review and meta-regression. *Psychological Medicine*. 2013 May;43(5):897–910.
32. Yang X, Fang Y, Chen H, Zhang T, Yin X, Man J, et al. Global, regional and national burden of anxiety disorders from 1990 to 2019: results from the Global Burden of Disease Study 2019. *Epidemiology and Psychiatric Sciences*. 2021 ed;30:e36.
33. Kessler RC, Berglund P, Demler O, Jin R, Merikangas KR, Walters EE. Lifetime prevalence and age-of-onset distributions of DSM-IV disorders in the National Comorbidity Survey Replication. *Arch Gen Psychiatry*. 2005 Jun;62(6):593–602.
34. Jacobi F, Höfler M, Strehle J, Mack S, Gerschler A, Scholl L, et al. [Mental disorders in the general population : Study on the health of adults in Germany and the additional module mental health (DEGS1-MH)]. *Nervenarzt*. 2014 Jan;85(1):77–87.
35. Bandelow B, Michaelis S. Epidemiology of anxiety disorders in the 21st century. *Dialogues Clin Neurosci*. 2015 Sep;17(3):327–35.
36. Heise L, Greene ME, Opper N, Stavropoulou M, Harper C, Nascimento M, et al. Gender inequality and restrictive gender norms: framing the challenges to

- health. *The Lancet*. 2019 Jun 15;393(10189):2440–54.
37. Dworkin ER. Risk for Mental Disorders Associated With Sexual Assault: A Meta-Analysis. *Trauma Violence Abuse*. 2020 Dec;21(5):1011–28.
  38. Doğan DO. Anksiyete Bozukluklarının Epidemiyolojisi. *Turkiye Klinikleri J Psychiatry-Special Topics*. 2010;3(4):9–18.
  39. KILIÇ, Cengiz. Türkiye’de Ruhsal Hastalıkların Yaygınlığı Ve Ruhsal Tedavi İhtiyacı Konusunda Neredeyiz? *TTB Toplum ve Hekim*. 2020;35(3):179–87.
  40. Bandelow B, Michaelis S, Wedekind D. Treatment of anxiety disorders. *Dialogues Clin Neurosci*. 2017 Jun;19(2):93–107.
  41. Shimada-Sugimoto M, Otowa T, Hettema JM. Genetics of anxiety disorders: Genetic epidemiological and molecular studies in humans. *Psychiatry and Clinical Neurosciences*. 2015;69(7):388–401.
  42. Kendler KS. Twin studies of psychiatric illness: an update. *Arch Gen Psychiatry*. 2001 Nov;58(11):1005–14.
  43. Otowa T, Hek K, Lee M, Byrne EM, Mirza SS, Nivard MG, et al. Meta-analysis of genome-wide association studies of anxiety disorders. *Mol Psychiatry*. 2016 Oct;21(10):1391–9.
  44. Hariri AR, Holmes A. Finding translation in stress research. *Nat Neurosci*. 2015 Oct;18(10):1347–52.
  45. Arloth J, Bogdan R, Weber P, Frishman G, Menke A, Wagner KV, et al. Genetic Differences in the Immediate Transcriptome Response to Stress Predict Risk-Related Brain Function and Psychiatric Disorders. *Neuron*. 2015 Jun 3;86(5):1189–202.
  46. Gunduz-Cinar O, MacPherson KP, Cinar R, Gamble-George J, Sugden K, Williams B, et al. Convergent translational evidence of a role for anandamide in amygdala-mediated fear extinction, threat processing and stress-reactivity. *Mol Psychiatry*. 2013 Jul;18(7):813–23.
  47. Stevens JS, Almli LM, Fani N, Gutman DA, Bradley B, Norrholm SD, et al. PACAP receptor gene polymorphism impacts fear responses in the amygdala and hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014 Feb 25;111(8):3158–63.
  48. Fernandes V, Osório FL. Are there associations between early emotional trauma and anxiety disorders? Evidence from a systematic literature review and meta-analysis. *Eur Psychiatry*. 2015 Sep;30(6):756–64.
  49. Faravelli C, Lo Sauro C, Lelli L, Pietrini F, Lazzaretti L, Godini L, et al. The role of life events and HPA axis in anxiety disorders: a review. *Curr Pharm Des*. 2012;18(35):5663–74.

50. Kendler K, Baker J. Genetic influences on measures of the environment: A systematic review. *Psychological medicine*. 2007 Jun 1;37:615–26.
51. Lesch KP, Bengel D, Heils A, Sabol SZ, Greenberg BD, Petri S, et al. Association of anxiety-related traits with a polymorphism in the serotonin transporter gene regulatory region. *Science*. 1996 Nov 29;274(5292):1527–31.
52. Stein MB, Schork NJ, Gelernter J. Gene-by-environment (serotonin transporter and childhood maltreatment) interaction for anxiety sensitivity, an intermediate phenotype for anxiety disorders. *Neuropsychopharmacology*. 2008 Jan;33(2):312–9.
53. Bale TL. Lifetime stress experience: transgenerational epigenetics and germ cell programming. *Dialogues Clin Neurosci*. 2014 Sep;16(3):297–305.
54. Dias BG, Maddox S, Klengel T, Ressler KJ. Epigenetic mechanisms underlying learning and the inheritance of learned behaviors. *Trends Neurosci*. 2015 Feb;38(2):96–107.
55. Turecki G, Meaney M. Effects of the social environment and stress on glucocorticoid receptor gene methylation: a systematic review. *Biol Psychiatry*. 2016 Jan 15;79(2):87–96.
56. Zannas AS, Binder EB. Gene-environment interactions at the FKBP5 locus: sensitive periods, mechanisms and pleiotropism. *Genes Brain Behav*. 2014 Jan;13(1):25–37.
57. Rosen JB, Schulkin J. From normal fear to pathological anxiety. *Psychol Rev*. 1998 Apr;105(2):325–50.
58. Taylor JM, Whalen PJ. Neuroimaging and Anxiety: the Neural Substrates of Pathological and Non-pathological Anxiety. *Curr Psychiatry Rep*. 2015 Jun;17(6):49.
59. Kindt M, Soeter M, Vervliet B. Beyond extinction: erasing human fear responses and preventing the return of fear. *Nat Neurosci*. 2009 Mar;12(3):256–8.
60. Etkin A, Egner T, Kalisch R. Emotional processing in anterior cingulate and medial prefrontal cortex. *Trends Cogn Sci*. 2011 Feb;15(2):85–93.
61. Swartz JR, Knodt AR, Radtke SR, Hariri AR. A neural biomarker of psychological vulnerability to future life stress. *Neuron*. 2015 Feb 4;85(3):505–11.
62. Roozendaal B, McEwen BS, Chattarji S. Stress, memory and the amygdala. *Nat Rev Neurosci*. 2009 Jun;10(6):423–33.
63. Löw K, Crestani F, Keist R, Benke D, Brünig I, Benson JA, et al. Molecular and neuronal substrate for the selective attenuation of anxiety. *Science*. 2000 Oct 6;290(5489):131–4.

64. Atack JR. GABAA Receptor Subtype-Selective Efficacy: TPA023, an  $\alpha 2/\alpha 3$  Selective Non-sedating Anxiolytic and  $\alpha 5 1A$ , an  $\alpha 5$  Selective Cognition Enhancer. *CNS Neurosci Ther.* 2008 Mar 14;14(1):25–35.
65. Goddard AW, Mason GF, Almai A, Rothman DL, Behar KL, Petroff OA, et al. Reductions in occipital cortex GABA levels in panic disorder detected with 1h-magnetic resonance spectroscopy. *Arch Gen Psychiatry.* 2001 Jun;58(6):556–61.
66. Arango V, Underwood MD, Boldrini M, Tamir H, Kassir SA, Hsiung S chi, et al. Serotonin 1A Receptors, Serotonin Transporter Binding and Serotonin Transporter mRNA Expression in the Brainstem of Depressed Suicide Victims. *Neuropsychopharmacology.* 2001 Dec 1;25(6):892–903.
67. Goldberg HL, Finnerty RJ. The comparative efficacy of buspirone and diazepam in the treatment of anxiety. *The American Journal of Psychiatry.* 1979;136:1184–7.
68. Sibon I, Benkelfat C, Gravel P, Aznavour N, Costes N, Mzengeza S, et al. Decreased [18F]MPPF Binding Potential in the Dorsal Raphe Nucleus After a Single Oral Dose of Fluoxetine: A Positron-Emission Tomography Study in Healthy Volunteers. *Biological Psychiatry.* 2008 Jun 15;63(12):1135–40.
69. Spindelegger C, Lanzenberger R, Wadsak W, Mien LK, Stein P, Mitterhauser M, et al. Influence of escitalopram treatment on 5-HT1A receptor binding in limbic regions in patients with anxiety disorders. *Mol Psychiatry.* 2009 Nov;14(11):1040–50.
70. Parks CL, Robinson PS, Sibille E, Shenk T, Toth M. Increased anxiety of mice lacking the serotonin1A receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 1998 Sep;95(18):10734–9.
71. Ramboz S, Oosting R, Amara DA, Kung HF, Blier P, Mendelsohn M, et al. Serotonin receptor 1A knockout: An animal model of anxiety-related disorder. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 1998 Nov 24;95(24):14476–81.
72. Bremner JD, Krystal JH, Southwick SM, Charney DS. Noradrenergic mechanisms in stress and anxiety: II. Clinical studies. *Synapse.* 1996 May;23(1):39–51.
73. Krystal JH, Mathew SJ, D’Souza DC, Garakani A, Gunduz-Bruce H, Charney DS. Potential psychiatric applications of metabotropic glutamate receptor agonists and antagonists. *CNS Drugs.* 2010 Aug;24(8):669–93.
74. Bergink V, van Megen HJGM, Westenberg HGM. Glutamate and anxiety. *Eur Neuropsychopharmacol.* 2004 May;14(3):175–83.
75. Moghaddam B. Stress activation of glutamate neurotransmission in the prefrontal cortex: implications for dopamine-associated psychiatric disorders. *Biol Psychiatry.* 2002 May 15;51(10):775–87.

76. Popoli M, Yan Z, McEwen BS, Sanacora G. The stressed synapse: the impact of stress and glucocorticoids on glutamate transmission. *Nat Rev Neurosci*. 2012 Jan;13(1):22–37.
77. Neumann ID, Slattery DA. Oxytocin in General Anxiety and Social Fear: A Translational Approach. *Biological Psychiatry*. 2016 Feb 1;79(3):213–21.
78. Borea PA, Gessi S, Merighi S, Varani K. Adenosine as a Multi-Signalling Guardian Angel in Human Diseases: When, Where and How Does it Exert its Protective Effects? *Trends Pharmacol Sci*. 2016 Jun;37(6):419–34.
79. Johansson B, Halldner L, Dunwiddie TV, Masino SA, Poelchen W, Giménez-Llort L, et al. Hyperalgesia, anxiety, and decreased hypoxic neuroprotection in mice lacking the adenosine A1 receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 Jul 31;98(16):9407–12.
80. Gibb BE, Chelminski I, Zimmerman M. Childhood emotional, physical, and sexual abuse, and diagnoses of depressive and anxiety disorders in adult psychiatric outpatients. *Depress Anxiety*. 2007;24(4):256–63.
81. Wright MO, Crawford E, Del Castillo D. Childhood emotional maltreatment and later psychological distress among college students: the mediating role of maladaptive schemas. *Child Abuse Negl*. 2009 Jan;33(1):59–68.
82. Nolte T, Guiney J, Fonagy P, Mayes LC, Luyten P. Interpersonal stress regulation and the development of anxiety disorders: an attachment-based developmental framework. *Front Behav Neurosci*. 2011;5:55.
83. Rapee RM. Family factors in the development and management of anxiety disorders. *Clin Child Fam Psychol Rev*. 2012 Mar;15(1):69–80.
84. Rapee RM, Schniering CA, Hudson JL. Anxiety Disorders During Childhood and Adolescence: Origins and Treatment. *Annual Review of Clinical Psychology*. 2009;5(1):311–41.
85. Acquah EO, Topalli PZ, Wilson ML, Junttila N, Niemi PM. Adolescent loneliness and social anxiety as predictors of bullying victimisation. *Int J Adolesc Youth*. 2016;21(3):320–31.
86. Swearer SM, Hymel S. Understanding the psychology of bullying: Moving toward a social-ecological diathesis-stress model. *Am Psychol*. 2015;70(4):344–53.
87. Freud, S. Freud, S. (1926). *Inhibitions, Symptoms and Anxiety*. The Standard Edition of the Complete Psychological Works of Sigmund Freud.
88. Compton A. A Study of the Psychoanalytic Theory of Anxiety. I. The Development of Freud's Theory of Anxiety. *J Am Psychoanal Assoc*. 1972 Jan 1;20(1):3–44.

89. Crits-Christoph P, Connolly MB, Azarian K, Crits-Christoph K, Shappell S. An open trial of brief supportive-expressive psychotherapy in the treatment of generalized anxiety disorder. *Psychotherapy: Theory, Research, Practice, Training*. 1996;33:418–30.
90. Milrod B, Busch F, Leon AC, Aronson A, Roiphe J, Rudden M, et al. A pilot open trial of brief psychodynamic psychotherapy for panic disorder. *J Psychother Pract Res*. 2001;10(4):239–45.
91. Sullivan HS. *The interpersonal theory of psychiatry*. New York, NY, US: W W Norton & Co; 1953. xviii, 393 p. (*The interpersonal theory of psychiatry*).
92. Lissek S, Biggs AL, Rabin SJ, Cornwell BR, Alvarez RP, Pine DS, et al. Generalization of conditioned fear-potentiated startle in humans: experimental validation and clinical relevance. *Behav Res Ther*. 2008 May;46(5):678–87.
93. Reiss S. Pavlovian conditioning and human fear: An expectancy model. *Behavior Therapy*. 1980 Jun 1;11(3):380–96.
94. Mertens G, Kryptos AM, Engelhard IM. A review on mental imagery in fear conditioning research 100 years since the ‘Little Albert’ study. *Behaviour Research and Therapy*. 2020 Mar 1;126:103556.
95. De Houwer J. Revisiting classical conditioning as a model for anxiety disorders: A conceptual analysis and brief review. *Behaviour Research and Therapy*. 2020 Apr 1;127:103558.
96. Wolpe J, Lazarus AA. *Behavior therapy techniques: A guide to the treatment of neuroses*. Elmsford, NY, US: Pergamon Press; 1966. ix, 198 p. (*Behavior therapy techniques: A guide to the treatment of neuroses*).
97. Clark DA, Beck AT. *Cognitive Therapy of Anxiety Disorders: Science and practice*. New York, NY, US: Guilford Press; 2010. ix, 628 p. (*Cognitive Therapy of Anxiety Disorders: Science and practice*).
98. Bruce SE, Yonkers KA, Otto MW, Eisen JL, Weisberg RB, Pagano M, et al. Influence of psychiatric comorbidity on recovery and recurrence in generalized anxiety disorder, social phobia, and panic disorder: a 12-year prospective study. *Am J Psychiatry*. 2005 Jun;162(6):1179–87.
99. Wittchen HU, Jacobi F. Size and burden of mental disorders in Europe--a critical review and appraisal of 27 studies. *Eur Neuropsychopharmacol*. 2005 Aug;15(4):357–76.
100. Crippa JA, Zuardi AW, Martín-Santos R, Bhattacharyya S, Atakan Z, McGuire P, et al. Cannabis and anxiety: a critical review of the evidence. *Hum Psychopharmacol*. 2009 Oct;24(7):515–23.
101. Gaudiano BA, Miller IW. Anxiety disorder comorbidity in Bipolar I Disorder: relationship to depression severity and treatment outcome. *Depress Anxiety*.

- 2005;21(2):71–7.
102. Roy-Byrne PP, Davidson KW, Kessler RC, Asmundson GJG, Goodwin RD, Kubzansky L, et al. Anxiety disorders and comorbid medical illness. *Gen Hosp Psychiatry*. 2008;30(3):208–25.
  103. Kessler RC, Gruber M, Hettema JM, Hwang I, Sampson N, Yonkers KA. Co-morbid major depression and generalized anxiety disorders in the National Comorbidity Survey follow-up. *Psychol Med*. 2008 Mar;38(3):365–74.
  104. Gartlehner G, Hansen RA, Morgan LC, Thaler K, Lux L, Van Noord M, et al. Comparative benefits and harms of second-generation antidepressants for treating major depressive disorder: an updated meta-analysis. *Ann Intern Med*. 2011 Dec 6;155(11):772–85.
  105. Serretti A, Chiesa A. Treatment-emergent sexual dysfunction related to antidepressants: a meta-analysis. *J Clin Psychopharmacol*. 2009 Jun;29(3):259–66.
  106. Muscatello MR, Spina E, Bandelow B, Baldwin DS. Clinically relevant drug interactions in anxiety disorders. *Hum Psychopharmacol*. 2012 May;27(3):239–53.
  107. Tint A, Haddad PM, Anderson IM. The effect of rate of antidepressant tapering on the incidence of discontinuation symptoms: a randomised study. *J Psychopharmacol*. 2008 May;22(3):330–2.
  108. Baldwin DS, Waldman S, Allgulander C. Evidence-based pharmacological treatment of generalized anxiety disorder. *Int J Neuropsychopharmacol*. 2011 Jun;14(5):697–710.
  109. Batelaan NM, Van Balkom AJLM, Stein DJ. Evidence-based pharmacotherapy of panic disorder: an update. *Int J Neuropsychopharmacol*. 2012 Apr;15(3):403–15.
  110. Cipriani A, Koesters M, Furukawa TA, Nosè M, Purgato M, Omori IM, et al. Duloxetine versus other anti-depressive agents for depression. *Cochrane Database Syst Rev*. 2012 Oct 17;10:CD006533.
  111. Woolf AD, Erdman AR, Nelson LS, Caravati EM, Cobaugh DJ, Booze LL, et al. Tricyclic antidepressant poisoning: an evidence-based consensus guideline for out-of-hospital management. *Clinical Toxicology*. 2007 Jan 1;45(3):203–33.
  112. Anderson IM, Ferrier IN, Baldwin RC, Cowen PJ, Howard L, Lewis G, et al. Evidence-based guidelines for treating depressive disorders with antidepressants: a revision of the 2000 British Association for Psychopharmacology guidelines. *J Psychopharmacol*. 2008 Jun;22(4):343–96.
  113. Bandelow B, Zohar J, Hollander E, Kasper S, Möller HJ, WFSBP Task Force on Treatment Guidelines for Anxiety, Obsessive-Compulsive and Post-Traumatic Stress Disorders, et al. World Federation of Societies of Biological Psychiatry

- (WFSBP) guidelines for the pharmacological treatment of anxiety, obsessive-compulsive and post-traumatic stress disorders - first revision. *World J Biol Psychiatry*. 2008;9(4):248–312.
114. Blanco C, Bragdon LB, Schneier FR, Liebowitz MR. The evidence-based pharmacotherapy of social anxiety disorder. *Int J Neuropsychopharmacol*. 2013 Feb;16(1):235–49.
115. Ross DC, Klein DF, Uhlenhuth EH. Improved statistical analysis of moclobemide dose effects on panic disorder treatment. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci*. 2010 Apr;260(3):243–8.
116. Dell’osso B, Lader M. Do benzodiazepines still deserve a major role in the treatment of psychiatric disorders? A critical reappraisal. *Eur Psychiatry*. 2013 Jan;28(1):7–20.
117. Allain H, Bentué-Ferrer D, Polard E, Akwa Y, Patat A. Postural instability and consequent falls and hip fractures associated with use of hypnotics in the elderly: a comparative review. *Drugs Aging*. 2005;22(9):749–65.
118. Steenen, SA, van Wijk, AJ, van der Heijden, GJ, Westrhenen, Roos, Lange, J, de Jongh, A, et al. Propranolol for the treatment of anxiety disorders: Systematic review and meta-analysis. *Journal of Psychopharmacology*. 2016;30(2):128–39.
119. Lim L, Chan HN, Chew PH, Chua SM, Ho C, Kwek SKD, et al. Ministry of Health Clinical Practice Guidelines: Anxiety Disorders. *Singapore Med J*. 2015 Jun;56(6):310–6.
120. Bandelow B, Lichte T, Rudolf S, Wiltink J, Beutel ME. The German guidelines for the treatment of anxiety disorders. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci*. 2015 Aug 1;265(5):363–73.
121. Boschen MJ, Oei TPS. A cognitive behavioral case formulation framework for treatment planning in anxiety disorders. *Depress Anxiety*. 2008;25(10):811–23.
122. Leichsenring F, Klein S, Salzer S. Psychodynamic Therapy of Anxiety Disorders. In: *The Wiley Handbook of Anxiety Disorders* [Internet]. John Wiley & Sons, Ltd; 2014 [cited 2023 Mar 2]. p. 852–64. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/9781118775349.ch42>
123. Slavin-Mulford J, Hilsenroth M, Weinberger J, Gold J. Therapeutic interventions related to outcome in psychodynamic psychotherapy for anxiety disorder patients. *J Nerv Ment Dis*. 2011 Apr;199(4):214–21.
124. Evans S, Ferrando S, Findler M, Stowell C, Smart C, Haglin D. Mindfulness-based cognitive therapy for generalized anxiety disorder. *Journal of Anxiety Disorders*. 2008 May 1;22(4):716–21.
125. Hofmann SG, Gómez AF. Mindfulness-Based Interventions for Anxiety and

- Depression. *Psychiatr Clin North Am*. 2017 Dec;40(4):739–49.
126. Yunitri N, Kao CC, Chu H, Voss J, Chiu HL, Liu D, et al. The effectiveness of eye movement desensitization and reprocessing toward anxiety disorder: A meta-analysis of randomized controlled trials. *J Psychiatr Res*. 2020 Apr;123:102–13.
  127. Faretta E, Farra MD. Efficacy of EMDR Therapy for Anxiety Disorders. *Journal of EMDR Practice and Research*. 2019 Nov 1;13(4):325–32.
  128. van Apeldoorn FJ, Stant AD, van Hout WJPJ, Mersch PPA, den Boer JA. Cost-effectiveness of CBT, SSRI, and CBT+SSRI in the treatment for panic disorder. *Acta Psychiatrica Scandinavica*. 2014;129(4):286–95.
  129. Foster RG, Kreitzman L. Rhythms of life: The biological clocks that control the daily lives of every living thing. *Rhythms of Life: The Biological Clocks That Control the Daily Lives of Every Living Thing*. 2005 Jan 1;1–278.
  130. Aschoff J, Wever R. Human circadian rhythms: a multioscillatory system. *Fed Proc*. 1976 Oct;35(12):236–232.
  131. Bell-Pedersen D, Cassone VM, Earnest DJ, Golden SS, Hardin PE, Thomas TL, et al. Circadian rhythms from multiple oscillators: lessons from diverse organisms. *Nat Rev Genet*. 2005 Jul;6(7):544–56.
  132. Yagita K, Tamanini F, van Der Horst GT, Okamura H. Molecular mechanisms of the biological clock in cultured fibroblasts. *Science*. 2001 Apr 13;292(5515):278–81.
  133. Bargiello TA, Jackson FR, Young MW. Restoration of circadian behavioural rhythms by gene transfer in *Drosophila*. *Nature*. 1984 Jan 20;312(5996):752–4.
  134. Nishino H, Kiyomi K, Brooks CM. The role of suprachiasmatic nuclei of the hypothalamus in the production of circadian rhythm. *Brain Res*. 1976 Aug 6;112(1):45–59.
  135. Schibler U, Ripperger J, Brown SA. Peripheral circadian oscillators in mammals: time and food. *J Biol Rhythms*. 2003 Jun;18(3):250–60.
  136. Mistlberger RE, Antle MC, Glass JD, Miller JD. Behavioral and serotonergic regulation of circadian rhythms. *Biological Rhythm Research*. 2000;31:240–83.
  137. Sollars PJ, Kimble DP, Pickard GE. Restoration of circadian behavior by anterior hypothalamic heterografts. *J Neurosci*. 1995 Mar;15(3 Pt 2):2109–22.
  138. Ralph MR, Foster RG, Davis FC, Menaker M. Transplanted suprachiasmatic nucleus determines circadian period. *Science*. 1990 Feb 23;247(4945):975–8.
  139. Guo H, Brewer JM, Champhekar A, Harris RBS, Bittman EL. Differential control of peripheral circadian rhythms by suprachiasmatic-dependent neural

- signals. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 Feb 22;102(8):3111–6.
140. Hattar S, Liao HW, Takao M, Berson DM, Yau KW. Melanopsin-containing retinal ganglion cells: architecture, projections, and intrinsic photosensitivity. *Science*. 2002 Feb 8;295(5557):1065–70.
  141. Hannibal J. Neurotransmitters of the retino-hypothalamic tract. *Cell Tissue Res*. 2002 Jul;309(1):73–88.
  142. Moore RY, Speh JC. Serotonin innervation of the primate suprachiasmatic nucleus. *Brain Res*. 2004 Jun 4;1010(1–2):169–73.
  143. Prosser RA. Serotonin phase-shifts the mouse suprachiasmatic circadian clock in vitro. *Brain Res*. 2003 Mar 14;966(1):110–5.
  144. Muscat L, Tischler RC, Morin LP. Functional analysis of the role of the median raphe as a regulator of hamster circadian system sensitivity to light. *Brain Res*. 2005 May 17;1044(1):59–66.
  145. Perreau-Lenz S, Kalsbeek A, Garidou ML, Wortel J, van der Vliet J, van Heijningen C, et al. Suprachiasmatic control of melatonin synthesis in rats: inhibitory and stimulatory mechanisms. *Eur J Neurosci*. 2003 Jan;17(2):221–8.
  146. Lewy AJ. The dim light melatonin onset, melatonin assays and biological rhythm research in humans. *Biol Signals Recept*. 1999;8(1–2):79–83.
  147. Lewy AJ, Emens JS, Lefler BJ, Yuhas K, Jackman AR. Melatonin entrains free-running blind people according to a physiological dose-response curve. *Chronobiol Int*. 2005;22(6):1093–106.
  148. Lewy AJ, Emens J, Jackman A, Yuhas K. Circadian uses of melatonin in humans. *Chronobiol Int*. 2006;23(1–2):403–12.
  149. Moore RY, Danchenko RL. Paraventricular-subparaventricular hypothalamic lesions selectively affect circadian function. *Chronobiol Int*. 2002 Mar;19(2):345–60.
  150. Chou TC, Scammell TE, Gooley JJ, Gaus SE, Saper CB, Lu J. Critical role of dorsomedial hypothalamic nucleus in a wide range of behavioral circadian rhythms. *J Neurosci*. 2003 Nov 19;23(33):10691–702.
  151. Lu J, Zhang YH, Chou TC, Gaus SE, Elmquist JK, Shiromani P, et al. Contrasting effects of ibotenate lesions of the paraventricular nucleus and subparaventricular zone on sleep-wake cycle and temperature regulation. *J Neurosci*. 2001 Jul 1;21(13):4864–74.
  152. Saper CB, Scammell TE, Lu J. Hypothalamic regulation of sleep and circadian rhythms. *Nature*. 2005 Oct 27;437(7063):1257–63.
  153. Chemelli RM, Willie JT, Sinton CM, Elmquist JK, Scammell T, Lee C, et al.

- Narcolepsy in orexin knockout mice: molecular genetics of sleep regulation. *Cell*. 1999 Aug 20;98(4):437–51.
154. de Lecea L, Kilduff TS, Peyron C, Gao X, Foye PE, Danielson PE, et al. The hypocretins: hypothalamus-specific peptides with neuroexcitatory activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998 Jan 6;95(1):322–7.
  155. Panda S, Antoch MP, Miller BH, Su AI, Schook AB, Straume M, et al. Coordinated transcription of key pathways in the mouse by the circadian clock. *Cell*. 2002 May 3;109(3):307–20.
  156. Konopka RJ, Benzer S. Clock mutants of *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1971 Sep;68(9):2112–6.
  157. Vitaterna MH, King DP, Chang AM, Kornhauser JM, Lowrey PL, McDonald JD, et al. Mutagenesis and Mapping of a Mouse Gene, *Clock*, Essential for Circadian Behavior. *Science*. 1994 Apr 29;264(5159):719–25.
  158. Wen M, Cui J, Xu J, Xue Y, Wang J, Xue C, et al. Effects of dietary sea cucumber saponin on the gene expression rhythm involved in circadian clock and lipid metabolism in mice during nighttime-feeding. *J Physiol Biochem*. 2014 Sep 1;70(3):801–8.
  159. Taniyama Y, Yamauchi T, Takeuchi S, Kuroda Y. PER1 polymorphism associated with shift work disorder. *Sleep and Biological Rhythms*. 2015;13(4):342–7.
  160. Husse J, Hintze SC, Eichele G, Lehnert H, Oster H. Circadian clock genes *Per1* and *Per2* regulate the response of metabolism-associated transcripts to sleep disruption. *PLoS One*. 2012;7(12):e52983.
  161. Dunlap JC. Molecular bases for circadian clocks. *Cell*. 1999 Jan 22;96(2):271–90.
  162. Hardin PE. Activating inhibitors and inhibiting activators: a day in the life of a fly. *Curr Opin Neurobiol*. 1998 Oct;8(5):642–7.
  163. Lowrey PL, Takahashi JS. Genetics of circadian rhythms in Mammalian model organisms. *Adv Genet*. 2011;74:175–230.
  164. Shearman LP, Sriram S, Weaver DR, Maywood ES, Chaves I, Zheng B, et al. Interacting molecular loops in the mammalian circadian clock. *Science*. 2000 May 12;288(5468):1013–9.
  165. Ko CH, Takahashi JS. Molecular components of the mammalian circadian clock. *Human Molecular Genetics*. 2006 Oct 15;15(suppl\_2):R271–7.
  166. Foster RG, Kreitzman L. The rhythms of life: what your body clock means to you! *Experimental Physiology*. 2014;99(4):599–606.

167. Johansson AS, Owe-Larsson B, Hetta J, Lundkvist GB. Altered circadian clock gene expression in patients with schizophrenia. *Schizophr Res.* 2016 Jul;174(1–3):17–23.
168. Partonen T, Treutlein J, Alpmann A, Frank J, Johansson C, Depner M, et al. Three circadian clock genes *Per2*, *Arntl*, and *Npas2* contribute to winter depression. *Ann Med.* 2007;39(3):229–38.
169. Lavebratt C, Sjöholm LK, Soronen P, Paunio T, Vawter MP, Bunney WE, et al. *CRY2* is associated with depression. *PLoS One.* 2010 Feb 24;5(2):e9407.
170. Soria V, Martínez-Amorós E, Escaramís G, Valero J, Pérez-Egea R, García C, et al. Differential association of circadian genes with mood disorders: *CRY1* and *NPAS2* are associated with unipolar major depression and *CLOCK* and *VIP* with bipolar disorder. *Neuropsychopharmacology.* 2010 May;35(6):1279–89.
171. Shi J, Wittke-Thompson JK, Badner JA, Hattori E, Potash JB, Willour VL, et al. Clock genes may influence bipolar disorder susceptibility and dysfunctional circadian rhythm. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.* 2008 Oct 5;147B(7):1047–55.
172. Benson KL. Sleep in Schizophrenia: Pathology and Treatment. *Sleep Medicine Clinics.* 2015 Mar 1;10(1):49–55.
173. Dolsen EA, Asarnow LD, Harvey AG. Insomnia as a transdiagnostic process in psychiatric disorders. *Curr Psychiatry Rep.* 2014 Sep;16(9):471.
174. Meyer JH. Applying neuroimaging ligands to study major depressive disorder. *Semin Nucl Med.* 2008 Jul;38(4):287–304.
175. Chenu F, El Mansari M, Blier P. Electrophysiological effects of repeated administration of agomelatine on the dopamine, norepinephrine, and serotonin systems in the rat brain. *Neuropsychopharmacology.* 2013 Jan;38(2):275–84.
176. McClung CA. Circadian genes, rhythms and the biology of mood disorders. *Pharmacol Ther.* 2007 May;114(2):222–32.
177. Hampp G, Ripperger JA, Houben T, Schmutz I, Blex C, Perreau-Lenz S, et al. Regulation of monoamine oxidase A by circadian-clock components implies clock influence on mood. *Curr Biol.* 2008 May 6;18(9):678–83.
178. Spencer S, Falcon E, Kumar J, Krishnan V, Mukherjee S, Birnbaum SG, et al. Circadian genes *Period 1* and *Period 2* in the nucleus accumbens regulate anxiety-related behavior. *Eur J Neurosci.* 2013 Jan;37(2):242–50.
179. McClung CA, Sidiropoulou K, Vitaterna M, Takahashi JS, White FJ, Cooper DC, et al. Regulation of dopaminergic transmission and cocaine reward by the *Clock* gene. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005 Jun 28;102(26):9377–81.
180. Mukherjee S, Coque L, Cao JL, Kumar J, Chakravarty S, Asaithamby A, et

- al. Knockdown of Clock in the ventral tegmental area through RNA interference results in a mixed state of mania and depression-like behavior. *Biol Psychiatry*. 2010 Sep 15;68(6):503–11.
181. Waddington CH. The epigenetics of birds. *The epigenetics of birds* [Internet]. 1952 [cited 2023 Mar 13]; Available from: <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19530100538>
182. Holliday R. Epigenetics: a historical overview. *Epigenetics*. 2006;1(2):76–80.
183. Wu Ct null, Morris JR. Genes, genetics, and epigenetics: a correspondence. *Science*. 2001 Aug 10;293(5532):1103–5.
184. Espada J, Esteller M. Mouse models in epigenetics: insights in development and disease. *Brief Funct Genomics*. 2013 May;12(3):279–87.
185. Gibbs JR, Brug MP van der, Hernandez DG, Traynor BJ, Nalls MA, Lai SL, et al. Abundant Quantitative Trait Loci Exist for DNA Methylation and Gene Expression in Human Brain. *PLOS Genetics*. 2010 May 13;6(5):e1000952.
186. Suzuki MM, Bird A. DNA methylation landscapes: provocative insights from epigenomics. *Nat Rev Genet*. 2008 Jun;9(6):465–76.
187. Patil V, Ward RL, Hesson LB. The evidence for functional non-CpG methylation in mammalian cells. *Epigenetics*. 2014 Jun;9(6):823–8.
188. Smith ZD, Meissner A. DNA methylation: roles in mammalian development. *Nat Rev Genet*. 2013 Mar;14(3):204–20.
189. Ziller MJ, Müller F, Liao J, Zhang Y, Gu H, Bock C, et al. Genomic distribution and inter-sample variation of non-CpG methylation across human cell types. *PLoS Genet*. 2011 Dec;7(12):e1002389.
190. Reik W, Dean W, Walter J. Epigenetic reprogramming in mammalian development. *Science*. 2001 Aug 10;293(5532):1089–93.
191. Lister R, Mukamel EA, Nery JR, Urich M, Puddifoot CA, Johnson ND, et al. Global epigenomic reconfiguration during mammalian brain development. *Science*. 2013 Aug 9;341(6146):1237905.
192. Kozlenkov A, Wang M, Roussos P, Rudchenko S, Barbu M, Bibikova M, et al. Substantial DNA methylation differences between two major neuronal subtypes in human brain. *Nucleic Acids Res*. 2016 Apr 7;44(6):2593–612.
193. Jenuwein T, Allis CD. Translating the Histone Code. *Science*. 2001 Aug 10;293(5532):1074–80.
194. Pirooznia SK, Chiu K, Chan MT, Zimmerman JE, Elefant F. Epigenetic regulation of axonal growth of *Drosophila* pacemaker cells by histone acetyltransferase tip60 controls sleep. *Genetics*. 2012 Dec;192(4):1327–45.

195. Palazzo AF, Lee ES. Non-coding RNA: what is functional and what is junk? *Front Genet.* 2015;6:2.
196. Whitehead J, Pandey GK, Kanduri C. Regulation of the mammalian epigenome by long noncoding RNAs. *Biochim Biophys Acta.* 2009 Sep;1790(9):936–47.
197. Shi C, Zhang L, Qin C. Long non-coding RNAs in brain development, synaptic biology, and Alzheimer’s disease. *Brain Res Bull.* 2017 Jun;132:160–9.
198. Krol J, Loedige I, Filipowicz W. The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay. *Nat Rev Genet.* 2010 Sep;11(9):597–610.
199. Doherty TS, Roth TL. Insight from animal models of environmentally driven epigenetic changes in the developing and adult brain. *Dev Psychopathol.* 2016 Nov;28(4pt2):1229–43.
200. Weaver ICG, Cervoni N, Champagne FA, D’Alessio AC, Sharma S, Seckl JR, et al. Epigenetic programming by maternal behavior. *Nat Neurosci.* 2004 Aug;7(8):847–54.
201. Po M, A S, Ac D, S D, B L, M S, et al. Epigenetic regulation of the glucocorticoid receptor in human brain associates with childhood abuse. *Nature neuroscience* [Internet]. 2009 Mar [cited 2023 Mar 14];12(3). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19234457/>
202. Perroud N, Paoloni-Giacobino A, Prada P, Olié E, Salzmann A, Nicastro R, et al. Increased methylation of glucocorticoid receptor gene (NR3C1) in adults with a history of childhood maltreatment: a link with the severity and type of trauma. *Transl Psychiatry.* 2011 Dec 13;1(12):e59.
203. Unternaehrer E, Meyer AH, Burkhardt SCA, Dempster E, Staehli S, Theill N, et al. Childhood maternal care is associated with DNA methylation of the genes for brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and oxytocin receptor (OXTR) in peripheral blood cells in adult men and women. *Stress.* 2015;18(4):451–61.
204. Kang HJ, Kim JM, Lee JY, Kim SY, Bae KY, Kim SW, et al. BDNF promoter methylation and suicidal behavior in depressive patients. *J Affect Disord.* 2013 Nov;151(2):679–85.
205. Palma-Gudiel H, Fañanás L. An integrative review of methylation at the serotonin transporter gene and its dialogue with environmental risk factors, psychopathology and 5-HTTLPR. *Neurosci Biobehav Rev.* 2017 Jan;72:190–209.
206. Cecil CAM, Smith RG, Walton E, Mill J, McCrory EJ, Viding E. Epigenetic signatures of childhood abuse and neglect: Implications for psychiatric vulnerability. *J Psychiatr Res.* 2016 Dec;83:184–94.
207. Saavedra K, Molina-Márquez AM, Saavedra N, Zambrano T, Salazar LA. Epigenetic Modifications of Major Depressive Disorder. *International Journal of*

- Molecular Sciences. 2016 Aug;17(8):1279.
208. Fries GR, Li Q, McAlpin B, Rein T, Walss-Bass C, Soares JC, et al. The role of DNA methylation in the pathophysiology and treatment of bipolar disorder. *Neurosci Biobehav Rev*. 2016 Sep;68:474–88.
  209. Vogel Ciernia A, LaSalle J. The landscape of DNA methylation amid a perfect storm of autism aetiologies. *Nat Rev Neurosci*. 2016 Jul;17(7):411–23.
  210. Iwamoto K, Bundo M, Yamada K, Takao H, Iwayama-Shigeno Y, Yoshikawa T, et al. DNA methylation status of SOX10 correlates with its downregulation and oligodendrocyte dysfunction in schizophrenia. *J Neurosci*. 2005 Jun 1;25(22):5376–81.
  211. Campbell IC, Mill J, Uher R, Schmidt U. Eating disorders, gene-environment interactions and epigenetics. *Neurosci Biobehav Rev*. 2011 Jan;35(3):784–93.
  212. Roybal K, Theobald D, Graham A, DiNieri JA, Russo SJ, Krishnan V, et al. Mania-like behavior induced by disruption of CLOCK. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 Apr 10;104(15):6406–11.
  213. Landgraf D, Long JE, Proulx CD, Barandas R, Malinow R, Welsh DK. Genetic Disruption of Circadian Rhythms in the Suprachiasmatic Nucleus Causes Helplessness, Behavioral Despair, and Anxiety-like Behavior in Mice. *Biol Psychiatry*. 2016 Dec 1;80(11):827–35.
  214. Masana MI, Sumaya IC, Becker-Andre M, Dubocovich ML. Behavioral characterization and modulation of circadian rhythms by light and melatonin in C3H/HeN mice homozygous for the ROR $\beta$  knockout. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. 2007 Jun;292(6):R2357–67.
  215. Solt LA, Wang Y, Banerjee S, Hughes T, Kojetin DJ, Lundasen T, et al. Regulation of circadian behaviour and metabolism by synthetic REV-ERB agonists. *Nature*. 2012 Mar 29;485(7396):62–8.
  216. Banerjee S, Wang Y, Solt LA, Griffett K, Kazantzis M, Amador A, et al. Pharmacological Targeting of the Mammalian Clock Regulates Sleep Architecture and Emotional Behavior. *Nat Commun*. 2014 Dec 23;5:5759.
  217. Wang X, Mozhui K, Li Z, Mulligan MK, Ingels JF, Zhou X, et al. A promoter polymorphism in the Per3 gene is associated with alcohol and stress response. *Transl Psychiatry*. 2012 Jan;2(1):e73.
  218. Liberman AR, Kwon SB, Vu HT, Filipowicz A, Ay A, Ingram KK. Circadian Clock Model Supports Molecular Link Between PER3 and Human Anxiety. *Sci Rep*. 2017 Aug 31;7:9893.
  219. Zafar A, Overton R, Attia Z, Ay A, Ingram K. Machine learning and expression analyses reveal circadian clock features predictive of anxiety. *Sci Rep*.

2022 Apr 1;12:5508.

220. Prendergast BJ, Kay LM. Affective and adrenocorticotrophic responses to photoperiod in Wistar rats. *J Neuroendocrinol*. 2008 Feb;20(2):261–7.
221. Arrant AE, Schramm-Sapyta NL, Kuhn CM. Use of the light/dark test for anxiety in adult and adolescent male rats. *Behav Brain Res*. 2013 Nov 1;256:119–27.
222. Buynitsky T, Mostofsky DI. Restraint stress in biobehavioral research: Recent developments. *Neurosci Biobehav Rev*. 2009 Jul;33(7):1089–98.
223. Glavin GB, Paré WP, Sandbak T, Bakke HK, Murison R. Restraint stress in biomedical research: an update. *Neurosci Biobehav Rev*. 1994;18(2):223–49.
224. Walf AA, Frye CA. The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents. *Nat Protoc*. 2007;2(2):322–8.
225. Pelloux Y, Costentin J, Duterte-Boucher D. Differential involvement of anxiety and novelty preference levels on oral ethanol consumption in rats. *Psychopharmacology (Berl)*. 2015 Aug;232(15):2711–21.
226. Lucki I. The forced swimming test as a model for core and component behavioral effects of antidepressant drugs. *Behav Pharmacol*. 1997 Nov;8(6–7):523–32.
227. Li Y, Tollefsbol TO. DNA methylation detection: Bisulfite genomic sequencing analysis. *Methods Mol Biol*. 2011;791:11–21.
228. Albrecht U. Timing to Perfection: The Biology of Central and Peripheral Circadian Clocks. *Neuron*. 2012 Apr 26;74(2):246–60.
229. Partch CL, Green CB, Takahashi JS. Molecular architecture of the mammalian circadian clock. *Trends Cell Biol*. 2014 Feb;24(2):90–9.
230. Takahashi JS. Transcriptional architecture of the mammalian circadian clock. *Nat Rev Genet*. 2017 Mar;18(3):164–79.
231. Bunney BG, Bunney WE. Mechanisms of rapid antidepressant effects of sleep deprivation therapy: clock genes and circadian rhythms. *Biol Psychiatry*. 2013 Jun 15;73(12):1164–71.
232. McClung CA. How might circadian rhythms control mood? Let me count the ways. *Biol Psychiatry*. 2013 Aug 15;74(4):242–9.
233. Landgraf D, McCarthy MJ, Welsh DK. Circadian clock and stress interactions in the molecular biology of psychiatric disorders. *Curr Psychiatry Rep*. 2014 Oct;16(10):483.
234. Li JZ, Bunney BG, Meng F, Hagenauer MH, Walsh DM, Vawter MP, et al.

- Circadian patterns of gene expression in the human brain and disruption in major depressive disorder. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013 Jun 11;110(24):9950–5.
235. De Bundel D, Gangarossa G, Biever A, Bonnefont X, Valjent E. Cognitive dysfunction, elevated anxiety, and reduced cocaine response in circadian clock-deficient cryptochrome knockout mice. *Front Behav Neurosci*. 2013 Oct 24;7:152.
236. Klengel T, Binder EB. Epigenetics of Stress-Related Psychiatric Disorders and Gene  $\times$  Environment Interactions. *Neuron*. 2015 Jun 17;86(6):1343–57.
237. Zannas AS, West AE. Epigenetics and the regulation of stress vulnerability and resilience. *Neuroscience*. 2014 Apr 4;264:157–70.
238. Guedri K, Frih H, Chettoum A, Rouabhi R. Chronic restraint stress induced neurobehavioral alterations and histological changes in rat. *Toxicol Environ Health Sci*. 2017 Jun 1;9(2):123–9.
239. Cancela LM, Bregonzio C, Molina VA. Anxiolytic-like effect induced by chronic stress is reversed by naloxone pretreatment. *Brain Research Bulletin*. 1995 Jan 1;36(3):209–13.
240. Klein Hofmeijer-Sevink M, Batelaan NM, van Megen HJGM, Penninx BW, Cath DC, van den Hout MA, et al. Clinical relevance of comorbidity in anxiety disorders: A report from the Netherlands Study of Depression and Anxiety (NESDA). *Journal of Affective Disorders*. 2012 Mar 1;137(1):106–12.
241. Estanislau C, Ramos AC, Ferraresi PD, Costa NF, de Carvalho HMCP, Batistela S. Individual differences in the elevated plus-maze and the forced swim test. *Behav Processes*. 2011 Jan;86(1):46–51.
242. McEwen BS. Physiology and Neurobiology of Stress and Adaptation: Central Role of the Brain. *Physiological Reviews*. 2007 Jul;87(3):873–904.
243. Hammen C. Stress and depression. *Annu Rev Clin Psychol*. 2005;1:293–319.
244. Koresh O, Kozlovsky N, Kaplan Z, Zohar J, Matar MA, Cohen H. The long-term abnormalities in circadian expression of Period 1 and Period 2 genes in response to stress is normalized by agomelatine administered immediately after exposure. *European Neuropsychopharmacology*. 2012 Mar 1;22(3):205–21.
245. Walker WH, Walton JC, DeVries AC, Nelson RJ. Circadian rhythm disruption and mental health. *Transl Psychiatry*. 2020 Jan 23;10(1):1–13.
246. Karatsoreos IN, Bhagat S, Bloss EB, Morrison JH, McEwen BS. Disruption of circadian clocks has ramifications for metabolism, brain, and behavior. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011 Jan 25;108(4):1657–62.
247. Bouter Y, Brzózka MM, Rygula R, Pahlisch F, Leweke FM, Havemann-Reinecke U, et al. Chronic Psychosocial Stress Causes Increased Anxiety-Like Behavior and Alters Endocannabinoid Levels in the Brain of C57Bl/6J Mice.

Cannabis Cannabinoid Res. 2020 Feb 27;5(1):51–61.

248. Burgado J, Harrell CS, Eacret D, Reddy R, Barnum CJ, Tansey MG, et al. Two weeks of predatory stress induces anxiety-like behavior with co-morbid depressive-like behavior in adult male mice. *Behav Brain Res.* 2014 Dec 15;275:120–5.

249. Rodgers RJ, Dalvi A. Anxiety, defence and the elevated plus-maze. *Neurosci Biobehav Rev.* 1997 Nov;21(6):801–10.

250. Li T, Xie Y, Tao S, Zou L, Yang Y, Mou X, et al. Moderating effects of PER3 gene DNA methylation on the association of sleep quality with mental health in Chinese young adults. *Journal of Affective Disorders.* 2023 Feb 15;323:716–22.

251. Deaton AM, Bird A. CpG islands and the regulation of transcription. *Genes Dev.* 2011 May 15;25(10):1010–22.

