

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

FARKLI DOZLARDA ve SÜKROZLA BİRLİKTE UYGULANAN KAKAONUN
(*THEBROMA CACAO*) SIÇANLAR ÜZERİNDEKİ ANKSİYOLİTİK ETKİSİNİN
İNCELENMESİ

ESRA NUR ALKAN

Fizyoloji Programı
YÜKSEK LİSANS TEZİ

ANKARA
2023

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

FARKLI DOZLARDA ve SÜKROZLA BİRLİKTE UYGULANAN KAKAONUN
(*THEBROMA CACAO*) SIÇANLAR ÜZERİNDEKİ ANKSİYOLİTİK ETKİSİNİN
İNCELENMESİ

ESRA NUR ALKAN

Fizyoloji Programı
YÜKSEK LİSANS TEZİ

TEZ DANIŞMANI
Doç. Dr. Okan ARIHAN

ANKARA

2023

**FARKLI DOZLARDA VE SÜKROZLA BİRLİKTE UYGULANAN KAKAONUN
(THEOBROMA CACAO) SIÇANLAR ÜZERİNDEKİ ANKSİYOLİTİK ETKİSİNİN
İNCELENMESİ**

Öğrenci: Esra Nur ALKAN

Danışman: Doç. Dr. Okan ARIHAN

İkinci Danışman: -

Bu tez çalışması 23.05.2023 tarihinde jürimiz tarafından "Fizyoloji Programı" nda yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı: *Prof. Dr. K. Gonca AKBULUT* (imza)
(Gazi Üniversitesi)

Tez Danışmanı: *Doç. Dr. Okan ARIHAN* (imza)
(Hacettepe Üniversitesi)

Üye: *Prof. Dr. Ayşen ERDEM* (imza)
(Hacettepe Üniversitesi)

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun bulunmuştur.

3 0 Mayıs 2023

Prof. Dr. Müge YEMİŞÇİ ÖZKAN

Enstitü Müdürü

YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

Enstitü tarafından onaylanan lisansüstü tezimin/raporumun tamamını veya herhangi bir kısmını, basılı (kağıt) ve elektronik formatta arşivleme ve aşağıda verilen koşullarla kullanıma açma iznini Hacettepe Üniversitesine verdiğimi bildiririm. Bu izinle Üniversiteye verilen kullanım hakları dışındaki tüm fikri mülkiyet haklarım bende kalacak, tezimin tamamının ya da bir bölümünün gelecekteki çalışmalarda (makale, kitap, lisans ve patent vb.) kullanım hakları bana ait olacaktır.

Tezin kendi orijinal çalışmam olduğunu, başkalarının haklarını ihlal etmediğimi ve tezimin tek yetkili sahibi olduğumu beyan ve taahhüt ederim. Tezimde yer alan telif hakkı bulunan ve sahiplerinden yazılı izin alınarak kullanılması zorunlu metinlerin yazılı izin alınarak kullandığımı ve istenildiğinde suretlerini Üniversiteye teslim etmeyi taahhüt ederim.

Yükseköğretim Kurulu tarafından yayınlanan “**Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge**” kapsamında tezim aşağıda belirtilen koşullar haricince YÖK Ulusal Tez Merkezi / H.Ü. Kütüphaneleri Açık Erişim Sisteminde erişime açılır.

- Enstitü / Fakülte yönetim kurulu kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren 2 yıl ertelenmiştir. ⁽¹⁾
- Enstitü / Fakülte yönetim kurulunun gerekçeli kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren ... ay ertelenmiştir. ⁽²⁾
- Tezimle ilgili gizlilik kararı verilmiştir. ⁽³⁾

23/05/2023

Esra Nur ALKAN

“*Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge*”

- (1) *Madde 6. 1. Lisansüstü teze ilgili patent başvurusu yapılması veya patent alma sürecinin devam etmesi durumunda, tez danışmanının önerisi ve enstitü anabilim dalının uygun görüşü üzerine enstitü veya fakülte yönetim kurulu iki yıl süre ile tezin erişime açılmasının ertelenmesine karar verebilir.*
- (2) *Madde 6. 2. Yeni teknik, materyal ve metotların kullanıldığı, henüz makaleye dönüşmemiş veya patent gibi yöntemlerle korunmamış ve internette paylaşılması durumunda 3. şahıslara veya kurumlara haksız kazanç imkanı oluşturabilecek bilgi ve bulguları içeren tezler hakkında tez danışmanının önerisi ve enstitü anabilim dalının uygun görüşü üzerine enstitü veya fakülte yönetim kurulunun gerekçeli kararı ile altı ayı aşmamak üzere tezin erişime açılması engellenebilir.*
- (3) *Madde 7. 1. Ulusal çıkarları veya güvenliği ilgilendiren, emniyet, istihbarat, savunma ve güvenlik, sağlık vb. konulara ilişkin lisansüstü tezlerle ilgili gizlilik kararı, tezin yapıldığı kurum tarafından verilir *. Kurum ve kuruluşlarla yapılan işbirliği protokolü çerçevesinde hazırlanan lisansüstü tezlere ilişkin gizlilik kararı ise, ilgili kurum ve kuruluşun önerisi ile enstitü veya fakültenin uygun görüşü üzerine üniversite yönetim kurulu tarafından verilir. Gizlilik kararı verilen tezler Yükseköğretim Kuruluna bildirilir.*
Madde 7.2. Gizlilik kararı verilen tezler gizlilik süresince enstitü veya fakülte tarafından gizlilik kuralları çerçevesinde muhafaza edilir, gizlilik kararının kaldırılması halinde Tez Otomasyon Sistemine yüklenir

* Tez danışmanının önerisi ve enstitü anabilim dalının uygun görüşü üzerine enstitü veya fakülte yönetim kurulu tarafından karar verilir.

ETİK BEYAN

Bu çalışmadaki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, kullandığım verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı, yararlandığım kaynaklara bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu, tezimin kaynak gösterilen durumlar dışında özgün olduğunu, Doç. Dr. Okan Arıhan danışmanlığında tarafımdan üretildiğini ve Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Yönergesine göre yazıldığını beyan ederim.

Esra Nur Alkan

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim sürecinde ve tezimin her aşamasında bana bilgileriyle yol gösteren, destek veren ve birçok şey öğrenmemde katkıda bulunan değerli danışmanım Doç. Dr. Okan ARIHAN'a, sağladıkları tüm imkan ve katkılar için başta anabilim dalı başkanımız Prof. Dr. Ayşen ERDEM'e ve Hacettepe Üniversitesi Fizyoloji Anabilim dalının kıymetli hocalarına, değerli yorumlarıyla tez içeriğime katkıda bulunan Dr. Öğr. Üyesi Serkan KARAIŞMAİLOĞLU'na, tez çalışmamda kullanmış olduğum kakaonun temin edilmesini sağlayan ÜLKER'e, tez çalışmam boyunca her türlü konuda yardımcı olan Dr. A. Onur DAŞTAN ve Dr. Deniz ÖNAL'a, tezimin deney aşamalarında yardımlarını esirgemeyen Dr. Mustafa GÖRMÜŞ, Dr. Alper TURAN, Dr. Sezgi Fırat ÖZGÜR, Dr. Kamran NAGHİZADE, Kardelen PEKASLAN ve Beyza Nur ŞAHİN'e, elbette ailem ve arkadaşlarıma çok teşekkür ederim.

ÖZET

Alkan EN. Farklı Dozlarda ve Sükrozla Birlikte Uygulanan Kakaonun (*Theobroma Cacao*) Sıçanlar Üzerindeki Anksiyolitik Etkisinin İncelenmesi. Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Fizyoloji Yüksek Lisans Tezi, Ankara, 2023.

Anksiyete bozukluğu sık görülen bir rahatsızlıktır. Mevcut farmakolojik tedavilerin etkinliği geç başlamakta ve yan etkileri hastaları olumsuz etkilemektedir. Bu yüzden hastalar, anksiyete durumunu azaltan farklı ürünlere yönelmektedirler. Kakao çeşitli biyoaktif maddeler içerir ve sık tüketilir. Bu çalışmada kakaonun farklı dozlarda alınmasının veya kakaonun şekerli ya da şekeriz tüketilmesinin akut anksiyolitik etkisi araştırılmıştır. Kakaonun oral yolla verildikten sonra muhtemel anksiyolitik etkisinin ne zaman ortaya çıkacağı bilinmediği için öncelikle süre tespit edilmeye çalışılmıştır. Süre tayininden sonra ana çalışmaya geçilmiştir. Ana çalışma için 64 Wistar albino erkek sıçan kullanılmıştır ve her grup 8 adet sıçandan oluşturulmuştur. İki farklı dozda kakao (500 mg/kg ve 1000 mg/kg), sükroz (1000 mg/kg), her iki dozdaki kakao+sükroz, diapezam ve tween 80 oral gavajla sıçanlara tek doz uygulanmıştır. Açık alan testi ve yükseltilmiş artı labirent testleriyle anksiyeteye ilişkili davranışlar değerlendirilmiştir. Rotarod testiyle lokomotor aktivite ölçülmüştür. Hipokampus ve kan dokusunda çeşitli biyokimyasal parametrelere bakılarak anksiyolitik etkiye yönelik herhangi bir değişim olup olmadığı araştırılmıştır. Ayrıca kanda ALT, AST, BUN, kreatinin, total kolesterol, trigliserid ve glikoz seviyeleri incelenmiştir. Çalışmanın sonucunda kakaonun akut uygulanması genel olarak anksiyeteye ilişkili davranışları azaltırken sükrozla birlikte verildiğinde bu etki kaybolmuştur. GABA miktarları üzerinde etkisi olmamakla birlikte, sükrozla birlikte kullanıldığında GABA seviyesi artmıştır. Serotonin ve noradrenalin miktarını değiştirmedeği görülmüştür. Kortizol miktarı üzerinde etki oluşturmazken sükrozla birlikte kullanıldığında kortizol miktarı azalmıştır. İncelenen diğer kan parametrelerinde herhangi bir değişim gözlenmemiştir.

Anahtar Kelimeler: Anksiyete, kakao, sükroz, GABA, kortizol

Destekleyen: Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Projeleri TYL-2022-19766

ABSTRACT

Alkan EN. Investigation of Anxiolytic Effect of Cacao (*Theobroma Cacao*) Administered at Different Doses and with Sucrose on Rats. Hacettepe University Graduate School of Health Sciences, Physiology Program Master Thesis, Ankara, 2023. Anxiety disorder is a common condition. The effectiveness of current pharmacological treatments is delayed and their side effects negatively impact patients. Therefore, patients turn to different products. Cocoa is a frequently consumed substance that contains various bioactive compounds. This study investigated the acute anxiolytic effect of cocoa consumed in different doses or with or without sugar. Since the time when cocoa's potential anxiolytic effect would appear after oral administration was not known, the duration was determined first. The main study was then conducted. 64 male Wistar albino rats were used in the main study, with 8 rats in each group. Two different doses of cocoa (500 mg/kg and 1000 mg/kg), sucrose (1000 mg/kg), both doses of cocoa+sucrose, diazepam, and tween 80 were administered orally to rats in a single dose. Anxiety-related behaviors were evaluated using open field test and elevated plus maze test, and locomotor activity was measured using the rotarod test. Various biochemical parameters were examined from hippocampus and blood to determine whether there was any change in the anxiolytic effect. In addition, ALT, AST, BUN, creatinine, total cholesterol, triglyceride, and glucose levels in the blood were examined. The results of the study showed that acute administration of cocoa generally reduced anxiety-related behaviors, but this effect disappeared when cocoa is given with sucrose. Although cocoa did not affect GABA levels, the combination with sucrose increased GABA levels. It did not change the levels of serotonin and noradrenaline. While cocoa did not have an effect on cortisol levels, the combination with sucrose decreased cortisol levels. No changes were observed in the other examined blood parameters.

Keywords: Anxiety, cocoa, sucrose, GABA, cortisol

Supported by: Hacettepe University Scientific Research Projects TYL-2022-19766

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ONAY SAYFASI	iii
YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI	iv
ETİK BEYAN SAYFASI	v
TEŞEKKÜR	vi
ÖZET	vii
ABSTRACT	viii
İÇİNDEKİLER	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR	xii
ŞEKİLLER	xv
TABLolar	xvi
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Anksiyete Bozukluğu	3
2.1.1. Anksiyete Bozukluklarının Sınıflandırılması	3
2.1.2. Anksiyete Bozukluğunun Belirtileri	4
2.1.3. Anksiyete Bozukluğunun Görülme Sıklığı ve Etkileri	5
2.2. Anksiyete Bozukluklarının Nörobiyolojisi	6
2.2.1. Anksiyete ile İlgili Beyin Yapıları	6
2.2.2. Anksiyete ile İlişkili Ana Nörotransmitterler	12
2.3. Anksiyete Bozukluklarının Farmakolojik Tedavisi	14
2.4. Davranış Testleri	16
2.4.1. Açık Alan Testi	17

2.4.2. Yükseltilmiş Artı Labirent Testi	18
2.4.3. Aydınlık-Karanlık Kutusu Testi	18
2.5. Kakao	19
2.5.1. Kakaonun Elde Edilme Süreci	20
2.5.2. Kakaonun Bileşenleri	22
2.6. Sükroz	25
3. GEREÇ VE YÖNTEM	28
3.1. Deney Hayvanları	28
3.2. Deney Grupları ve Deney Protokolü	28
3.3. Gavaj Uygulaması	31
3.4. Davranış Deneyleri	31
3.4.1. Açık Alan Testinin Uygulanması	31
3.4.2. Yükseltilmiş Artı Labirent Testinin Uygulanması	32
3.4.3. Rotarod Testinin Uygulanması	34
3.5. Kan ve Beyin Dokularının Alınması	36
3.6. Doku Homojenizasyonu	39
3.7. Biyokimyasal Analizler	40
3.7.1. Toplam Protein Tayini	40
3.7.2. ELISA Deneyleri	40
3.7.3. Kan Parametrelerinin Ölçümü	46
3.8. İstatistiksel Analizler	46
4. BULGULAR	48
4.1. Süre Tayini için Yapılan Ön Çalışmanın Bulguları	48
4.2. Ana Deney Bulguları	49
4.2.1. Hayvanların Vücut Ağırlıkları	49
4.2.2. Açık Alan Testi Bulguları	49
4.2.3. Yükseltilmiş Artı Labirent Testi Bulguları	53
4.2.4. Rotarod Testi Bulguları	57

4.2.5. Hipokampüs Dokusuna ait Bulgular	58
4.2.6. Kan Serum Parametrelerine ait Bulgular	60
5. TARTIŞMA	62
5.1. Süre Tayini	62
5.2. Davranış Testlerinin Değerlendirilmesi	62
5.2.1. Açık Alan Testi	63
5.2.2. Yükseltilmiş Artı Labirent Testi	65
5.2.3. Rotarod testi	67
5.3. Hipokampüs GABA Seviyeleri	68
5.4. Hipokampüs Serotonin Seviyeleri	69
5.5. Hipokampüs Noradrenalin Seviyeleri	70
5.6. Kan Serum Parametreleri	70
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	72
7. KAYNAKLAR	73
8. EKLER	
EK-1: Tez Çalışması ile İlgili Etik Kurul İzni	
EK-2: Dijital Makbuz	
EK-3: Tez Çalışması Orjinallik Formu	
9. ÖZGEÇMİŞ	

SİMGELER VE KISALTMALAR

5-HT	5-hidroksitriptamin
ACTH	Adrenokortikotropin Hormonu
APA	Amerikan Psikiyatri Birliği
AŞ	Anonim Şirket
BA	Bazal Amigdala
BCA	Bicinchoninic Asit
BDNF	Beyin Kökenli Nörotrofik Faktör
BDZ	Benzodiazepin
BLA	Bazolateral Amigdala
BMA	Bazal Medial Amigdala
BNST	Stria Terminalisin Yatak Çekirdeği
BSA	Sığır Serum Albümin
CEA	Merkezi Amigdala
CRH	Kortikotropin Salgılayıcı Hormon
D	Diazepam Grubu
dHPC	Dorsal Hipokampüs
DRN	Dorsal Raphe Çekirdekleri
DSM	Ruhsal Bozuklukların Tanısal ve İstatiksel El Kitabı
ELISA	Enzime Bağlı İmmünosorbent Tahlili
g	Gram
GABA	Gama-aminobütirik Asit
GAD	Glutamik Asit Dekarboksilaz
HPA	Hipotalamo-hipofizer-adrenal
HPC	Hipokampüs
HRP	Horseradish Peroxidase
i.p.	İntraperitoneal

K	Kontrol Grubu
K1000	1000 mg/kg Kakao Grubu
K1000+S	1000 mg/kg Kakao + Sükroz Grubu
K500	500 mg/kg Kakao Grubu
K500+S	500 mg/kg Kakao + Sükroz Grubu
kg	Kilogram
LA	Lateral Amigdala
LC	Locus Coeruleus
M.Ö.	Milattan Önce
Maks	Maksimum
mg	Miligram
Min	Minimum
ml	Mililitre
mPFC	Medial Prefrontal Korteks
MRN	Medial Raphe Çekirdekleri
n	Örneklemdaki Denek Sayısı
NA	Noradrenalin
nm	Nanometre
nmol	Nanomol
PBS	Fosfat Tampon
PFC	Prefrontal Korteks
R²	Determinasyon Katsayısı
rpm	Dakikadaki Devir Sayısı
S	Sükroz Grubu
SNRI	Serotonin-norepinefrin Geri Alım İnhibitörleri
SSRI	Seçici Serotonin Geri Alım İnhibitörü
T	Tween80 Grubu
TCA	Trisiklik Antidepresan

vHPC	Ventral Hipokampus
W	Watt
°C	Santigrad (celcius) Derece
µg	Mikrogram
µl	Mikrolitre

ŞEKİLLER

Şekil	Sayfa
2.1. Anksiyete bozuklukları ile ilişkili yapılar	8
2.2. Kakao meyvesi ve bölümleri	20
2.3. Kakaonun işlenmesi ve doğal kakao ürünleri	21
2.4. Monomerik kateşinlerin kimyasal yapısının gösterimi	23
2.5. Metilksantinlerin kimyasal yapısının gösterimi	24
3.1. Deney protokolü	30
3.2. Açık alan testinde hayvanların gözlenmesi	32
3.3. Yükseltilmiş artı labirent testi	33
3.4. Rotarod testi	34
3.5. Hipokampus izolasyonu	38
3.6. Mekanik homojenizatör	39
3.7. Ultrasonik homojenizatör	39
4.1. Merkez alana giriş sayısı parametresinin gruplar arası karşılaştırılması	50
4.2. Şahlanma sayısı parametresinin gruplar arası karşılaştırılması	51
4.3. Tımarlanma sayısı parametresinin gruplar arası karşılaştırılması	52
4.4. Çizgi geçme sayısı parametresinin gruplar arası karşılaştırılması	52
4.5. Açık kola giriş sayısı parametresinin gruplar arası karşılaştırılması	54
4.6. Açık kolda geçilen süre parametresinin gruplar arası karşılaştırılması	55
4.7. Açık kolda geçilen süre yüzdesi parametresinin gruplar arası karşılaştırılması	55
4.8. Yükseltilmiş artı labirent testinin ön çalışma verileri ve ana çalışma verilerinin birlikte değerlendirilmesiyle açık kolda geçirilen süre yüzdesi parametresinin gruplar arası karşılaştırılması	56
4.9. Düzenek üzerinde kalma süresinin gruplar arası karşılaştırılması	57
4.10. GABA miktarının gruplar arası karşılaştırılması	58
4.11. Serotonin miktarının gruplar arası karşılaştırılması	59
4.12. Serum kortizol miktarının gruplar arası karşılaştırılması	60

TABLULAR

Tablo	Sayfa
3.1. Ana deney grupları	30
4.1. Süre tayini için yapılan ön çalışmanın davranış testi parametreleri	48
4.2. Vücut ağırlıkları	49
4.3. Açık alan testi parametreleri	50
4.4. Yükseltilmiş artı labirent testi parametreleri	53
4.5. Rotarod testi	57
4.6. GABA, serotonin ve noradrenalin miktarları	58
4.7. Serum kortizol miktarları	60
4.8. ALT, AST, BUN ve kreatinin miktarları	61
4.9. Glikoz, trigliserid ve total kolesterol miktarları	61

1. GİRİŞ

Anksiyete bozuklukları hem çocuklarda hem de yetişkinlerde sıklıkla görülen ruhsal bozukluklardan biridir (1, 2). Anksiyete bozukluğu tanısı koyulan her dört kişiden üçü yaşamları boyunca en az bir ruhsal bozukluk daha yaşar (3). Anksiyete bozukluğunda ruhsal, bilişsel ve otonomik belirtiler bir arada görülür (4). Kişi yaşam kalitesini ve psikososyal işlevselliğini ciddi bir şekilde etkileyecek kadar yoğun korku ve endişe duygusu yaşar (5-7). Yaşam kalitesinin düşmesi ve başka bir hastalıkla birlikte görülmesi mortalite riskini arttırır (8). Artan ölüm riskleriyle birlikte insidans oranının yüksek olması halk sağlığını olumsuz etkiler. Bu durum ekonomik yükleri de beraberinde getirir (8-10). Dünya sağlık örgütünün verileri, giderek artan insidans oranına dikkat çekmektedir (11). Dolayısıyla her geçen yıl bireysel, toplumsal ve ekonomik yükler de artarak ilerleyecektir. Tüm bunlar anksiyete bozukluklarının ciddi ve önlem alınması gereken bir sorun olduğunu göstermektedir.

Anksiyete bozukluğunun farmakolojik tedavisinde seçici serotonin geri alım inhibitörleri, serotonin-noradrenalin geri alım inhibitörleri ve benzodiazepinler ana tedavi basamağını oluşturur. Ancak bu ilaç tedavileri, çeşitli yan etkilere, yetersiz etkinliğe ve düşük tedavi yanıtına sahiptir (12, 13). Bununla birlikte tedaviye yanıt veren kişilerin de yalnızca yarısında iyileşme gözlenir (12). Anksiyete bozukluğu olup iyileşemeyen ya da ciddi yan etkilerden dolayı farmakolojik tedaviyi sürdüremeyen hastalar, anksiyolitik etkisi olabilecek diğer ürünlere yönelmektedir (13, 14).

Kakao ve kakao türevli ürünler, dünya genelinde ciddi miktarda üretilen ve günlük hayatta sıklıkla tüketilen besinlerdendir. Ayrıca kakao, çeşitli biyoaktif bileşiklerin de önemli bir kaynağıdır (15, 16). Literatür tarandığında kakaonun uzun süreli nöroprotektif etkilerini destekleyen veriler olmasına rağmen, duygusal işlevleri ve davranış üzerindeki ani etkilerine yönelik çalışmalara pek rastlanmamıştır (17). Bununla birlikte kakaonun anksiyete üzerine etkisini araştıran çalışmaların sayısının da oldukça az olduğu gözlemlenmiştir. Ek olarak yapılan çalışmalar, genellikle kakao içerisinde yer alan biyoaktif bileşenlerin etkisinin gözlenmesine yöneliktir.

Kakaonun oral yolla tek doz verilip akut anksiyolitik etkisini araştıran bir çalışmaya literatürde rastlanmamıştır. Kakaonun genellikle şekerle tatlandırılarak tüketildiği bilinmektedir. Ek olarak kakao ürünlerindeki kakao oranı, çok düşük yüzdelerden çok yüksek yüzdeler kadar değişim göstermektedir. Tüm bunlar göz önünde bulundurulduğunda yapılan bu çalışma hem insanların kakao tüketim şekline uygun bir model hem de kakaonun akut anksiyolitik etkisinin araştırılmasına yönelik tasarlanmıştır. Bu doğrultuda kakaonun farklı dozlarda alınmasının veya kakaonun şekerli ya da şekersiz tüketilmesinin anksiyolitik etkisinin araştırılması amaçlanmıştır. Bu bağlamda yapılan bir çalışmaya literatürde rastlanmamıştır. Ana tatlandırıcı olarak dünya çapında çoğunlukla sükroz kullanıldığı için bu çalışmada da sükroz tercih edilmiştir (18). Literatür tarandığında sükrozun anksiyete üzerine etkisi net olarak ifade edilmemektedir. Bununla birlikte şeker tüketiminin anksiyete veya depresif davranışlarda kalıcı değişikliklere yol amadığı varsayılmaktadır (19).

Araştırmanın amacı doğrultusunda çalışmanın hipotezleri aşağıda belirtildiği gibi kurulmuştur.

1. Kakaonun Wistar albino cinsi sıçanlara oral yolla tek doz (500 ve 1000mg/kg) uygulanması anksiyete benzeri davranışları azaltır.
2. Kakaonun Wistar albino cinsi sıçanlara oral yolla tek doz (500 ve 1000mg/kg) uygulanması lokomotor aktivitede değişikliğe neden olmaz.
3. Kakaonun Wistar albino cinsi sıçanlara oral yolla tek doz (500 ve 1000mg/kg) uygulanması hipokampüs dokusundaki serotonin, noradrenalin, gama-amino bütirik asit miktarını ve kan kortizol düzeyini değiştirir.
4. Wistar albino cinsi sıçanlara oral yolla tek doz %10 sükroz solüsyonunun kakao (500 ve 1000mg/kg) ile birlikte uygulanması, kakaonun anksiyolitik etkisini azaltmaz.
5. Wistar albino cinsi sıçanlara oral yolla tek doz kakao (500 ve 1000mg/kg) uygulanması karaciğer ve böbrek fonksiyon testlerinde değişikliğe neden olmaz. Total kolesterol, trigliserid ve kan glikoz seviyelerini değiştirmez.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Anksiyete Bozukluğu

Anksiyete, organizmayı tehdit eden unsurlara karşı uyarıcı bir sinyal olup kişinin önlem almasını sağladığı için gerekli bir tepkidir. Bunların yanı sıra belirsiz ve rahatsız edici bir endişe duygusudur (20). Anksiyete duygusunun aşırı bir şekilde hissedilmesi ve uzun süre devam etmesi anksiyete bozukluğu olarak tanımlanır (21). Bu bozukluk, 20. Yüzyıl itibariyle psikiyatrik sınıflandırmada yerini almıştır (22). Anksiyete bozukluğu 19. yüzyıldan önce bir hastalık olarak bilinmemesine rağmen anksiyete ve anksiyete bozukluğu kavramlarının kökleri, M.Ö. beşinci yüzyıla kadar uzanır (22, 23). Dahası M.Ö. 106-43 yıllarında yaşamış olan ve filozof olarak bilinen Cicero, tehlikeli bir anda ortaya çıkan geçici anksiyete ile kalıcı eğilim gösteren anksiyete duygularını birbirinden ayıran ve anksiyeteyi tıbbi bir hastalık olarak tanımlayan ilk kişidir (22-24). Günümüzde ise hastalıkları tanımlayan, sınıflandıran, görülme sıklığını bildiren, tanı koyma kriterleri oluşturan sistemler vardır. Ruhsal hastalıklar için ise en çok bilinen ve kullanılan ana sınıflandırma aracı Amerikan Psikiyatri Birliği (APA) tarafından yayınlanan DSM (Ruhsal Bozuklukların Tanısal ve İstatistiksel El Kitabı) tanı koyma sistemidir (25). Son olarak 2013 yılında yayınlanan DSM-5; anksiyeteyi gelecekte meydana gelme olasılığı olan tehlikeli bir durumu bekleme hali olarak tanımlar. Bu haliyle gerçekte olan veya yakında algılanan tehlikeli bir duruma tepki olarak verilen korku duygusundan ayrılır (26). Korku ve anksiyete kavramlarının ayırt edilip edilemeyeceği yönünde birbirine zıt düşünceler olmakla birlikte DSM-5, ayrılan yönleri üzerinde durarak bir tanım geliştirmiştir ancak iki durumun örtüşebilir olduğunu da belirtmiştir (26, 27).

2.1.1. Anksiyete Bozukluklarının Sınıflandırılması

DSM-5 anksiyete bozukluklarını; semptomları tetikleyen uyarıcı türleri ve durumları ile belirli alt tiplere ayırmıştır ve son güncelleme ile bazı yenilikler getirmiştir (28). Anksiyete bozuklukları altında değerlendirilen travma sonrası stres bozukluğu ve obsesif-kompulsif bozukluk nörobiyolojik temellerinden dolayı bu

bölümden çıkartılmıştır. Seçici mutizm¹ ve ayrılık anksiyetesi² bozukluğu yeni güncellemeyle birlikte anksiyete bozuklukları sınıflandırmasına dahil edilmiştir (12). Bunlarla birlikte sosyal anksiyete bozukluğu, belirli bir duruma veya nesneye karşı gelişen (yükseklik, böcek fobisi) spesifik fobiler ve yaygın anksiyete bozukluğu³ DSM-5'te varlığını sürdürmeye devam etmiştir (26, 28). Panik bozukluğun ise mevcut olan agorafobili ya da agorafobisiz hali DSM-5 ile sonlandırılmış ve hem panik bozukluğun hem de agorafobinin⁴ kendi tanı sınıfı ayrı bir şekilde oluşturulmuştur (30, 31). Ek olarak DSM-5'e göre anksiyete bozukluklarının başka bir sağlık durumuna bağlı, madde yoksunluğunun veya ilaç tedavisinin yol açtığı, başka belirtilmiş ve belirtilmemiş anksiyete bozuklukları olmak üzere farklı alt sınıfları da vardır (26). Anksiyete bozuklukları çeşitli sınıflara ayrılmasına rağmen hepsi aşırı korku ve uygunsuz anksiyete deneyimi içerir (28).

2.1.2. Anksiyete Bozukluğunun Belirtileri

Anksiyete bozuklukları algılanan tehlikeye karşı somatik ve ruhsal tepkilerden oluşur (4). Kişi dikkatini tehdit edici unsurlar üzerinde yoğunlaştırır ve vücut buna karşı harekete geçerek tepkisel süreci başlatır (33, 34). Somatik semptomlar çoğunlukla otonomik uyarılmayı ve kasların gerilmesini içerir (4). Fakat tüm kas gruplarında aynı şekilde aktivite artışı olmaz. Genellikle baş, boyun ve omuz kaslarının gerimi artar. Dolayısıyla bu bölgelerde ekstra olarak rahatsızlık ve ağrı ortaya çıkabilir (24). Otonomik uyarı ise kalp hızında, kan basıncında, ter bezi aktivitesinde ve solunumda artışa neden olur. Ayrıca gastrointestinal ve mesane aktivitesinde artış görülebilir (33). Ancak otonomik belirtiler daha çok şiddetli anksiyete durumlarında gözlenir (24).

¹ Normal dil gelişimi ve becerisine rağmen seçilmiş kişiler veya ortamlar (genellikle ebeveyn veya aile ortamı) haricinde bireyin konuşamama durumu (29).

² Bireyin bağlandığı kişilerden (partner, arkadaş) ayrılma konusunda orantısız bir şekilde korku duyması hali (28).

³ Belirli alanlarda (iş ve okul başarısı gibi) sürekli ve aşırı anksiyete yaşama durumu (26).

⁴ Anksiyete belirtilerin olduğu durumlarda kaçma ihtimalinin güç olacağı yerler (toplu taşıma araçları, açık alanlar vb.) karşısında yaşanan panik benzeri hal (32).

Anksiyete bozukluklarında bilişsel işlevler abartılı (aşırı uyanıklık hali) hale gelebilir ya da inhibe (dikkat dağınıklığı) olma durumu da söz konusu olabilir. Ek olarak kavramsal (kontrolü yitirme, başa çıkamama vs.), algısal (gerçek dışı hisler) ve düşünme (objektif düşünememe) süreçleri bozulabilir (35). Bunların yanı sıra huzursuzluk, hareketsizlik, titreme, kaçınma gibi davranışsal belirtiler de bireyin kişilik özelliklerine göre ortaya çıkabilir (24).

Hafif düzeyde ve geçici olan anksiyete semptomları bozukluk olarak değerlendirilmez ve bu anksiyete deneyimini çoğunlukla herkes yaşar (4). Bozuklukta semptomlar şiddetli olmakla birlikte semptomların yoğunluğu zaman zaman azalabilir ancak anksiyete bozuklukları genellikle kronik bir seyir izler (4, 36).

2.1.3. Anksiyete Bozukluğunun Görülme Sıklığı ve Etkileri

Anksiyete bozuklukları hem çocuklarda hem de yetişkinlerde sıklıkla görülen ruhsal bozukluklardan biridir (1, 2). Yaygın olarak görülen diğer ruhsal bozukluklarla kıyaslandığında çok daha erken yaşlarda ortaya çıkmaya başlar (37). Bununla birlikte bazı alt tiplerinin ortaya çıkma ve görülme yaş aralığı değişkenlik göstermektedir. Ayrılık kaygısı bozukluğu ve seçici mutizm çocukluk çağında ortaya çıkıp çocuklarda ve ergenlerde görülürken panik bozukluk ve agorafobi esas olarak yetişkinlikte ortaya çıkar (1). Sosyal anksiyete bozukluğu ile spesifik fobiler yaşam boyu prevalansı (%10'dan fazla) en yaygın görülen anksiyete bozukluklarıdır (29). Ayrıca yaygın anksiyete bozukluğu ve panik atak krizleriyle karakterize olan panik bozukluk yine sıklıkla görülen bozukluklardandır (30).

Anksiyete bozukluklarında komorbidite oranı yüksektir ve anksiyete bozukluğu tanısı koyulan her dört kişiden üçü yaşamları boyunca en az bir başka ruhsal bozukluk yaşar (3). Dahası anksiyete bozukluğu olan bireyler zaman içinde daha fazla anksiyete bozukluğu geliştirme riski altındadır (38).

Anksiyete bozukluğunun ortaya çıkmasında ve anksiyete tepkilerinin farklılık göstermesinde çevresel faktörler, kalıtsal yapı ve kişilik özellikleri etkilidir (24). Düşük eğitim seviyesi, düşük sosyoekonomik statü, büyük şehirde yaşamak, evli olmamak, içe dönük kişilik özelliğine sahip olmak gibi etkenler yüksek anksiyete düzeyi ile

ilişkilidir (24, 39). Ayrıca herhangi bir anksiyete bozukluğunun yaşam boyu yaygınlık oranları incelendiğinde kadınların (%30,5) anksiyete bozukluğu geliştirme olasılığının erkeklere (%19,2) göre daha yüksek olduğu ve dolayısıyla kadınların bu rahatsızlığa daha yatkın olduğu sonucu ortaya çıkmaktadır (40).

Anksiyete bozukluklarının bireylerin yaşam kalitesini ve psikososyal işlevselliğini belirgin bir şekilde etkilediği yapılan birçok çalışmayla raporlanmıştır (5-7). Özellikle sosyal anksiyete bozukluğuna sahip kişilerin eğitim (sınıfta kalma, okulu bırakma), iş (düşük performans) ve aile hayatlarında başarısız olma olasılığı yüksektir (41). Dahası anksiyete bozuklukları mortalite riskini de önemli ölçüde artırır (8). Yüksek görülme sıklığı ve artan ölüm riskleriyle birlikte halk sağlığı üzerinde ciddi etkiler oluşturur. Bunun yanı sıra küresel düzeyde de çok büyük ekonomik yüklerle sebep olur (8-10).

2.2. Anksiyete Bozukluklarının Nörobiyolojisi

Anksiyete bozukluğunun tüm belirti ve etkilerinden tek bir yapı sorumlu değildir (24). Bununla birlikte kesin nörobiyolojik mekanizmalar hala büyük ölçüde bilinmemektedir. Anksiyete ile ilişkisi bilinen ve yapılan çalışmalarda en fazla odaklanılan nöroanatomi yapılar amigdala, hipokampus ve prefrontal korteksten oluşurken en fazla hipotez kurulan nörotransmitterler ise gama-aminobütirik asit (GABA), serotonin ve noradrenalindir (20, 42).

2.2.1. Anksiyete ile İlgili Beyin Yapıları

Anksiyete durumunun ortaya çıkması için belirsiz bir uyarının tehdit olarak tanımlanması gerekir. Bunun içinse önce çevresel uyarıların duyu sistemleri tarafından algılanması ve çeşitli sistemler tarafından yorumlanması gereklidir (43).

Limbik sistem, beynin duygusal merkezidir. Limbik korteks, hipokampal formasyon, amigdala, septal alan ve hipotalamustan oluşur. Duyularla alakalı davranışların tanınması, etkinleştirilmesi, düzenlenmesi ve kontrol edilmesi için bu yapılar kendi aralarında ve beynin diğer bölümleri arasında bağlantılar kurar (44, 45).

Beyin sapında bulunan noradrenalinle ilişkili locus ceruleus ve serotoninle bağlantılı olan raphe nucleusları limbik sisteme direkt projeksiyonlar verir. Bu yapıların birbirleriyle etkileşimleri sonucunda anksiyetenin ortaya çıktığı düşünülmektedir (20, 24). Ek olarak anksiyete bozukluğunun başlıca semptomu olan korku duygusunun anksiyete ile ilişkili olan davranış ve mekanizmalarının incelenmesiyle bu bozuklukların daha iyi anlaşılacağına inanılmaktadır (46).

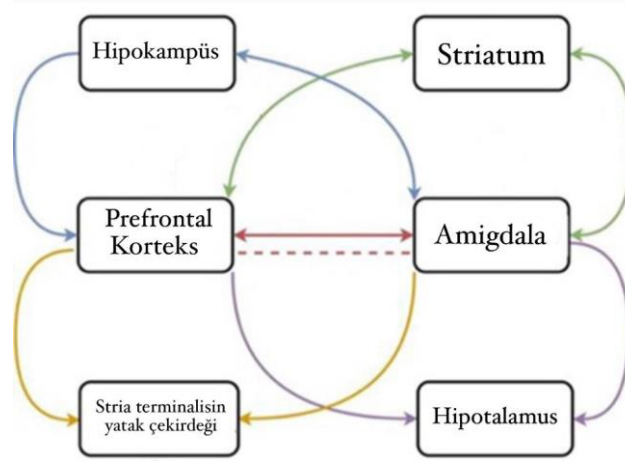
Amigdala

Amigdala, korku tepkilerinin ve anksiyete bozukluklarının oluşumunda önemli bir rol oynar (46, 47). Tehdit edici faktörün hızlı bir şekilde algılanmasında, tehditle ilişkili uyarıların işlenmesinde ve savunma davranışlarının başlatılmasında etkilidir (48). Ayrıca korku hafızasının oluşturulmasında ve depolanmasında esas olarak görev alır (49).

Amigdala beynin medial temporal lobunda yer alır. Farklı işlevlere hizmet eden ve beynin diğer bölgeleriyle farklı anatomik bağlantılara sahip olan çeşitli çekirdeklerden oluşur (47). Bu çekirdekler birçok kortikal ve subkortikal alanlarla tek yönlü veya karşılıklı olarak bağlantılar kurar (49) (Şekil 2.1). Amigdala, bazolateral amigdala (BLA) ve merkezi amigdala (CEA) olmak üzere iki ana alana ayrılır. BLA da kendi içerisinde lateral amigdala (LA), bazal amigdala (BA) ve bazal medial amigdala (BMA) çekirdek alanlarına bölünür (50). BLA, yoğunlukla glutamaterjik ana nöronlardan ve daha az miktarda GABAerjik internöronlardan oluşur (51). BLA talamustan, hipokampüsten, singulat girustan ve prefrontal korteksten LA yoluyla duyuşsal bilgileri alır, bu bilgiyi BA'da işler ve CEA'ya gönderir (44, 52). CEA, amigdalanın başlıca çıktı çekirdeği olarak hizmet eder ve BLA'nın aksine sadece GABAerjik nöronlardan oluşur (51). BLA tarafından uyarılan CEA yanıt olarak GABAerjik nöronlarını, hipotalamusa ve beyin sapına projekte eder. Sonuç olarak CEA'nın çıktısı, davranışsal tepkilere (özellikle kaçınma ve donma) ve somatik belirtilere dönüşür (52, 53).

BLA'dan gelen nöronlar ayrıca stria terminalisin yatak çekirdeğindeki (BNST) hücreleri de aktive eder (53). Bu çekirdek de amigdalanın CEA'sının çıktı yaptığı

yapıların çoğuna projeksiyon gönderir (46). BNST, belirsiz tehditleri algılayan ve işleyen doğuştan gelen bir savunma devresinin önemli bir parçasıdır ve anksiyete bozukluğunda amigdala ile birlikte görev alır (46, 54). BNST ve amigdala, benzer davranışsal ve fizyolojik çıktıya aracılık eden beyin bölgelerinin aktivasyonunu koordine etmek için birbirinin işleyişini düzenler (55).



Şekil 2.1. Anksiyete bozuklukları ile ilişkili yapılar (56)

Amigdalanın hiperaktivitesi özellikle sosyal anksiyete bozukluğu gibi fobik bozukluklarla birlikte görülmekle beraber anksiyete bozukluklarının ortaya çıkmasında kilit bir rol oynamaktadır (57). Ayrıca insanlar üzerinde yapılan bir çalışmada, iyi bilinen bir anksiyolitik ilacın kullanılmasıyla ilişkili olarak amigdalanın aktivasyonunun azaldığının tespit edilmesi bu görüşü desteklemektedir (58).

Hipokampus

Limbik sistemin bir diğer parçası olan hipokampal formasyon; dentat girus, hipokampus (HPC) ve subikulum olmak üzere üç ana bölüme ayrılır (45). Subikulum, hipokampusü dentat girusa bağlayan bir geçiş bölgesidir ve üç bileşenden oluşur: presubiculum, parasubiculum ve subiculum (45, 59). Hipokampus ise hücre yapısındaki değişiklikler ve bağlantısal farklılıklardan kaynaklı olarak 4 alana ayrılır: CA1, CA2, CA3 ve CA4 (45, 60). Bunlardan CA1 subikuluma, CA4 ise dentat girusa en yakın olan alandır (60). Bunun yanı sıra hipokampusü bilişsel ve duygusal işlevlerine göre dorsal (dHPC) ve ventral hipokampus (vHPC) olarak ikiye ayırmak mümkündür

(61). Uzamsal öğrenmede ve hafıza biçimlerinde dHPC rol oynarken anksiyete ile ilgili davranışları içeren beyin süreçlerinde vHPC önemli bir görev alır (62). Bu görev dağılımının ayırımında farklı alanlara yapılan projeksiyonların rolü vardır. Ventral hipokampus, amigdala dahil olmak üzere subkortikal yapılarla güçlü ve doğrudan projeksiyonlara sahipken dHPC neokorteksle bağlantılar kurar (63).

Anksiyete ile ilişkisi bilinen medial prefrontal korteksin (mPFC) sinir aktivitesi vHPC ile senkronize etkinlik gösterirken dHPC ile senkron bir şekilde çalışmadığı bildirilmiştir (64). Bununla birlikte BLA-vHPC arasındaki sinapsların aktivasyonunun, anksiyete ile ilgili davranışları akut ve güçlü bir şekilde arttırdığı gözlemlenmiştir. Öte yandan inhibisyonunun ise tam tersi etki gösterdiği saptanmıştır (65). Ventral hipokampusun anksiyete bozukluklarında yüksek oranda rol oynadığını kanıtlayan çalışmaların sayısı artış göstermektedir (66). vHPC, amigdala ve mPFC ile koordineli aktivite göstermekle birlikte yine bu yapılarla beraber çevredeki tehdit unsurlarının yorumlanma sürecine katkı sağlamaktadır (43). Bununla birlikte artan anksiyete seviyesiyle birlikte hipokampusun aktivitesinde orantılı olarak artış görülmektedir (66).

Tüm bunlara ek olarak hipokampusun depresyon patogenezinde önemli rol oynadığı bilinmektedir. Bozulmuş hipokampal nörojenin depresyona yol açtığı ve nörojenin iyileştirilmesinin depresyonu tedavi ettiği düşünülmektedir. Bu düşünce anksiyete bozukluklarını kapsayacak şekilde genişletilmiştir. Bu düşünceye göre ruh hali ve anksiyetenin ana düzenleyicisi olarak ventral dentat girus kabul edilmiştir (67, 68).

Prefrontal Korteks

Prefrontal korteks (PFC), limbik sistem ve diğer beyin bölgeleriyle yaptığı bağlantılar ile duyguları, düşünceleri ve eylemleri düzenler (69). Hafıza, öğrenme, stres ve duygusal davranışların kontrolünde yer alır (70). PFC, dorsal kısmında yer alan dorsolateral alan ile ventral kısmında yer alan medial ve orbitofrontal alanlar olmak üzere 3 alt bölüme ayrılır (69, 71). Dorsolateral PFC, motor ve duygusal korteks ile yoğun şekilde bağlantılar kurarak düşünceleri ve eylemleri düzenlemede görev alır

(69). Medial PFC ve orbitofrontal alanlar yapısal ve işlevsel olarak yüksek oranda birbirine bağlı bölümlerdir ve birlikte duygusal davranışların düzenlenmesine katkı sağlarlar (70, 72). Buna ilave olarak mPFC'nin, anksiyetenin modülasyonunda etkin bir rol oynadığı yapılan birçok çalışma ile gösterilmiştir. Bu rolde hipokampus ve amigdala ile karşılıklı olarak yaptığı güçlü bağlantıların etkili olduğu düşünülmektedir (64). Üstelik mPFC yaptığı güçlü bağlantılar sayesinde amigdalanın aktivesinin kontrolünde de görev alır. Bu kontrolde ise mPFC'nin amigdalaya gönderdiği baskılayıcı bir girdi oldukça önemli bir rol oynar. (71). Bununla birlikte anksiyete bozukluklarında PFC'nin aktivitesinde değişkenlik görülür ve bu durum, bozukluğun türüne göre farklılık göstermekle birlikte değişim çoğunlukla hiperaktivasyon yönünde olur (73).

Literatürde mPFC'nin bağlantılarıyla ilişkili olarak bulunan mevcut bir çalışma, BLA-mPFC arasındaki yolun aktive edilmesinin sonucunda anksiyete benzeri davranışların arttığını ve bununla birlikte sosyal etkileşimlerin azaldığını bildirmiştir. Ayrıca bu bağlantının engellenmesiyle anksiyete benzeri davranışlar azalmış ve sosyal etkileşim artmıştır (74). Öte yandan vHPC'nin subiculum ve CA1'inde yer alan nöronlar da doğrudan mPFC ile ilişki kurar. Bununla birlikte amigdalaya da eş zamanlı olarak afferentler yollar (75). Dahası vHPC'den mPFC'ye yapılan bu bağlantı, doğuştan gelen anksiyete davranışları için gereklidir ve vHPC'nin mPFC'ye direkt girdisi kaçınma davranışının uzaysal temsilleriyle ilişkilendirilmiştir (76). Ek olarak yüksek anksiyete düzeyiyle ilişkili olan bilişsel esnekliğin azalmasında (özellikle karar verme sürecinin bozulması) esas olarak PFC görevlidir (77).

Striatum

Anksiyete bozuklukları üzerine yapılan çalışmalar başlangıçta amigdala, prefrontal korteks ve hipokampüse yönelik olmuştur. Daha sonra konum ve bağlantıları göz önüne alındığında striatumun da anksiyete devresinin bir parçası olabileceği düşünülmüştür (78). Bazal gangliyonların ana girdi bileşeni olan striatum; dorsal ve ventral striatum olmak üzere iki temel alana ayrılır. Dorsal striatum, putamen ve caudat çekirdeğin dorsal bölgelerini içerir (79). Motor ve bilişsel

fonksiyonları düzenleyen premotor, motor ve parietal kortekslerle bağlantılıdır (78). Ventral striatum ise putamen ve caudat çekirdeğin ventral kısımlarıyla birlikte nucleus accumbens oluşturur (79). Limbik sistemle bağlantılıdır. Dolayısıyla otonomik ve emosyonel sistemler ile ilişkileri vardır (80). Amigdala, hipokampus ve vPFC'den projeksiyonlar alır. Bu bağlantılar aracılığı ile anksiyete ile daha fazla ilişkisi olan kısmın ventral striatum olduğu düşünülür (78). Ayrıca ventral striatumun disfonksiyonu, motivasyon bozukluğu ve kaçınma davranışları ile ilişkilidir. Bu durum da anksiyete bozukluğu ile olan ilişkisini destekler niteliktedir (48).

HPA Aksı

Hipotalamo-hipofizer-adrenal (HPA) aksı stres tepkisine aracılık eden başlıca yapılardan biridir ve anksiyete bozukluğu patofizyolojisinde de rol oynadığı düşünülmektedir (81). Canlıların yaşamını sürdürebilmesi için homeostazı sağlaması gereklidir. Homeostazı tehlikeye sokan durumlar ise stres olarak ifade edilir (82). Herhangi bir stres varlığında homeostatik bozulmayı en aza indirmek ve hayatta kalmayı desteklemek için HPA aksı, bazı nöronal devrelerle birlikte aktifleşir (83).

Bir stres faktörü ile karşılaşıldığında HPA aksı aktive olur. HPA aksının aktive olmasıyla birlikte hipotalamustan kortikotropin salgılayıcı hormon (CRH) salgılanır. CRH'nin salınımını takiben hipofizin ön kısmından adrenokortikotropin hormonu (ACTH) salınır. ACTH, sistemik dolaşıma geçer ve adrenal bezleri uyarır. Sonucunda kortizolün biyosentezi ve salınımı gerçekleşir. Kortizolün miktarı, kanda yükselmeye başlayınca CRH ve ACTH salınımı üzerinde negatif geri bildirim sağlar ve kandaki kortizol miktarının kontrolü sağlanır (82, 84, 85).

Strese maruz kalan kişilerde, anksiyete bozukluğunun bazı alt tiplerinde HPA aksının hiperaktivitesi görülür (81, 86). HPA aksının aktivasyonunun artışıyla kortizol hormonunun salınımında da artış olur (86). Bununla birlikte uzun süre strese veya kronik anksiyeteye maruz kalan kişilerde, HPA aksının duyarlılığının azalacağı ve sonucunda kortizol salınımında bir azalma görüleceği yönünde bir teori bulunmaktadır. Bu teoriyi destekleyen çalışmalar da literatürde mevcuttur (87).

Böylelikle akut anksiyete durumunda, HPA aksının hiperaktivitesiyle birlikte kortizol miktarının yükselmesi ve kronik durumda ise hipoaktiviteyle birlikte kortizol miktarının düşmesi beklenir. Bu değişimin dolaşımdaki kortizolden gelen negatif geri bildirimle karşı artan hassasiyetten kaynaklı olabileceği düşünülmektedir (88). Ek olarak anksiyolitik etkisi bilinen bazı ajanların (BDZ'ler, TCA'lar ve SSRI'lar) HPA aksını modüle ederek hareket ettiği bilinmektedir (81).

2.2.2. Anksiyete ile ilişkili Ana Nörotransmitterler

GABA

Nöronal iletimin düzenlenmesinde kilit rol oynayan GABA, merkezi sinir sisteminin temel inhibitör nörotransmitteridir (89). Glutamik asit dekarboksilaz (GAD) enzimi tarafından GABAerjik nöronlarda glutamattan sentezlenmektedir (90). GABA'nın GABA_A, GABA_B ve GABA_C olmak üzere üç ana reseptör alt tipi bulunmaktadır (91). GABA_A ve GABA_C iyonotropik reseptör olup Cl⁻ iyonu geçirgenliğini arttırarak işlev gösterirken GABA_B metabotropik reseptör olup G proteinleri aracılığı ile K⁺ ile Ca⁺² kanalları üzerinden etkinlik göstermektedir (90, 91).

Beyindeki GABA seviyelerindeki herhangi bir değişiklik, beyindeki uyarıcı ve engelleyici sinyaller arasında dengesizliğe neden olarak psikolojik bir rahatsızlığın ortaya çıkmasına zemin hazırlayabilir (89). Dahası GABAerjik fonksiyonun bozulması amigdalanın hiperaktivitesine neden olur. Bu durum ise GABA'nın anksiyete bozukluğu ile ilişkisinin bir göstergesidir (92).

GABA, fizyolojik ve psikolojik etkilerinin çoğunu, GABA_A reseptörleri aracılığıyla üretir. GABA_A reseptörleri, özellikle amigdala, hipokampus ve medial prefrontal kortikal alanlarda yoğun şekilde bulunmakla beraber merkezi sinir sisteminde yaygın bir şekilde dağılım göstermektedir (91, 93). Anksiyete bozukluklarını tedavi etmek için kullanılan benzodiazepinler, GABA_A reseptörleri üzerinden etki göstermektedir (93).

GABA, hiperpolarizasyon yoluyla nöronların uyarılabilirliğini azalttığı için anksiyetenin düzenlenmesinde merkez olarak kabul edilir (53). Anksiyete bozukluğunda GABAerjik iletim azalır. Bu sebeple GABAerjik iletimi azaltan durumlar veya farmakolojik ilaçlar anksiyojenik etkilere neden olur (49). Dolayısıyla anksiyete bozukluklarını tedavi etmek için kullanılan ilaçlar GABAerjik iletimi artırmaya yöneliktir (94).

Serotonin

Serotonin, 5-hidroksitriptamin (5-HT) ismiyle de bilinir ve triptofan esansiyel amino asidinden sentezlenir (95). Serotonin koşullu korkunun, stres tepkilerinin, ödül ve anksiyete ile ilişkili davranışların düzenlenmesinde önemli rol oynar (96). Ayrıca serotonerjik sistemin düzensizliği, anksiyete bozukluğu dahil olmak üzere çok sayıda nöropsikiyatrik hastalığın gelişmesine neden olur (95).

Anksiyete ve panik modülasyonunda rol alan serotonerjik sistemler vardır (97) Bunlar beyin sapında bulunan dorsal (DRN) ve medial raphe çekirdeklerindeki (MRN) nöronların projeksiyonlarından oluşur (94). DRN'den kaynaklanan serotonerjik lifler daha çok frontal korteks, amigdala ve striatumu innerve ederken MRN ise esas olarak dorsal hipokampus ve septumu innerve eder. Bununla birlikte birçok beyin bölgesine de aynı oranda efferentler gönderirler (97).

Serotonin, beyne yayılmış çeşitli reseptörler aracılığıyla etkisini göstermektedir ve başlıca 7 tip serotonin reseptör ailesinden söz edilir (98,99). İyonotropik bir reseptör olan 5-HT₃ reseptörü haricinde diğerleri G protein bağımlı reseptörler olup adenil siklaz ve fosfolipaz C'yi aktiveleştirerek etki göstermektedir (96). 5-HT_{1A} ve 5-HT_{2C} reseptörleri anksiyete davranışlarını düzenleyen reseptörlerdir ve anksiyete bozukluğu tedavisinde kullanılan antidepressanlar (trisiklik antidepressanlar ve SSRI'lar) bu reseptörleri hedefleyerek etki gösterir (95, 98).

Noradrenalin

Beyinde noradrenerjik nöronların çoğunluğu locus coeruleus (LC) bulunur. LC; hipokampus, amigdala, neokorteks ve talamus dahil birçok beyin bölgesinin ana noradrenalin (NA) kaynağıdır (100). Katekolamin nörotransmitteridir ve dopamin β -hidroksilaz enzimi aracılığı ile noradrenerjik nöronlarda dopaminden sentezlenir. Bazı dokularda NA daha sonra adrenaline dönüştürülür ancak merkezi sinir sistemindeki ana sempatik nörotransmitter NA'dır (94).

Noradrenalin; hafıza, öğrenme, uyku, uyarılma, stres ve anksiyete cevaplarını düzenleme süreçlerinde baskın bir şekilde rol oynar. Bununla birlikte dikkat süreçlerine doğrudan katkı sağlayarak sosyal davranışları da etkiler (101). Dolayısıyla anksiyete bozukluklarında da görülen dikkat süreçlerinin ve sosyal davranışların bozulmasında noradrenalinin payı olduğu söylenebilir. Bunlara ek olarak anksiyetenin çok sayıda fizyolojik semptomunun ortaya çıkmasında NA görev alır (102).

Beyin noradrenalin düzeylerini artıran ilaçlar veya yasaklı maddeler anksiyete seviyesini artırır (94). Ayrıca anksiyete veya korku duygusuyla ilişkili olarak LA ve amigdala gibi beyin bölgelerinde, noradrenalin düzeyinde artış görülebilir (103). Ek olarak, hipotalamusun noradrenerjik uyarımı HPA aksını aktive ederek stres tepkilerini ve anksiyeteyi ortaya çıkarır. Artan hipotalamik aktivite de LC'yi daha fazla uyarabilir (104). Bununla birlikte birçok anksiyolitik ilaç (SSRI'lar, trisiklik anti-depresanlar) LA'nın aktivasyonunu azaltır ve anksiyete düzeyini düşürür (94).

2.3. Anksiyete Bozukluklarının Farmakolojik Tedavisi

Anksiyete bozukluklarının tedavisinde kullanılan ilaçlar anksiyolitik ilaçlar olarak adlandırılır. Mevcut farmakolojik tedavide antidepresanlar, antipsikotikler, antihistaminikler, alfa ve beta-adrenerjik ilaçlar, benzodiazepinler ve diğer anksiyolitik etkili ilaçlar kullanılmaktadır (12). Bu ilaçların çoğu GABA, serotonin ve noradrenalin sistemleri üzerinden etkinlik gösterir ve yapılan araştırmaların çoğu da bu sistemlere odaklanmaktadır (42). Anksiyolitikler içerisinde en iyi etkinlik ve güvenlik kanıtına sahip olan ilaçlar antidepresanlar ve benzodiazepinlerdir (29).

Antidepresanlar arasında en sık kullanılan ve birinci basamak tedavisinde uygulanan ilaçlar seçici serotonin geri alım inhibitörleri (SSRI'lar) ve serotonin-norepinefrin geri alım inhibitörleri (SNRI'lar) içerir (105). SSRI'lar serotonin taşıma pompası tarafından presinaptik zarda serotoninin geri alımını engelleyerek etki gösterir. Böylece serotoninin sinaps aralığındaki konsantrasyonu artmış olur (106). SNRI'lar ise 5-HT ve NA geri alımını engeller. Bu da artan NA ve 5-HT konsantrasyonları ile sonuçlanır (107). Artan noradrenerjik aktivite, korku ve anksiyete devreleri aktivasyonu ile ilişkili olduğundan bazı araştırmacılar SNRI'ların anksiyete artırıcı yönde etki edeceğini düşünmektedir. Bununla birlikte bu fikri destekleyen hiçbir kanıt yoktur (104).

SSRI'lar ve SNRI'lar, anksiyete bozuklukları için standart ilaçlar olarak reçetelenmektedir ancak anksiyolitik etkisinin başlangıcı 2-4 hafta arasındadır. Hatta 6 haftaya kadar bir gecikme süresine sahiptir ve optimal yanıtı elde etmek için 12-16 hafta kadar beklemek gerekmektedir (12, 29) Dolayısıyla bu ajanlar akut anksiyolitik tedavilerde kullanılamamaktadır ve bunun yanı sıra tedavinin ilk haftalarında yan etkiler daha belirgin görülmektedir (12).

Benzodiazepinlerin (BDZ) anksiyolitik etkileri, alımdan hemen sonra başlar (105). Bu etkiyi BDZ'ler, GABA_A reseptöründeki spesifik bölgelere bağlanıp GABA nörotransmitterine olan afiniteyi artırarak yapar. Sonucunda GABA'nın merkezi sinir sistemindeki inhibitör etkisi güçlenir. BDZ'lerin bulunan tüm türevlerinin hepsi aynı mekanizma üzerinden etki gösterir (108). Genellikle iyi tolere edilen ilaçlar olmasıyla birlikte uzun süreli (1 aydan fazla olan) kullanımlarında birtakım bağımlılık riskleri taşır. Dolayısıyla bazı seçili durumlarda ve kısa süreli (2-4 hafta) kullanımları dışında birinci basamak tedavi seçeneği olarak önerilmez (53, 108). BDZ'ler, önceden tahmin edilebilen ve belirli durumlarla sınırlı kalabilen (örneğin, uçma fobisi gibi spesifik fobi; topluluk önünde konuşma veya diğer performans kaygıları gibi sosyal fobiler) anksiyeteyi tedavi etmek için en iyi seçenektir (29).

BDZ'lerin yan etkileri kişilerde nadir olarak ilacı bırakma sebebi olsa da ilacın faydalarını sınırlayabilecek etkilerdir. En yaygın görülen yan etkisi, genel bir zihinsel

ve motor yavaşlamayla karakterize olan sedasyondur (109). Uyuşukluk, yorgunluk ve uyku hali sıklıkla görülen diğer yan etkilerdendir. Daha yüksek dozlarda ise motor koordinasyon bozukluğu ve baş dönmesi ortaya çıkabilir (93). Bu yan etkiler, ekstra olarak yaşlılarda düşme ve kırık riskini arttırır. Bu yüzden yaşlılar için kullanımı sınırlandırılmalıdır. Ayrıca BDZ kullanan hastalara olası kazaları önleme açısından araba ve makine kullanmamaları veya karmaşık görevleri yapmaktan kaçınmaları tavsiye edilir (109).

Beta adrenerjik reseptör blokörleri, esas olarak kardiyovasküler hastalıklar için geliştirilmiş ajanlardır (110). Anksiyete bozukluklarında ise titreme ve kalp çarpıntısı gibi otonomik semptomlarını hafifletmek amaçlı olarak akut tedavilerde kullanılır (111). En yaygın kullanılan propranolol, kan-beyin bariyerini kolayca geçebilen ve seçici olmayan bir beta blokördür. Tüm beta-adrenerjik reseptör tiplerine adrenalin ve noradrenalin bağlanmasını bloke eder (112). Bu ilaçların; seçici olmayan reseptör etkinliği, bir dizi yan etkiye sahip olması ve anksiyete bozukluklarında kullanımına yönelik araştırma desteğinin eksik olması tercih edilebilirliğini etkilemektedir (12,110).

2.4. Davranış Testleri

Anksiyetede davranış testlerinin tarihi, Calvin Hall'un sıçanlarda duygusal davranışları analiz etmek amacıyla açık alan testini kullandığı ve bu testin kullanımına öncülük ettiği 1934 yılına kadar uzanır (113). Hala günümüzde yoğunlukla bu testler anksiyetenin nörobiyolojik mekanizmasının araştırılmasında ve anksiyolitik bileşiklerin taranmasında kullanılır (114). O zamandan beri, anksiyete durumunu gösteren davranışsal parametreleri değerlendirmek için çeşitli test modelleri geliştirilmiştir. Anksiyete testlerini, koşullu ve koşulsuz anksiyete testleri olmak üzere iki ana gruba ayırmak mümkündür (115, 116).

Koşullu anksiyete testleri, hayvanın hoşnut olmayacağı çoğunlukla da elektrik şoku gibi ağırlı uyaranlara karşı yanıtlarını ve bu yanıtların oluşması için de belli bir koşullandırma sürecini içerir (115-117). Hem etik düşünceler hem de elektrik

şoklarının etolojik olarak ilgili bir uyarıcıyı temsil edip etmeyeceği sorusu nedeniyle son yıllarda koşullu anksiyete testlerinden uzaklaşmakta ve koşulsuz anksiyete testleri tercih edilmektedir (115, 116).

Koşulsuz anksiyete testlerinde, herhangi bir öğrenme ve koşullandırma süreci olmaksızın hayvanlarda doğal korku veya endişe duygusu oluşturacak düzeneklerle anksiyete durumu taklit edilmeye çalışılır (113). Bu testler, hayvanların temel ve anksiyete ile ilişkili davranışsal boyutları göz önüne alınarak oluşturulur ve genellikle yeni bir ortam veya uyarana karşı karşıya kalma durumunu içerir (115). Hayvanların yeni bir ortamı keşfetme ile bu ortamdaki potansiyel tehlikelerden kaçınma dürtüleri arasında yaşanan çatışma duygusuyla temellenir (113). Açık alan, yükseltilmiş artı labirent ve aydınlık-karanlık kutusu testleri hem en sık kullanılan hem de güncel olan koşulsuz anksiyete testleridir (114).

2.4.1. Açık Alan Testi

Açık alan testi, hayvanın platformdan kaçışını önlemek için duvarlarla çevrili, üst kısmı açık ve genellikle kare şeklinde tercih edilen bir alanda, hayvanların anksiyete davranışlarını ve lokomotor aktivitelerini ölçmek amacıyla yapılan bir testtir (118). Bu testin birçok farklı şekilde kullanımı mevcuttur. Farklılıklar uygulama alanının boyutları, şekilleri (dikdörtgen, daire), aydınlatma koşulları (loş ışıktan parlak ışığa) veya çevrenin zenginleştirilmesi (obje, yiyecek sunarak) ile oluşturulabilir (115). Bununla birlikte testin değerlendirilme aşamasında önemli bir yer kapladığı için tüm kullanımları, merkez ve periferik alan olmak üzere iki ana bölgeye ayrılır (116). Bu iki bölüm arasındaki geçiş kısımlarının netliği ve hayvanların davranışlarını daha doğru değerlendirebilmek açısından anksiyete ile ilgili davranışları ölçmek için yapılan testlerde standartlar içerisinde yer alan en büyük deney düzeneklerinin kullanılması tavsiye edilir (113).

Açık alan testi, hayvanların alışık olduğu ortamdan alınıp yeni ve açık bir alana (merkez bölgeye) koyulmasını takiben bu ortamda sergilediği davranışların incelenmesini içerir (115). Tanıdık olmayan bu yeni ortam, tehlikenin yanı sıra

kullanabileceği kaynakları da içerebilir. Bununla birlikte hayvanlar kaynakları keşfetmeden önce çevrenin tehlike potansiyelini dikkatlice değerlendirme eğilimindedir (119). Açık alan testinde hayvanlar içgüdüsel olarak merkez alanı korkutucu bulup kaçınma eylemi sergilerken duvarlara yakın bölgeleri keşfetmeye yönelik davranışlar gösterir (115).

2.4.2. Yükseltilmiş Artı Labirent Testi

Yükseltilmiş artı labirent testi, Montgomery'nin yükseltilmiş Y şeklinde bir labirentte, sıçanların açık kolları keşfetmek için kapalı bir kolda daha az zaman harcadığı gözlemine dayanarak geliştirilmiş bir testtir (120). Bunun yanı sıra çeşitli türevleri de (yükseltilmiş T-labirent, sıfır labirent gibi) geliştirilmiştir (121). Yükseltilmiş artı labirent testi, yerden belirli bir yükseklikte bulunan, artı şeklinde görünen ve toplamda dört koldan oluşan bir test düzeneğidir. Duvarları olan koruyucu iki kapalı kolu ve duvarları olmayan iki açık kolu bulunur. Bu kollar dik bir şekilde kesişerek artı şeklini oluşturur (122). Labirentin yükseklikte bulunan ve koruyucu duvarları olmayan açık kolları doğal bir stres kaynağı görevi görürken kapalı kollar hayvana daha güvenli bir ortam sağlar (123). Bu test ile kemirgenlerin yeni bir çevreyi keşfetme eğilimi ile açık ve yüksek yerlerden kaçınmaya yönelik meyilleri arasındaki çatışmadan kaynaklı olarak keşfetme ve kaçış davranışları değerlendirilebilir (116). Davranışsal ölçümlerin yanı sıra uzamsal-zamansal ölçümler de değerlendirilir. Uzamsal-zamansal ölçümler; hayvanların açık kola giriş sayısı, açık kolda geçirilen süre ve bu parametrelerinin yüzdesi olarak ifade edilmektedir (124).

Yükseltilmiş artı labirent testi hem anksiyolitiklere hem de anksiyojeniklere duyarlılığından dolayı standart bir şekilde referans olarak seçilir (114, 121). Ayrıca günümüzde anksiyolitik ilaçların taranması konusunda ilk tercih edilen testtir (125).

2.4.3. Aydınlik-Karanlık Kutusu Testi

Crawley ve Goodwin tarafından ilk kez 1980 yılında tanımlanan aydınlık-karanlık kutu testi, aydınlık ve karanlık iki bölmeden oluşan bir koşulsuz anksiyete testidir. Yine burada da kemirgenlerin yeni bir ortamı keşfetme motivasyonu ile

parlak ışıklı bir alanın caydırıcı etkisi sonucu ortaya çıkan kaçınma dürtüsü arasındaki çatışmadan yararlanılarak hayvanın anksiyete seviyesi ölçülür (126). Test, karanlık bölmeyi kemirgenin arka kısmına alacak şekilde hayvanı aydınlık alanın merkez kısmına yerleştirilerek başlatılır ve 5 dakika süre ile kaydedilir (121). Aydınlık ve karanlık bölmelerde geçirilen toplam süre ve iki bölme arasında yapılan geçiş sayısı bu test için anksiyetenin ana göstergeleri olarak kabul edilip değerlendirilir (126). Karanlık bölgenin tercih edilmesi yüksek anksiyete ile ilişkiliyken anksiyolitik ilaçlar aydınlık bölmede geçirilen süreyi artırır (117).

Bilindiği üzere davranış testlerinin en büyük dezavantajlarından biri testlerin tekrarlanamamasıdır. Bunun yanı sıra birçok hayvan anksiyete testi, vücut aktivitesine ve hareketine bağlı davranışlara dayanır. Bu duygusal olmayan faktörler testin saf bir şekilde duygu durumunun ölçülmesine engel olur. Dolayısıyla lokomotor aktivitenin ayrıca test edilmesi sonuçların doğru değerlendirmesi açısından önemlidir. Bunun dışında kemirgenlerin duygusal davranışlarını daha net yorumlayabilmek için birden fazla davranış testinin yapılması tavsiye edilir (125).

2.5. Kakao

Kakao, *Theobroma cacao* L. ağacının tohumlarından elde edilen bitkisel kaynaklı bir besin maddesidir ve insan sağlığını etkileyebilecek biyoaktif bileşenler içerir (127). Kökeni yaklaşık 3000 yıl öncesine dayanan kakao, ilk kez Mayalar tarafından yetiştirilmiştir (128, 129). Kakaonun ismi "tanrıların yiyeceği" anlamına gelen Theos ve Bromos kelimelerinden türetilmiştir (130).

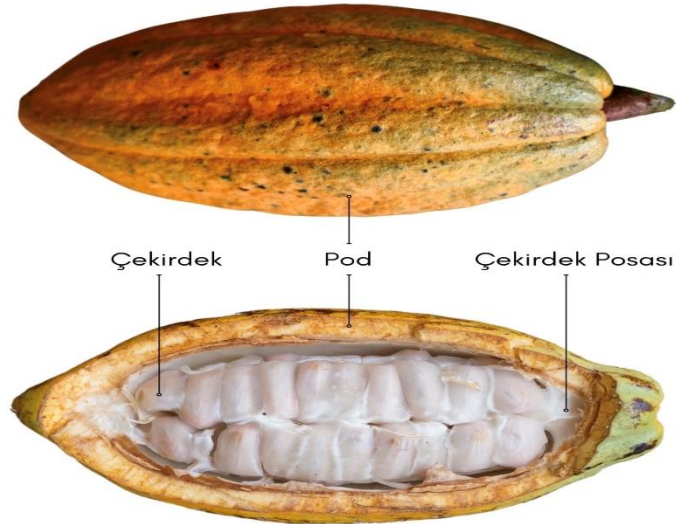
Kakao, yüzlerce yıl önce genellikle soylu kişiler tarafından tüketilebilen ve hatta bir dönem para birimi olarak kullanılan değerli bir maddeydi (128). 21. yüzyılda ise birçok insanın kolayca ulaşabileceği bir konumda yer almaktadır ve günlük hayatta kakao ve kakao türevli ürünler sıklıkla tüketilmektedir.

Bilindiği gibi çikolatanın ham maddesi (en az 350 g/kg kuru kakao maddesi içerir) kakaodur ve kakao çoğunlukla çikolata şeklinde tüketilmektedir (15, 17). Dünyada ortalama çikolata tüketimi, yıllık kişi başına 0,9 kg olarak tahmin

edilmektedir (131). Bununla birlikte okolata tüketime en fazla Avrupa ülkelerinde görülmektedir ve okolatanın en fazla tüketildiği ülkelerden biri olan İsviçre'de bu oran, yıllık kişi başına 8,8 kilogramken okolata tüketime alt seviyelerde olduğu bilinen in'de yıllık kişi başına okolata tüketime 100 gramdır (15). Türkiye'de ise bu oran 2017 yılı verilerine göre, kişi başına yıllık 3,1 kg olarak tespit edilmiştir (132). Ek olarak dünyada 2020-2021 yıllarında yaklaşık 5 milyon ton kakao üretilmiştir (16). Tüm bu verilere dayanarak dünya çapında ciddi miktarda kakao üretildiği ve tüketildiği sonucu ortaya çıkmaktadır.

2.5.1. Kakaonun Elde Edilme Süreci

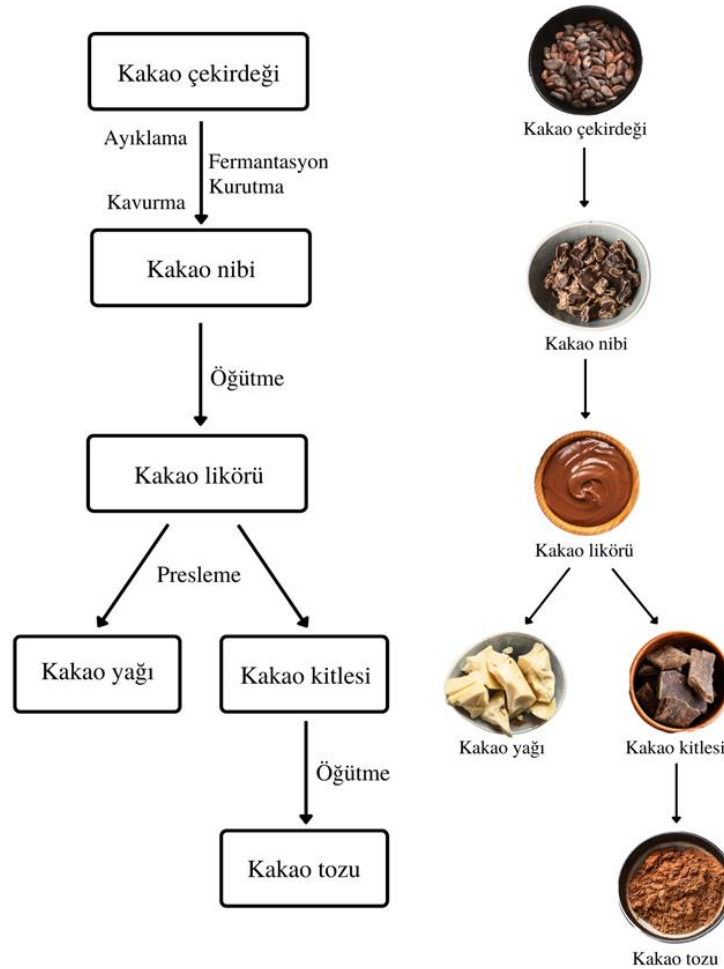
Kakao elde etmek amacıyla kakao ağaçlarından toplanan kakao meyvesinin (pod hali) belirli işlemlerden geçmesi gereklidir ve bu işlemlerden sonra farklı türlerde kakao ürünleri elde edilebilir (133). Meyveler toplandıktan sonra kakao çekirdekleri pod denilen dış kabuğundan uzaklaştırılmalıdır (127, 128). Bir pod içerisinde yaklaşık 20 ile 40 arasında kakao çekirdeği bulunur ve pod haricinde kakao çekirdekleri her biri ayrı olarak bir dış kabukla (posa) sarılıdır (128) (şekil 2.2).



şekil 2.2. Kakao meyvesi ve bölümleri

Çekirdeklerin elde edilmesinden sonra kakaonun lezzet kalitesini önemli ölçüde etkileyen fermentasyon ve kurutma aşamaları gelir. Bu aşamalarla birlikte taze

kakao çekirdeklerinde acılığa ve burukluğa neden olan polifenollerin miktarı (%12-20 arasında değişim) azalır ve kakao çekirdeklerinin lezzeti dolaylı olarak artar (134, 135). Kurutma adımında ekstra olarak kakao çekirdekleri dış kabuğundan ayrılmaya başlar (128). Bunun neticesinde çekirdekler kırılabilir veya parçalanabilir ve kakaonun nib olarak adlandırılan ilk ana ürünü elde edilmiş olur (136). Daha sonra istenmeyen uçucu maddelerin (asetik asit) uzaklaştırılmasına ve nem oranının düşürülmesine oldukça büyük katkı sağlayan kavrulma süreci başlatılır ve nem oranı %1-2 seviyesine ulaşana kadar çekirdekler kavrulur (17). Bu aşamayı takiben çekirdek kırıntıları (nib) öğütülerek ikincil ürün olan kakao likörü oluşur (127). Kakao likörü preslenirse kakao yağı ve kakao kitlesi olmak üzere iki farklı ürün elde edilir. Ek olarak kakao tozu elde etmek amacıyla kakao kitlesi tekrar öğütülebilir (136). Tüm bu süreçler neticesinde elde edilen bütün ürünler doğal kakao ürünleridir (133) (Şekil 2.3).



Şekil 2.3. Kakaonun işlenmesi ve doğal kakao ürünleri

Doğal kakao ürünleri elde edildikten sonra isteğe bağlı kakaonun nib, likör veya toz hallerinden herhangi birine uygulanabilen ve alkalizasyon olarak adlandırılan bir adım daha vardır (137, 138). Bu adım, kakaonun yüksek sıcaklık ve basınç altında bir alkali madde ile karıştırılarak işleme sürecini kapsar (133). Alkalizasyon işleminde kakaonun asitliğinin nötralize edilmesiyle birlikte buruk-acı aromanın azaltılması, lezzetin iyileştirilmesi ve rengin değiştirilmesi amaçlanır (138). Alkalize edildikten sonra elde edilen ürünler, artık doğal kakao ürünleri olarak kabul edilmez (133).

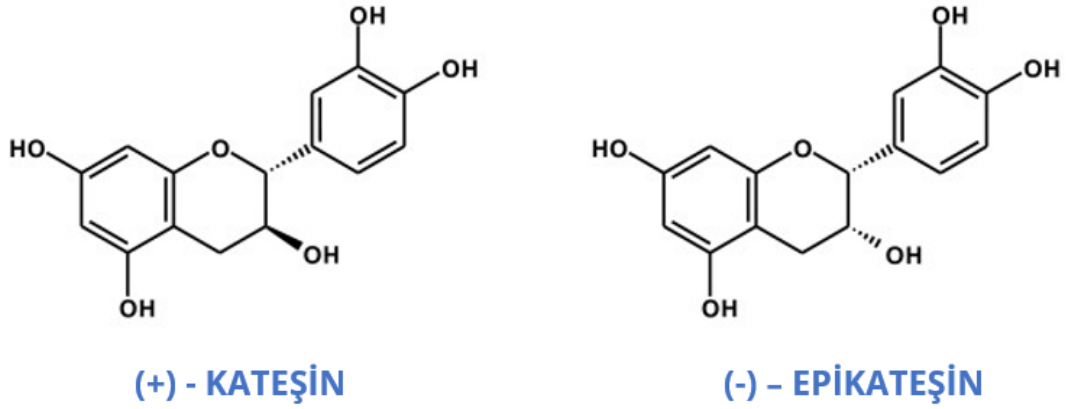
Alkalizasyon sırasında meydana gelen değişimler esas olarak biyoaktif bileşiklerin (polifenoller ve metilksantinler) bozunmasına bağlı olarak gerçekleşir ve bu bileşiklerin miktarlarında belirli bir ölçüde azalma görülür (139, 140). Azalma miktarı ise alkalileştirme derecesine göre değişkenlik gösterir (141). Polifenoller ve metilksantinlerin yanı sıra vitaminler, amino asitler ve şekerlerin de miktarlarında azalmalar görülür (140).

2.5.2. Kakaonun Bileşenleri

Kakao, lif (%26-40), proteinler (%15-20), karbonhidratlar (yaklaşık %15) ve lipidler (%10-12) açısından zengin bir içeriğe sahiptir. Ayrıca kakao polifenoller (flavonoidler) ve metilksantinler gibi çeşitli biyoaktif bileşiklerin önemli bir kaynağı olarak görülür (142, 143).

Polifenollerin insan sağlığına yararlı olan bilişsel ve fizyolojik etkilerinin antioksidan özelliğinden kaynaklı olduğu kabul edilir (144, 145). Kakaoda bulunan polifenoller; proantosiyanidinler (yaklaşık %58), flavan-3-oller (flavanoller) (yaklaşık %38) ve antosiyanidinler (yaklaşık %4) olmak üzere üç gruba ayırmak mümkündür (146). Bu grupların içerisinde yer alan bazı alt üyeleri kakao kalitesinde ve biyoaktivitesinde özellikle belirleyici rol oynar: Kateşinler, epikateşinler, prosiyanidinler (147). Prosiyanidinler, çoğunlukla kateşin bazlıdır ve kakao ürünlerinde antioksidan aktivite ile esas olarak ilişkili kısımdır (148, 149). Kakao çekirdeklerinde (-)-epikateşin, ana monomerik flavan-3-ol olarak bilinir ve kakao çekirdekleri daha az miktarlarda (+)-kateşin, (+)-gallokateşin ve (-)-epigallokateşin

içerir (144, 150). Monomerik kateşinler, on beş karbonlu bir iskelete sahiptir ve iki benzen halkasıyla birlikte bir heterosiklik piran halkasından oluşur (13) (Şekil 2.4).



Şekil 2.4. Monomerik kateşinlerin kimyasal yapısının gösterimi

Ham çekirdekte bulunan polifenollerin miktarı ile son üründe bulunan polifenol miktarı eşit değildir. İşlenme sürecine ve son ürünün türüne bağlı olarak bu miktar belli bir ölçüde azalır (151). Örneğin; 100 g alkalize olmayan şekerless kakao tozu 250 mg'a kadar flavan-3-oller içerebilirken 100 g bitter çikolata yaklaşık 100 mg flavan-3-oller içerir (152).

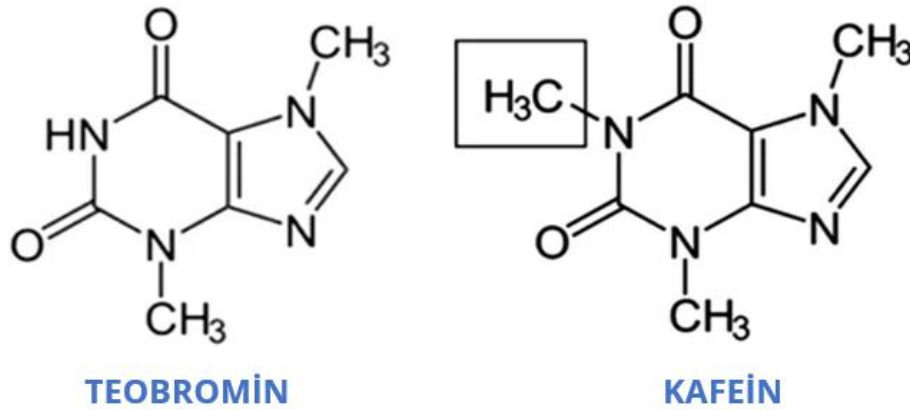
Kakao tüketiminden sonra (-)-epikateşin ve (+)-kateşin'in emilimi hızla gerçekleşir. Alımdan 30 dakika sonra plazmada saptanabilir ve ortalama 2 saatte maksimuma ulaşır (153). Bununla birlikte kateşinler ve epikateşinler kan-beyin bariyerini geçen kakao monomerik bileşenlerindedir (145). Serebral kan akışını artırır. Kan akışının artışı hipokampal nörojeneze ve nöronların fonksiyonel gelişimine de katkı sağlayabilir. Bu etkinin kakao tüketimden 3 saat sonra gözlemlendiğine dair çalışma mevcuttur (154). Dolayısıyla kakao doğrudan beyin fonksiyonlarını etkileyebilir (155). Ayrıca bazı polifenollerin, GABA_A reseptörlerinde bulunan benzodiazepin bağlanma bölgeleri için ligand olabileceği yönünde çıkarımlar mevcuttur (156, 157).

Kakaonun ana flavanol monomeri olan (-)-epikateşin, hipokampal anjiyogenezi artırır ve hipokampal beyin kökenli nörotrofik faktör (BDNF) düzeylerini yükseltir. Bu etkiler aracılığı ile (-)-epikateşinin, anksiyolitik aktivite üzerinde rol

oynayabileceği varsayılabilir (155). Ek olarak polifenoller, kortizol seviyelerini azaltarak HPA aksını etkileyebilir. Bunun neticesinde, bireyin anksiyete düzeyinde bir azalış görülebilir (158).

Kateşin, epikateşin ve epigallokateşinin uygulandığı çalışmalarda, hayvanlarda anksiyete benzeri davranışları önemli ölçüde azalttığı ve flavanollerin anksiyolitik etkiye neden olduğu gözlenmiştir (155, 156, 159). Polifenol bakımından zengin bitter çikolatanın, insan deneklere uygulandığı bir çalışma ise tükürük kortizol seviyelerinin düşmesiyle sonuçlanmıştır (158).

Kakaoda bulunan bir diğer biyoaktif bileşen olan metilksantinler alkaloid yapıdadır ve esas olarak teobromin (%3,7) ve kafeinden (%0,2) oluşur (144). Teobromin (3,7-dimetilksantin), kafeinin (1,3,7-trimetilksantin) bir metabolitidir (160). Teobromin, kafeinden yalnızca, bir metil grubunun eksikliği ile farklılık gösterir. Eksik metil grubu, teobrominin kan-beyin bariyerinden daha yavaş geçmesine neden olur (161) (Şekil 2.5).



Şekil 2.5. Metilksantinlerin kimyasal yapısının gösterimi

Kafein, oral tüketimi takiben hızlı bir şekilde emilir ve maksimum plazma konsantrasyonlarına alımdan 30 dakika sonra ulaşır. Yarılanma ömrü yaklaşık olarak 2,5-5 saat aralığında gerçekleşir (162). Kafeinin emilimi şeker varlığında yavaşlar fakat yine de tam bir şekilde emilir (163). Teobromin, kafeinden daha yavaş emilir ve 2,5 saat sonra maksimum plazma konsantrasyonlarına ulaşır ancak tam süre ortamına

göre değişir (162). Örneğin; ikolata ile alındığında maksimum plazma süresine ulaşması hızlanır (163).

Metilksantinlerin; fosfodiesteraz inhibitörü gibi davrandığı, adenozin reseptörlerini bloke ettiği ve GABA_A reseptörlerini etkilediğı bilinir (164). Bu mekanizmalarla ilişkili olarak merkezi sinir sistemi üzerinde etki sağlar ve bireyin ruh halini (olumlu yönde) değiştirebilir (165).

Kafeinin ekstra metil grubu, adenozin reseptörleri için teobrominden 2-3 kat daha güçlü afiniteye sahip olmasını sağlar. Bu durum, kafeinin merkezi sinir sistemi üzerindeki etkisini daha önemli kılmasını sağlar (161, 166). Ancak teobrominin kafeine göre daha uzun bir yarı ömre sahip olduğu unutulmamalıdır (161).

Kafeinin tüketim miktarı ve süresine bağlı olarak kişilerin üzerindeki psikolojik etkileri değişkenlik gösterebilir. Yüksek dozda ve kronik kafein tüketimi, anksiyeteye neden olurken düşük dozlarda ve akut bir şekilde kullanıldığında anksiyete seviyesini düşürdüğü gözlemlenmiştir (167-169). Kakaoda kafein oranı düşük seviyelerde bulunduğu için beklenen olası anksiyolitik etkiyi kafeinin sağlayabileceğı düşünülebilir.

Kakaonun 1000 mg/kg dozda intraperitoneal uygulandığı bir çalışma, sıçanlarda anksiyete benzeri davranışların 30 dakika sonrasında azaldığını bildirmiştir (170). Ancak kakaonun oral yolla tek doz verilip akut anksiyolitik etkisini araştıran bir çalışmaya literatürde rastlanmamıştır.

2.6. Sükroz

Sakkaroz veya çay şekeri olarak da bilinen sükroz, bir glikoz ve bir fruktoz molekülünün glikozit bağıyla birbirine bağlanması sonucunda oluşan disakkarittir. Parlak, beyaz ve kristal yapıda olup C₁₂H₂₂O₁₁ kimyasal formülüyle gösterilir (171). Sükroz, birçok yiyecek ve içeceğin ortak bir bileşenidir ve dünyanın büyük çoğunluğunda birincil tatlandırıcı olarak kullanılır (18, 172). Tüketimi son yıllarda belirgin olarak artış göstermiştir (172).

Sükroz, HPA aksı aktivitesini düşürür ve stresin neden olabileceği psikolojik etkileri doğrudan azaltarak bireyin ruh halinin iyileşmesine katkı sağlayabilir (173, 174). Bu durumu destekleyen bir çalışmada, akut strese maruz kalan sıçanlara, 14 gün boyunca %30 sükroz içeren solüsyon verilmiştir. Çalışmanın sonucunda hem ACTH hem de kortikosteron salgısının önemli ölçüde azaldığı görülmüştür (175). Olumsuz duyguları yatıştırmak için insanların şekerli gıdalara yönelmesinin sebebinin kortizol miktarının düşmesi ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir (174).

Şekerin psikolojik süreçlere etkileri net ve anlaşılır değildir (172). Çalışmaların sonuçları da birbirinden farklılık göstermektedir. Bazı çalışmalar, hayvanlardaki anksiyete davranışlarında artış veya azalışla sonuçlanırken bazı çalışmalar ise şekerin anksiyete davranışları üzerinde herhangi bir değişiklik oluşturmadığı yönünde bir sonuç ortaya koymuştur. Bununla birlikte anksiyete davranışlarını arttırdığına yönelik çok az sayıda çalışma bulunmaktadır (176).

Sükroz verilerek anksiyete benzeri davranışlarda değişim gözlemlenen bir çalışmada, sıçanlara 14 gün boyunca günde 2 kez, 4ml %30 sükroz içeren çözelti verilmiştir. Protokol sonucunda anksiyete benzeri davranışlarda azalma gözlenmiştir (177). Bir başka çalışmada ise kronik strese (21 gün) maruz kalan farelere, sükroz çözeltisi verilmiştir ve bu süre boyunca hayvanlar %15'e kadar artan sükroz çözeltisi ile tedavi edilmiştir. Sükroz grubunda, anksiyolitik etki görülmüştür (173). Yapılan bir diğer çalışmada, sıçanlara 28 gün boyunca günde 2 saat, %10'luk sükroz çözeltisi verilmiştir. Diğer çalışmaların aksine bu çalışmada, sükroz grubunda yer alan hayvanların anksiyete benzeri davranışlarında artış izlenmiştir (178).

%10 sükroz ve %10 glikoz çözeltilerinin 56 gün boyunca sıçanlara uygulandığı bir çalışmada, anksiyete ile ilgili davranışlar değerlendirildiğinde gruplar arasında bir farklılık ortaya çıkmamıştır (18). Yine bir diğer çalışmada, %7,9 sükroz içeren diyetle 12 ay boyunca sıçanlar beslenmiştir ve sükroz grubunda anksiyete ile ilişkili davranışlarda herhangi bir fark gözlenmemiştir (179).

Yapılan bu çalışmalarda; şekerin verilış şekli, süresi, sıklığı, tüketilen şeker miktarı (dozu) ya da hayvanın türü, barınma veya yaşam koşulları gibi değişiklikler deneylerin sonuçlarını etkilemiş olabilir. Dolayısıyla hayvanların anksiyete davranışları çalışmalar arasında değişkenlik gösterebilir (176).

Literatürde yer alan tüm bu bilgiler doğrultusunda bu çalışmada kakaonun ve sükrozla birlikte kakaonun anksiyete ile ilişkili olan davranış ve mekanizmalarının incelenmesi amaçlandı. Bunun için en sık kullanılan davranış testleriyle birlikte anksiyete çalışmalarında en çok hipotez oluşturulan nörotransmitterlerin hipokampüs dokusundaki miktarları araştırıldı. Bunların yanı sıra serum kortizol miktarları incelendi.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Deney Hayvanları

Bu çalışmada kullanılan deney hayvanları, Başkent Üniversitesi Deney Hayvanları Üretim ve Araştırma Merkezi'nden temin edildi. Deneyler; 190-230 gram, 8 haftalık, erkek, Wistar albino cinsi, 74 adet sıçan üzerinde gerçekleştirildi. Hayvanlar, temin edildikten sonra ortama adaptasyon sağlamaları için 7 gün süreyle Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı Hayvan Laboratuvarı'nda bekletildi. Bu süreçte sıçanlar 12 saat aydınlık / 12 saat karanlık döngüsünde, $22 \pm 2^\circ\text{C}$ sıcaklık, %40-45 nem oranı ve uygun havalandırma koşullarına sahip olan hayvan laboratuvarında tutuldu ve standart sıçan kafeslerinde barındırıldı. Beslenme ve su ihtiyaçları için herhangi bir kısıtlanma olmaksızın standart sıçan yemi ve normal musluk suyu kullanıldı. Ayrıca sakrifiye edilene kadar her gün hayvanların genel sağlık durumları kontrol edildi.

Deneylerin yapılması için Hacettepe Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan gerekli izinler alındı. Bu izin, 28.09.2021 tarihinde 2021/07-02 karar numarasıyla onaylandı (Ek-1).

3.2. Deney Grupları ve Deney Protokolü

Bu çalışma, süre tayini (ön deney) ve ana deney olmak üzere iki aşamalı olarak planlandı. İlk aşamada, anksiyete ile ilişkili davranışların azalmasına yönelik etkinin görülme süresini belirlemek amacıyla 10 adet Wistar Albino cinsi erkek sıçan kullanıldı. Kakaoda bulunan ana biyoaktif bileşenlerin (polifenoller ve metilksantinler) farmokinetik etkileri dikkate alınarak gruplar oluşturuldu. Sıçanlar kontrol (n=3), 60 dk (n=3) ve 90 dk (n=4) olmak üzere 3 gruba ayrıldı. 60 ve 90 dk grubunda yer alan sıçanlara 1000 mg/kg kakao oral gavaj yoluyla tek doz olarak verildi. Kontrol grubuna ise distile su oral gavaj yoluyla tek doz olarak verildi. Bu aşamada sadece anksiyete ile ilişkili davranışları değerlendiren davranış deneyleri yapıldı. Kontrol ve 60 dk gruplarına oral gavaj uygulamasından 60 dk sonra sırasıyla açık alan testi ve

yükseltilmiş artı labirent testi yapılırken 90 dk grubuna bu davranış deneyleri oral gavaj uygulamasından 90 dk sonra yapıldı.

Süre tayini çalışmasının sonuçları ve kakaonun emilim hızı göz önüne alınarak ana deneyde oral gavaj uygulamasını takiben 90 dk sonra davranış deneylerinin yapılmasına karar verildi.

Ana deney için kakaonun anksiyolitik etkisini araştırmak amacıyla iki farklı dozda ve sükrozla birlikte alımına yönelik bir deney protokolü hazırlandı. Toplam 64 adet Wistar albino cinsi erkek sıçan kullanıldı. Bu sıçanlar temin edildikten sonra vücut ağırlıkları tartıldı ve ağırlıklarına göre gruplar homojen bir şekilde dağıtıldı. 8 grup oluşturuldu. Bu gruplar,

- Distile su verilen kontrol grubu (K grubu, n=8)
- 1 mg/kg diazepam verilen diazepam grubu (D grubu, n=8)
- 500 mg/kg kakao verilen kakao grubu (K500 grubu, n=8)
- 1000 mg/kg kakao verilen kakao grubu (K1000 grubu, n=8)
- %10 sükroz çözeltisi verilen sükroz grubu (S grubu, n=8)
- 500 mg/kg kakao + %10 sükroz çözeltisi verilen kakao + sükroz grubu (K500+S grubu, n=8)
- 1000 mg/kg kakao + %10 sükroz çözeltisi verilen kakao + sükroz grubu (K1000+S grubu, n=8)
- Tween80 verilen tween grubu (T grubu, n=8)

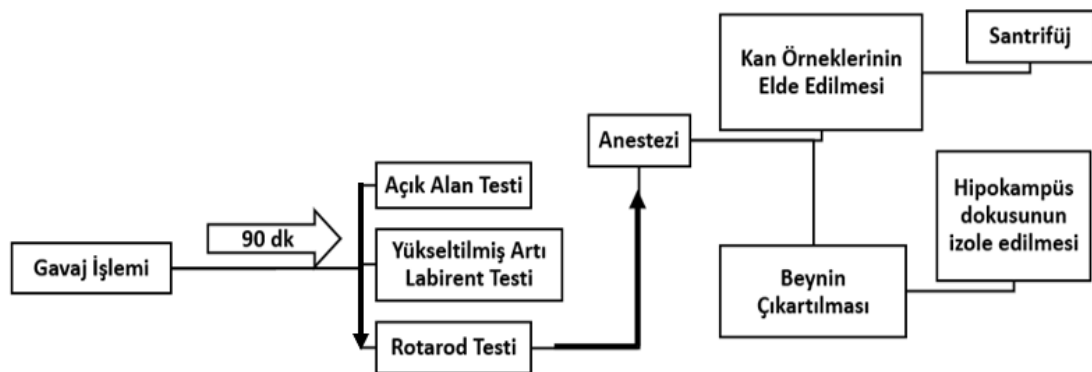
olarak belirlendi (Tablo 3.1).

Kakaonun fiziksel özelliklerinden dolayı 0,48g/kg'dan daha yüksek dozları tek doz oral gavaj ile uygulanamamaktadır (180). Bu yüzden kullanılan kakao tozunun distile su ve birçok gıda ve ilaçta çözücü olarak görev alan tween80 ile birlikte çözülmesi sağlandı. Ayrıca kakao haricinde diazepam grubunda da çözücü olarak tween80 içeren distile su kullanıldı (Tablo 3.1).

Tablo 3.1. Ana deney grupları

Deney Grupları	Ajan	Hayvan Sayısı	Doz	Hacim
K500 grubu	Kakao	8	500mg/kg	10ml/kg
K1000 grubu	Kakao	8	1000mg/kg	10ml/kg
S grubu	Sükroz	8	%10	10ml/kg
K500 + S grubu	Kakao + Sükroz	8	500mg/kg + %10	10ml/kg
K1000 + S grubu	Kakao + Sükroz	8	1000 mg/kg + %10	10ml/kg
D grubu	Diazepam	8	1mg/kg	10ml/kg
K grubu	Distile su	8		10ml/kg
T grubu	Tween 80	8	5 µl	10ml/kg

Oral gavaj uygulamasının hayvanlarda oluşturabileceği stres yanıtının gruplar arasında herhangi bir fark yaratmaması amacıyla tüm gruplara uygulanan ajanlar oral gavaj yoluyla verildi. Diazepam grubu haricinde diğer gruplara oral gavaj uygulamasından 90 dk sonra sırasıyla açık alan testi, yükseltilmiş artı labirent testi ve rotarod testi yapıldı. Diazepamın alımından itibaren 60 dk sonra etki göstermesinden dolayı sadece diazepam grubunda yer alan hayvanlara 60 dk sonra davranış deneyleri yapıldı (181). Davranış testleri sonlanan hayvanlar, kan ve beyin dokularının elde edilmesi için anestezi altına alındı (Şekil 3.1).

**Şekil 3.1.** Deney protokolü

3.3. Gavaj Uygulaması

Kakao, ticari bir firmadan elde edildi. Alkalizasyon işleminden geçirilmemiş ve %10-12 kakao yağı içeren doğal kakao tozu kullanıldı. Şeker olarak sükröz (Sigma-Aldrich S-8501) tercih edilirken benzodiazepin olarak diazepam (Diazem 5 mg kapsül, Deva Holding AŞ) kullanıldı.

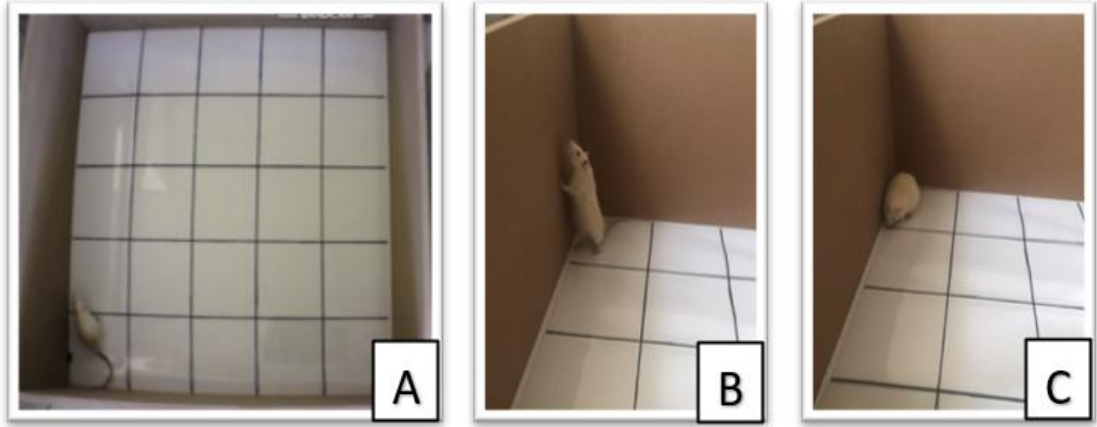
Oral gavaj uygulaması, metal eğimli gavaj tüpü (16 numara) kullanımıyla 9.30-10.30 saatleri arasında yapıldı. Hayvanlar işlemden önce tartıldı ve ağırlıkları kaydedildi. Uygulanan ajanların dozu hayvanların ağırlıklarına göre ayarlandı. 6 dakikalık aralıklarla aynı gruptaki hayvanlara gavaj işlemi yapıldı. Bu sayede tüm hayvanların davranış deneylerine başlamadan önce bekleme süresi aynı olacak şekilde ayarlanmış oldu.

3.4. Davranış Deneyleri

Davranış deneyleri 11.00-12.15 saatleri arasında yapıldı.

3.4.1. Açık Alan Testinin Uygulanması

Açık alan testi için 50 cm yüksekliğinde, ahşap duvarlarla çevrili, beyaz zeminli, kare şeklinde ve 1m²'lik (100 cm x 100 cm) alana sahip olan test düzeneği kullanıldı. Zemin 25 eş kareye bölündü ve bu karelerin her bir kenarı 20 cm olacak şekilde ayarlandı. Dış kısımda yer alan 16 kare "kenar bölge" olarak adlandırılırken iç kısımda bulunan 9 kare ise "merkez bölge" olarak kabul edildi (Şekil 3.2). Deneyler, yeterli mesafede bulunan ve düzeneğin üst kısmında yer alan bir kamera ile kaydedildi. Deney, sıçanlar düzeneğin merkezine nazik bir şekilde yerleştirildikten sonra başlatıldı. 5 dakikalık süre boyunca sıçanların serbest bir şekilde zaman geçirmeleri sağlanıp davranışları kayıt altına alındı. Deney boyunca ortamın sessiz olması sağlandı. Deneyi sonlanan hayvan, tek kişilik taşıma kafesine alındı ve bir sonraki deney düzeneğine geçildi. Her deneyin sonunda düzenek sıradaki sıçan için %70'lik etanol ile temizlendi ve kağıt havlu ile kurutuldu.



Şekil 3.2. Açık alan testinde hayvanların gözlenmesi: A) Kenarda geçirilen zaman B) Şahlanma davranışı C) Tımarlanma davranışı.

Kaydedilen videolar aracılığı ile merkez bölgeye giriş sayısı, merkez alanda geçen süre, kareler arasında çizgi geçme sayısı, toplam şahlanma (iki ayağı üzerinde kalkma) davranışı, tımarlanma (tüylerini temizlemek üzere yalanma, kaşınma) sayısı ve süresi manuel bir şekilde değerlendirildi (Şekil 3.2).

3.4.2. Yükseltilmiş Artı Labirent Testinin Uygulanması

Yükseltilmiş artı labirent testi için 50 cm uzunluğunda ve 10 cm genişliğinde yere paralel dört koldan oluşan, yerden 70 cm yükseklikte bulunan ve siyah pleksiglas malzemeden yapılan deney düzeneği kullanıldı (182, 183). Düzeneğin iki kolu duvarsız açık kollardan oluşurken diğer iki kolu 40 cm yüksekliğinde duvarlarla çevrili kapalı kollardan oluşmaktadır (Şekil 3.3). Düzeneğin açık kollarında ekstra olarak korkuluk bulunmamaktadır.

Açık alan testini tamamlayan sıçan, tek kişilik bir taşıma kafesi kullanılarak yükseltilmiş artı labirent testinin yapılacağı odaya getirildi. Hayvanlar açık kola bakacak şekilde düzeneğin merkez noktasına nazik bir şekilde yerleştirildikten sonra deney başlatıldı. 5 dakikalık süre boyunca düzeneğin üst kısmında yer alan bir kamera yardımı ile hayvanların davranışları kaydedildi. Deney boyunca ortamın sessiz olması sağlandı.

Deney esnasında açık kollardan düşen bir hayvan olduğu zaman deneyi yapan kişi hayvanı tekrar labirentin açık koluna yerleştirerek 5 dakikalık deneyin tamamlanmasını sağladı. Bununla birlikte düşen hayvanların verileri analiz dışı bırakıldı (182). Her deneyin sonunda düzenek bir sonraki sıçan için %70'lik etanol ile temizlendi ve kağıt havlu ile kurutuldu. Deneyi sonlanan hayvan, tek kişilik taşıma kafesine alındı ve rotarod testinin yapılacağı odaya aktarıldı.



Şekil 3.3. Yükseltilmiş artı labirent testi

Bu test için açık ve kapalı kola giriş sayısı, açık kola giriş yüzdesi, açık ve kapalı kolda geçen süre ve açık kolda geçen sürenin yüzdesi manuel bir şekilde değerlendirildi.

- Açık kola giriş yüzdesi (%), Formül 3.1. kullanılarak hesaplandı (184).

$$\frac{\text{Açık kola giriş sayısı}}{\text{Açık kola giriş sayısı} + \text{Kapalı kola giriş sayısı}} \times 100 \quad (3.1)$$

- Açık kolda geçen sürenin yüzdesi (%), Formül 3.2 kullanılarak hesaplandı (184).

$$\frac{\text{Açık kolda geçen süre (sn)}}{\text{Açık kolda geçen süre (sn)} + \text{Kapalı kolda geçen süre (sn)}} \times 100 \quad (3.2)$$

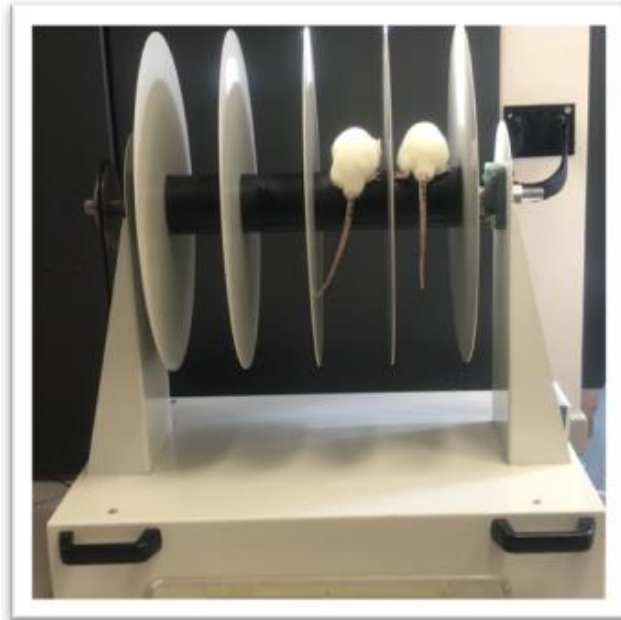
Hayvanın dört ayağının da açık kol üzerinde olduğu durum, açık kola giriş olarak kabul edildi (121). Kolların kesişim noktası olan merkez bölgede geçirilen süre ve merkez bölgeye giriş verileri açık veya kapalı kola dahil edilmedi. Bu bölge analiz dışı bırakıldı.

3.4.3. Rotarod Testinin Uygulanması

Rotarod testi, motor koordinasyon ve dengeyi değerlendirmek için kemirgenlerde sıklıkla tercih edilen bir testtir. Hastalık modellerinin, fizyolojik değişkenlerin veya herhangi bir ilacın motor sistem üzerine etkilerini araştırmak için kullanılır (185, 186).

Anksiyete benzeri davranışları ölçen testler vücut aktivitesine bağlı testler olduğu için ve sıçanlara verilen ajanların motor sisteme etkilerinin olup olmadığını araştırabilmek için rotarod testi kullanıldı.

8 cm çapında silindir bir çubuktan, çubuğun dönmesini sağlayan bir motordan ve 10 cm genişliğinde 4 bölmeden oluşan bir test düzeneği kullanıldı (Şekil 3.4). Kullanılan test düzeneğinin dakikadaki devir sayısı (rpm) 16'ya kadar çıkabilmektedir.



Şekil 3.4. Rotarod testi

Deney, eğitim ve test aşaması olarak 2 aşamadan oluşturuldu. Yükseltilmiş artı labirent testi sonlanan hayvanlar son olarak rotarod testinin uygulanacağı odaya getirildi ve ikişerli olarak eğitilip test edildi.

Eğitim aşaması 2 dakika sürdü.

1. Hayvanlar 4 rpm'de dönen silindir çubuğun üzerine dönme yönünün tersine bakacak şekilde ve nazikçe yerleştirildi (187).
2. Düzeneğin hızı ilk 60 saniyede kademeli olarak artırıldı ve son 60 sn'de maksimum hızda (16 rpm) hayvanlar yürütüldü.
3. Eğitim bittikten sonra %70 etanol ile düzenek temizlendi ve kağıt havluyla kurutuldu. Bu esnada sıçanlar 2 dk boyunca dinlendirildi.

Daha sonra 3 aşamadan oluşan test adımına geçildi. Test adımı, düzeneği karşıdan göreceğ şekilde yerleştirilmiş bir kamera yardımı ile kayıt altına alındı.

1. Hayvanlar 4 rpm'de dönen silindir çubuğun üzerine dönme yönünün tersine bakacak şekilde ve nazikçe yerleştirildi (187).
2. Silindirin hızı 16 rpm'e yükseltildi ve test bu hızda yapıldı.
3. Düzeneğe yerleştirildikten sonra ilk 15 saniye içerisinde düşme durumu yaşanırsa hayvan tekrar düzeneğe yerleştirildi. Bu düşüşlerin sebebinin testi yapan kişinin hayvanları kötü yerleştirmesinden kaynaklı olabileceği düşünüldü ve testi sonlandıracak bir durum olarak kabul edilmedi (187).
4. Her aşama 60 saniye veya hayvan düzenekten düşene kadar devam etti. Test aşamalarının arasında hayvanlar için 60 saniyelik dinlenme periyotları mevcuttu (188).
5. Dinlenme periyodunda düzenek %70 etanol ile temizlendi ve kağıt havluyla kurutuldu.

Bir sıçanın dönen silindir çubuk üzerinde geçirdiği toplam süre motor koordinasyonunun nicel bir göstergesidir (186). Sıçanların düzenek üzerinde kaldıkları süre değerlendirme kriterini oluşturdu ve her saniye 1 puana denk geldi. Alınabilecek maksimum puan 180 olarak kabul edildi (188).

3.5. Kan ve Beyin Dokularının Alınması

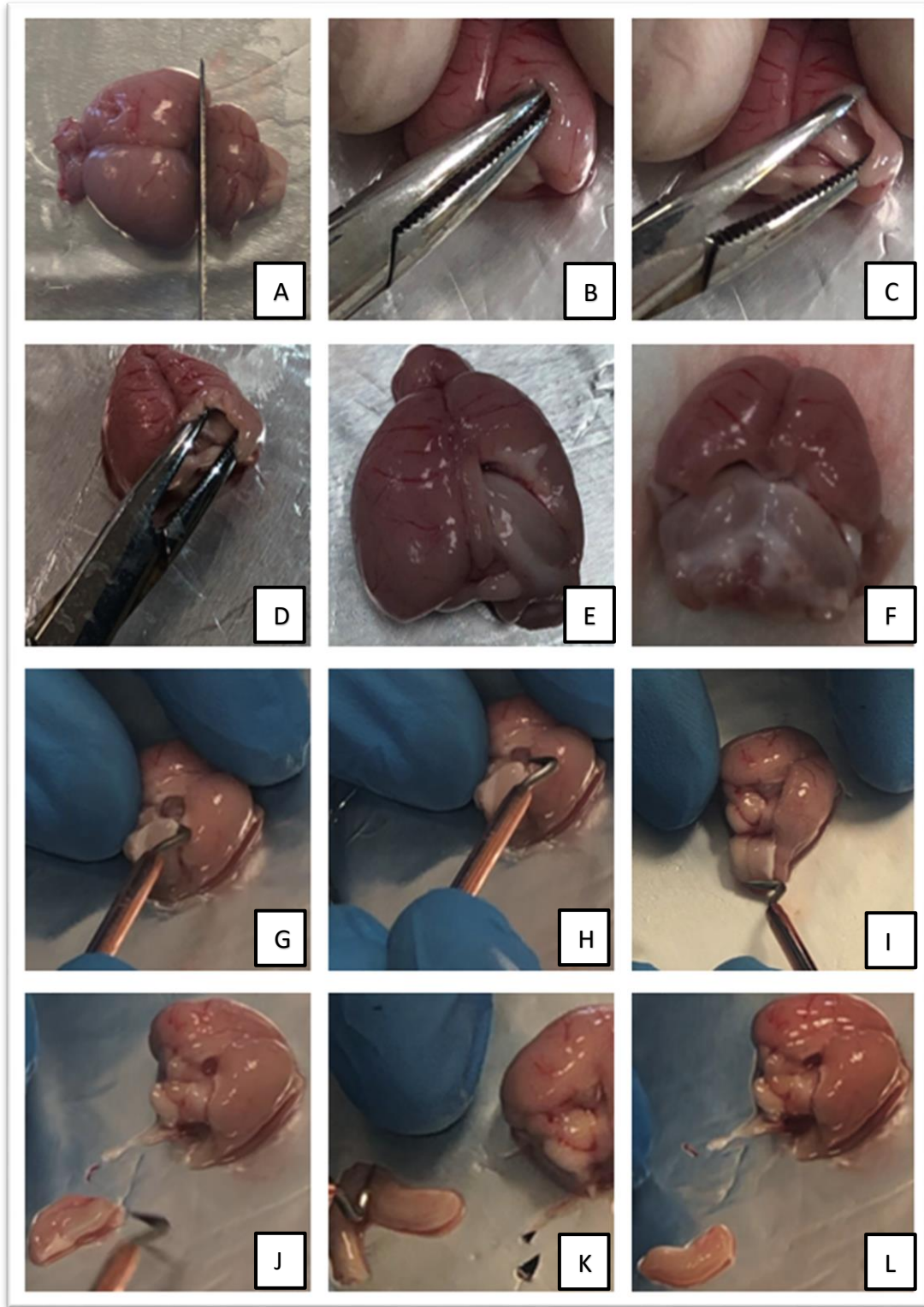
Davranış ve rotarod testleri tamamlandıktan sonra hayvanlar ketamin (90 mg/kg, i.p.) ve ksilazin (10 mg/kg, i.p.) karışımı kullanılarak anestezi altına alındı. Anestezi altındaki hayvanların abdomen bölgesi dikey bir şekilde kesilerek açıldı. Hayvanların bağırsakları yan tarafa alınarak inferior vena cavalasına ulaşıldı. Bir enjektör yardımıyla kan örnekleri alındı ve sarı kapaklı jelli biyokimya tüplerine koyuldu. Kan örnekleri yaklaşık 20 dakika oda sıcaklığında bekletildikten sonra 5000 rpm'de 10 dakika, santrifüj (Kubota Tabletop Refrigerated Centrifuge 5500, Osaka, Japonya) edildi. Kan serumları elde edildi ve daha sonra kullanılmak üzere 1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüplerine konuldu. Örnekler biyokimyasal analizler yapıncaya kadar -80°C'lik derin dondurucuda saklandı.

Hayvanlar eksanguinasyon ile sakrifiye edildikten sonra beyinleri çıkarıldı. Spijker'in sıçan beyin bölgelerinin diseksiyonu temel alınarak hipokampus izole edildi (189).

- 1) Tüm deneyin soğuk bir zeminde çalışılması için bir petri kabının iç kısmı buzla dolduruldu ve kabin çevresi alüminyum folyo ile sarıldı.
- 2) Beynin ventral yüzü soğuk zeminle temas edecek şekilde petri kabının dış yüzeyine yerleştirildi ve fazla kanın uzaklaştırılması için beyin, serum fizyolojik ile yıkandı.
- 3) Arka beyin, cerebellum kısmından uzaklaştırıldı.
- 4) Beynin arka tarafı ve orta hattından cerebral yarılardan arasına forceps, kapalı bir şekilde yerleştirildi.

- 5) Kortikal yarıl原因ın açılması için forceps yavaşça açıldı. Sonra hangi tarafın hipokampüsü izole edilecekse forcepsin ucu ona göre yönlendirildi.
- 6) Açma kapama işlemlerine hipokampüsün üst kısmı görünene (grimsi yarı saydam doku) kadar devam edildi. Hipokampüse zarar verilmeden korteks kısımları uzaklaştırıldı.
- 7) Hipokampüs tamamen açığa çıktığında ise hipokampüsün üst uç kısmından geriye doğru sıyrıldı ve beynin kalan kısmından uzaklaştırıldı.
- 8) Hipokampüsün etrafında korteks kalıntısı kaldığı takdirde bunlar da uzaklaştırıldı.
- 9) Bu izolasyon işlemi her iki taraf için de sırasıyla yapıldı (Şekil 3.5).

Hipokampüs izole edildikten sonra 1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüplerine konuldu ve 80°C'lik derin dondurucuya alınana kadar sıvı nitrojende tutuldu.



Şekil 3.5. Hipokampus izolasyonu: A) Arka beyin uzaklaştırılması B) Forcepsin kapalı bir şekilde yerleştirilmesi C) ve D) Forcepsin açılması E) Hipokampusün tek taraflı görülmesi F) Hipokampusün iki taraflı görülmesi G) H) ve I) Hipokampusün geriye doğru sıyrılması J) K) ve L) Hipokampus dokusundan korteks kalıntılarının temizlenmesi.

3.6. Doku Homojenizasyonu

Deney günü hipokampus örnekleri $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'den çıkarılarak çözünmeleri sağlandı. Çözünen hipokampus dokuları bilateral olarak gram cinsinden hassas terazi kullanılarak (Mettler Toledo AB204-S, Ohio, ABD) tartıldı ve deney tüplerine yerleştirildi. Daha sonra üzerine 1:9 ağırlık (g) hacim (ml) oranında fosfat tampon (PBS) (Sigma-Aldrich P4417) çözeltisi eklendi. Deney tüpü, buzla dolu bir beherin içerisine yerleştirildi ve dokuların deney boyunca buz üzerinde homojenleşmesi sağlandı (Şekil 3.6) (Şekil 3.7).



Şekil 3.6. Mekanik homojenizatör

Şekil 3.7. Ultrasonik homojenizatör

Hipokampus dokusu ilk olarak mekanik homojenizatör (Pro Scientific PRO200 Homogenizer, Connecticut, ABD) yardımı ile homojen bir görüntü elde edilene kadar parçalandı (Şekil 3.6). Sonrasında ultrasonik homojenizatör (OMNI Ruptor 4000, Georgia, ABD) ile parçalama işlemine devam edildi (Şekil 3.7). Bu işlem 3 kez olmak üzere %50 amplitüdde (130 W), 60 saniyelik uyarılar kullanılarak tekrarlandı.

Parçalama işlemleri bittikten sonra elde edilen homojenatlar $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de 15000 rpm'de 10 dakika süreyle santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatantlar 1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüplerine konularak $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de saklandı.

3.7. Biyokimyasal Analizler

3.7.1. Toplam Protein Tayini

Doku homojenizasyonundan sonra elde edilen örneklerin protein miktarı, Bicinchoninic Asit (BCA) yöntemi ile ölçüldü. ABP Biosciences BCA protein ölçüm kiti (katalog no: P011A) kullanıldı. Üretici firmanın önerdiği mikropłaka protokolü referans alınarak ölçümler yapıldı.

İlk olarak çözeltiler ve örnekler hazırlandı. BCA kitinde bulunan 2 mg/ml yoğunluğundaki sığır serum albümin (BSA) standardı PBS kullanılarak seyreltildi. Yoğunlukları 2 mg/ml ile 0,025 mg/ml arasında değişen toplamda 8 farklı standart çözelti hazırlandı. Hipokampüs dokusundan elde edilmiş protein örnekleri de PBS ile 2 kat seyreltildi. Kör örnek için PBS kullanıldı. Yine kit içerisinde yer alan reaktif A ve B çözeltileri sırasıyla 50:1 oranında karıştırılarak BCA çalışma çözeltisi elde edildi.

Örnekler ve standartlar 2 tekrarlı olacak şekilde 20 µl olmak üzere daha önceden belirlenmiş olan kuyucuklara koyuldu. Daha sonra tüm kuyucuklara 200 µl BCA çalışma çözeltisi eklendi. Bu işlemleri takiben mikropłaka 30 sn çalkalandı ve 37°C'de 30 dk süreyle inkübe edildi. İnkübasyon sonrası mikropłaka okuyucu (Allsheng AMR-100 Microplate Reader, Hangzhou, Zhejiang, Çin Halk Cumhuriyeti) ile 570 nm dalga boyunda absorbans değerleri ölçüldü ve standart eğri oluşturuldu. Elde edilen standart eğri yardımı ile protein miktarları belirlendi. Öncesinde örnekler 2 kat seyreltilmiş olduğu için ortaya çıkan protein miktarları 2 ile çarpılarak tekrar hesaplandı. Değerler µg/ml olarak ifade edildi.

3.7.2. ELISA Deneyleri

ELISA, enzime bağlı immünosorbent tahlilinin kısaltılmış halidir. Prensibi antijen-antikor bağlanmasına dayanır. Bu bağlanmayı saptamak için de bir enzim kullanılır. Burada yer alan enzim ise renksiz bir substratı renkli bir ürüne dönüştürerek antijen-antikor bağlanmasının varlığını gösterir (190). Kolay bir şekilde uygulanması, hızlı sonuç vermesi ve güvenilir bir test olması nedeniyle sıklıkla tercih edilen bir yöntemdir (191).

Yapılan bu çalışmada hipokampus dokusundan elde edilen homojenatlardan GABA, serotonin ve noradrenalin miktarı bu yöntem kullanılarak ölçüldü. Ayrıca yine elde edilen serumdan kan kortizolü miktarının ölçümü için ELISA kullanıldı. GABA, serotonin ve kortizol miktarının tespit edilmesi için sandwich-ELISA yöntemi kullanılırken noradrenalin miktarı için kompetitif-ELISA kullanıldı.

GABA Miktarının Ölçülmesi

GABA miktarı sandwich-ELISA yöntemi kullanılarak ölçüldü. Bioassay Technology Laboratory GABA Elisa test kiti (katalog no: E0102Ra) kullanıldı. Kit içerisinde yer alan yönerge referans alınarak ölçümler yapıldı.

1. -80°C 'den doku örnekleri çıkarıldı. Örnekler, kit ve çözeltiler kullanılmadan önce oda sıcaklığına getirildi.
2. Örnekler 4 kat PBS ile seyreltildi ve standartlar hazırlandı.
3. Daha önceden GABA antikoruyla kaplanmış olan kuyucuklara 40 μl örnekler eklendi.
4. Standart kuyucuklarına 50 μl standart çözeltiler eklendi.
5. Daha sonra örnek kuyucukların üzerine 10 μl biyotinleşmiş GABA'ya özgü saptama antikoru ilave edildi.
6. Son olarak kör kuyucuklar haricindeki tüm kuyucuklara 50 μl Streptavidin-Horseradish Peroxidase (HRP) antikoru eklendi.
7. 37°C 'de 60 dk süreyle inkübe edildi.
8. İnkübasyon işlemini takiben serbest bileşenlerin uzaklaştırılması için tüm kuyucuklar yıkama solüsyonu kullanılarak yıkandı ve bu işlem 5 kez tekrarlandı.
9. Bütün kuyucuklara sırasıyla 50 μl substrat-A ve substrat-B reaktifleri eklendi. Kuyucukların rengi enzim-substrat reaksiyonu sonucunda GABA miktarıyla doğru orantılı olarak maviye dönmeye başladı.

10. 37°C'de 10 dk inkübe edildi.
11. Enzim-substrat reaksiyonunun sonlandırılması amacıyla tüm kuyucuklara 50 µl stop çözeltisi eklendi ve kuyucukların renginin sarıya dönmesi gözlemlendi.
12. Tüm bu işlemler bittikten sonra plaka, 450 nm dalga boyunda mikrolaka okuyucusunda okutuldu.
13. Örneklerin absorbanans değerleriyle standart eğri karşılaştırılarak GABA miktarları tayin edilmiş oldu.
14. Çıkan sonuçlar başlangıçta örnekler 4 kat seyreltildiği için 4 ile çarpılarak tekrar hesaplandı.
15. Daha sonra elde edilen sonuç, total protein miktarına (GABA miktarı/total protein miktarı) oranlanarak standardize edildi. Değerler nmol/g olarak ifade edildi.

Serotonin Miktarının Ölçülmesi

Serotonin miktarı sandwich-ELISA yöntemi kullanılarak ölçüldü. Bioassay Technology Laboratory Serotonin Elisa test kiti (katalog no: E0866Ra) kullanıldı. Kit içerisinde yer alan yönerge referans alınarak ölçümler yapıldı.

1. -80°C'den doku örnekleri çıkarıldı. Örnekler, kit ve çözeltiler kullanılmadan önce oda sıcaklığına getirildi.
2. Örnekler 4 kat PBS ile seyreltildi ve standartlar hazırlandı.
3. Daha önceden serotonin antikoruyla kaplanmış olan kuyucuklara 40 µl örnekler eklendi.
4. Standart kuyucuklarına 50 µl standart çözeltiler eklendi.
5. Daha sonra örnek kuyucukların üzerine 10 µl biyotinleşmiş serotonine özgü saptama antikoruna ilave edildi.

6. Son olarak kör kuyucuklar haricindeki tüm kuyucuklara 50 µl Streptavidin-HRP antikoru eklendi.
7. 37°C'de 60 dk süreyle inkübe edildi.
8. İnkübasyon işlemini takiben serbest bileşenlerin uzaklaştırılması için tüm kuyucuklar yıkama solüsyonu kullanılarak yıkandı ve bu işlem 5 kez tekrarlandı.
9. Bütün kuyucuklara sırasıyla 50 µl substrat-A ve substrat-B reaktifleri eklendi. Kuyucukların rengi enzim-substrat reaksiyonu sonucunda serotonin miktarıyla doğru orantılı olarak maviye dönmeye başladı.
10. 37°C'de 10 dk inkübe edildi.
11. Enzim-substrat reaksiyonunun sonlandırılması amacıyla tüm kuyucuklara 50 µl stop çözeltisi eklendi ve kuyucukların renginin sarıya dönmesi gözlemlendi.
12. Tüm bu işlemler bittikten sonra plaka, 450 nm dalga boyunda mikropilaka okuyucusunda okutuldu.
13. Örneklerin absorbans değerleriyle standart eğri karşılaştırılarak serotonin miktarları tayin edilmiş oldu.
14. Çıkan sonuçlar başlangıçta örnekler 4 kat seyreltildiği için 4 ile çarpılarak tekrar hesaplandı.
15. Daha sonra elde edilen sonuç, total protein miktarına (serotonin miktarı/total protein miktarı) oranlanarak standardize edildi. Değerler ng/mg olarak ifade edildi.

Noradrenalin Miktarının Ölçülmesi

Noradrenalin miktarı kompetitif-ELISA yöntemi kullanılarak ölçüldü. Bioassay Technology Laboratory Noradrenalin Elisa test kiti (katalog no: EA0041Ra) kullanıldı. Kit içerisinde yer alan yönerge referans alınarak ölçümler yapıldı.

1. -80°C'den doku örnekleri çıkarıldı. Örnekler, kit ve çözeltiler kullanılmadan önce oda sıcaklığına getirildi.
2. Örnekler 2 kat ile seyreltildi ve standartlar hazırlandı.
3. Uygun kuyucuklara 50 µl örnekler eklendi.
4. Standart kuyucuklarına 50 µl standart çözeltiler eklendi.
5. Daha sonra kör kuyucuklar haricindeki tüm kuyucukların üzerine 50 µl biyotinleşmiş antijen ilave edildi.
6. Antijenin eklenmesinden sonra 37°C'de 60 dk inkübe edildi.
7. Yıkama solüsyonu ile plaka 5 kez yıkandı.
8. Yıkama işleminin ardından kör kuyucuklar haricinde tüm kuyucuklara 50 µl avidin-HRP antikoru eklendi.
9. Plaka tekrar 37°C'de 60 dk süreyle inkübe edildi.
10. İnkübasyon işleminin sonunda tekrar tüm kuyucuklar yıkama solüsyonu kullanılarak yıkandı ve bu işlem 5 kez tekrarlandı.
11. Bütün kuyucuklara sırasıyla 50 µl substrat-A ve substrat-B reaktifleri eklendi. Kuyucukların rengi enzim-substrat reaksiyonun başlamasıyla birlikte noradrenalin miktarı ile ters orantılı olarak maviye dönmeye başladı.
12. 37°C'de 10 dk inkübe edildi.
13. Enzim-substrat reaksiyonunun sonlandırılması amacıyla tüm kuyucuklara 50 µl stop çözeltisi eklendi ve kuyucukların renginin sarıya dönmesi gözlemlendi.
14. Tüm bu işlemler bittikten sonra plaka, 450 nm dalga boyunda mikropilaka okuyucusunda okutuldu.
15. Örneklerin absorbans değerleriyle standart eğri karşılaştırılarak noradrenalin miktarları tayin edilmiş oldu.

16. Çıkan sonuçlar başlangıçta örnekler 2 kat seyreltiildiği için 2 ile çarpılarak tekrar hesaplandı.
17. Daha sonra elde edilen sonuç, total protein miktarına (noradrenalin miktarı/total protein miktarı) oranlanarak standardize edildi. Değerler ng/g olarak ifade edildi.

Kortizol Miktarının Ölçülmesi

Kandan elde edilen serumdaki kortizol miktarı Sandwich-ELISA yöntemi kullanılarak ölçüldü. Bioassay Technology Laboratory Kortizol Elisa test kiti (katalog no: E0828Ra) kullanıldı. Kit içerisinde yer alan yönerge referans alınarak ölçümler yapıldı.

1. -80°C'den doku örnekleri çıkarıldı. Örnekler, kit ve çözeltiler kullanılmadan önce oda sıcaklığına getirildi.
2. Standartlar hazırlandı.
3. Daha önceden kortizol antikoruyla kaplanmış olan kuyucuklara 40 µl örnekler eklendi.
4. Standart kuyucuklarına 50 µl standart çözeltiler eklendi.
5. Daha sonra örnek kuyucukların üzerine 10 µl biyotinleşmiş kortizole özgü saptama antikoruna ilave edildi.
6. Son olarak kör kuyucuklar haricindeki tüm kuyucuklara 50 µl Streptavidin-Horseradish Peroxidase (HRP) antikoruna eklendi.
7. 37°C'de 60 dk süreyle inkübe edildi.
8. İnkübasyon işlemini takiben serbest bileşenlerin uzaklaştırılması için tüm kuyucuklar yıkama solüsyonu kullanılarak yıkandı ve bu işlem 5 kez tekrarlandı.

9. Bütün kuyucuklara sırasıyla 50 µl substrat-A ve substrat-B reaktifleri eklendi. Kuyucukların rengi enzim-substrat reaksiyonu sonucunda kortizol miktarıyla doğru orantılı olarak maviye dönmeye başladı.
10. 37°C'de 10 dk inkübe edildi.
11. Enzim-substrat reaksiyonunun sonlandırılması amacıyla tüm kuyucuklara 50 µl stop çözeltisi eklendi ve kuyucukların renginin sarıya dönmesi gözlemlendi.
12. Tüm bu işlemler bittikten sonra plaka, 450 nm dalga boyunda mikropilaka okuyucusunda (BioTek ELx800 Absorbance Microplate Reader) okutuldu.
13. Örneklerin absorbans değerleriyle standart eğri karşılaştırılarak kortizol miktarları tayin edilmiş oldu.
14. Değerler ng/ml olarak ifade edildi.

3.7.3. Kan Parametrelerinin Ölçümü

Kan serum örneklerinde Alanin Aminotransferaz (ALT), Aspartat Aminotransferaz (AST), kan üre azotu (BUN), kreatinin, glikoz, trigliserid ve total kolesterol miktarları ölçüldü. Ölçümler Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Merkez Laboratuvarında biyokimya otoanalizör cihazı kullanılarak yapıldı.

3.8. İstatistiksel Analizler

Verilerin istatistiksel analizleri SPSS 26 programı (IBM SPSS Statistics v26) kullanılarak yapıldı. Verilerin normal dağılıma uygunluğu Kolmogorov-Smirnov testi yapılarak değerlendirildi. Normallik testinin sonucunda gruplar arası karşılaştırmalar Kruskal-Wallis testi kullanılarak yapıldı. Gruplar arasında anlamlı bir fark görülmesi durumunda Bonferroni düzeltilmeli Dunn's testi kullanıldı ve grupların birbirleriyle olan ilişkileri karşılıklı bir şekilde incelendi. Sayısal değişkenler için ortanca, maksimum ve minimum değerler gibi tanımlayıcı istatistikler verildi ve bu veriler tablolar halinde sunuldu. İstatistiksel anlamlılık düzeyi $p < 0,05$ olarak kabul edildi.

İstatistiksel analiz sonucunda anlamlı farklılık saptanan veriler için kutu (boxplot) grafikleri oluşturuldu. Kutunun içerisinde yer alan yatay siyah çizgiler ile ortanca değerler, kutunun alt ve üst sınırlarıyla sırasıyla 25. ve 75. yüzdeler gösterildi. Kutunun uçlarından çizilen doğrularla aykırı (aşırı) olmayan maksimum ve minimum değerler verildi. Bunun dışında aykırı olan değerlerin gösterilmesi için noktasal şekiller kullanıldı. Bu grafiklerin çizimi için SPSS 26 programı kullanıldı.

4. BULGULAR

4.1. Süre Tayini için Yapılan Ön Çalışmanın Bulguları

Tek seferde gavajla sıçanlara verilecek kakaonun muhtemel anksiyolitik etkisinin ne zaman ortaya çıkacağı literatürde mevcut olmadığı için ana deneylere başlamadan önce bu etkinin ortaya çıkacağı süre tayin edilmeye çalışılmıştır. Bunun için açık alan testi ve yükseltilmiş artı labirent testi yapılmıştır. Açık alan testi için sıçanların merkez alana giriş sayısı ve merkez alanda geçirdikleri süre değerlendirilmiştir. Yükseltilmiş artı labirent testinde ise sıçanların açık kollara giriş sayısı, açık kollarda geçirdikleri süre, açık kola giriş sayısının yüzdesi ve açık kolda geçen sürenin yüzdesi değerlendirilmiştir. Hem açık alan testi hem yükseltilmiş artı labirent testi sonuçları incelendiğinde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark ortaya çıkmamıştır ($p>0,05$) (Tablo 4.1). Anlamlılık tespit edilmemiş olsa bile 90 dk grubunda yer alan sıçanların 60 dk grubuna göre anksiyete benzeri davranışları ifade edilen parametrelerde daha düşük seviyede gözlenmiştir.

Deney esnasında yükseltilmiş artı labirent test düzeneğinden 90 dk grubunda yer alan sıçanlardan 1 tanesi düşmüştür. Bu hayvanın verileri istatistiksel olarak değerlendirilmeye alınmamıştır. Tüm grupların davranış deneylerine ait parametrelerinin ortanca, maksimum ve minimum değerleri Tablo 4.1.de verilmiştir.

Tablo 4.1. Süre tayini için yapılan ön çalışmanın davranış testi parametreleri

		Kontrol (n=3)	60 dk (n=3)	90 dk (n=3)
Merkeze Giriş Sayısı	Ortanca	1	6	10
	(Min-Maks)	1-3	3-7	5-12
Merkezde Geçirilen Süre (sn)	Ortanca	8	38	45
	(Min-Maks)	4-8	16-48	25-69
Açık Kola Giriş Sayısı	Ortanca	1	3	5
	(Min-Maks)	0-3	2-5	3-7
Açık Kola Giriş Yüzdesi (%)	Ortanca	25	42,8	42,8
	(Min-Maks)	0-50	20-45,4	38,4-63,6
Açık Kolda Geçirilen Süre (sn)	Ortanca	13	90	125
	(Min-Maks)	0-30	26-92	68-155
Açık Kolda Geçirilen Süre Yüzdesi (%)	Ortanca	9,2	40,1	58,9
	(Min-Maks)	0-10,6	10,5-45,3	30,2-68,6

4.2. Ana Deney Bulguları

4.2.1. Hayvanların Vücut Ağırlıkları

Sıçanların oral gavaj işlemi öncesinde vücut ağırlıkları ölçülmüştür. Gruplar arası vücut ağırlıkları incelendiğinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p>0,05$) (Tablo 4.2). Tüm grupların vücut ağırlıklarına ait ortanca, maksimum ve minimum değerleri Tablo 4.2.de verilmiştir.

Tablo 4.2. Vücut ağırlıkları

		K (n=8)	D (n=8)	K500 (n=8)	K1000 (n=8)	S (n=8)	K500+S (n=8)	K1000+S (n=8)	T (n=8)
Hayvan Ağırlıkları (g)	Ortanca	210,5	204,5	215	205,5	203,5	204	204	200,5
	(Min-Maks)	203-216	195-211	201-228	194-214	195-221	192-220	194-213	191-223

4.2.2. Açık Alan Testi Bulguları

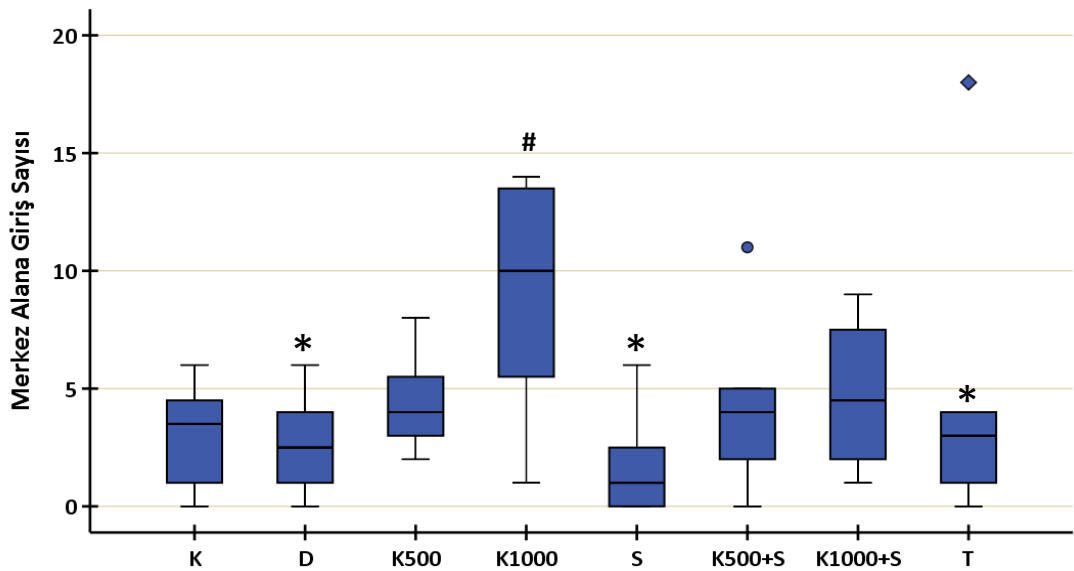
Açık alan testi için değerlendirme kriterlerini sıçanların merkez alana giriş sayısı, merkez alanda geçirdikleri süre, çizgi geçme sayısı, şahlanma (iki ayağı üzerinde kalkma davranışı), tımarlanma (tüylerini temizlemek üzere yalanma, kaşınma) sayısı ve süresi oluşturmuştur. Tüm bu parametreler için grupların ortanca, maksimum ve minimum değerleri Tablo 4.3.te verilmiştir.

Merkez Alana Giriş Sayısı ve Süresi

Sıçanların merkez alana giriş sayıları değerlendirildiğinde merkez bölgeye en çok sayıda girişin K1000 grubunda olduğu saptanmıştır. K1000 grubunun merkez bölgeye giriş sayısı kontrol, tween80, diazepam ve sükroz gruplarına kıyasla istatistiksel olarak yüksek çıkmıştır ($p<0,05$) (Şekil 4.1). Merkez alanda geçirilen süre değerlendirildiğinde ise K1000 grubunun diğer gruplara göre daha uzun süre merkez bölgede zaman geçirdiği gözlenmiştir. Bununla birlikte gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p>0,05$) (Tablo 4.3).

Tablo 4.3. Açık alan testi parametreleri

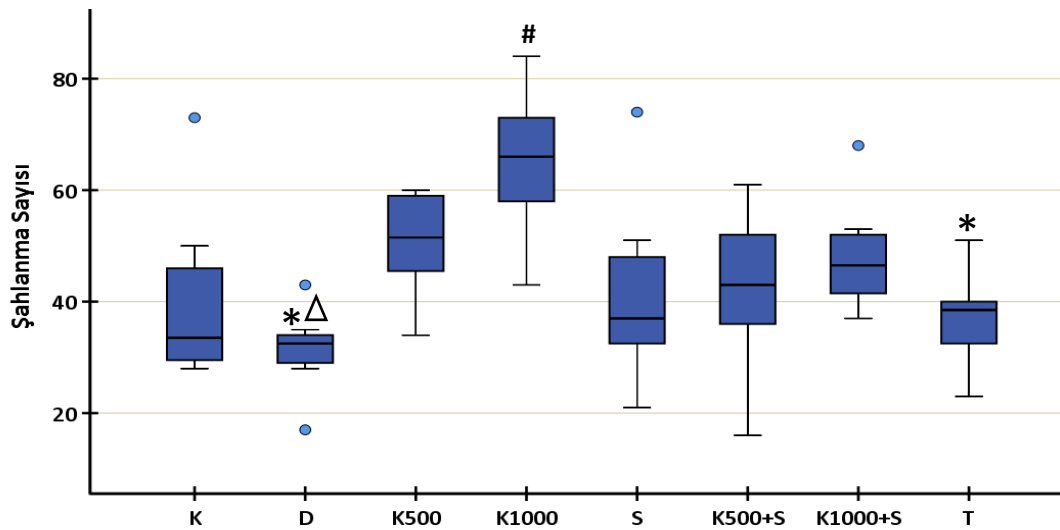
		K (n=8)	D (n=8)	K500 (n=8)	K1000 (n=8)	S (n=8)	K500+S (n=8)	K1000+S (n=8)	T (n=8)
Merkeze Giriş Sayısı	Ortanca	3,5	2,5	4	10	1	4	4,5	3
	(Min-Maks)	0-6	0-6	2-8	1-14	0-6	0-11	1-9	0-18
Merkezde Geçirilen Süre (sn)	Ortanca	15,5	12	18,5	36	10,5	10	20,5	16
	(Min-Maks)	2-49	1-28	14-31	6-87	1-40	2-26	10-56	2-115
Şahlanma Sayısı	Ortanca	33,5	32,5	51,5	66	37	43	46,5	38,5
	(Min-Maks)	28-73	17-43	34-60	43-84	21-74	16-61	37-68	23-51
Tımarlanma Sayısı	Ortanca	2,5	3,5	6	2,5	2	2,5	3	4
	(Min-Maks)	1-8	3-6	3-8	0-5	1-5	1-5	2-6	2-13
Tımarlanma Süresi (sn)	Ortanca	39	61	27,5	11	35	27,5	47	22,5
	(Min-Maks)	8-94	18-120	18-69	0-51	2-119	13-66	2-78	16-79
Çizgi Geçme Sayısı	Ortanca	66	56	73,5	95	58	64	68	67
	(Min-Maks)	23-98	39-82	56-132	81-141	38-72	59-110	38-101	52-108



Şekil 4.1. Merkez alana giriş sayısı parametresinin gruplar arası karşılaştırılması
 * K1000'e göre (* = $p < 0,05$). # Kontrol'e göre (# = $p < 0,05$). • aşırı değer. ♦ çok aşırı değer.

Şahlanma Sayısı

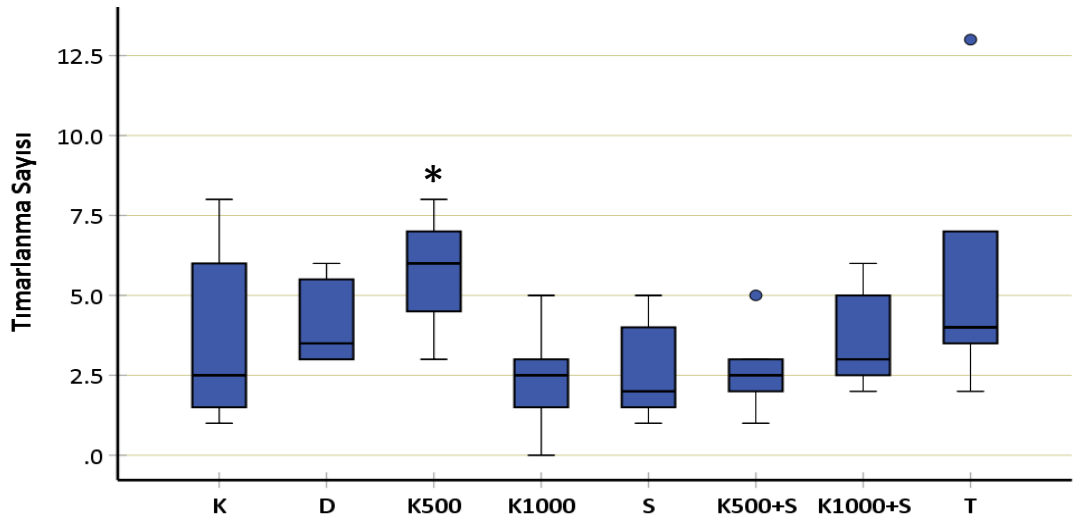
Şahlanma davranışı incelendiğinde K1000 grubu, diğer gruplara kıyasla daha fazla sayıda şahlanma davranışı (şahlanma sayısı) sergilemesine rağmen K1000 grubunun sadece kontrol, tween80 ve diazepam grupları ile olan ilişkisi istatistiksel olarak anlamlı çıkmıştır ($p<0,05$) (Şekil 4.2). Ayrıca K500 ve diazepam grupları arasında da şahlanma davranışı açısından anlamlı bir fark gözlemlenmiştir ($p<0,05$). K500 grubu, diazepam grubuna kıyasla daha fazla miktarda şahlanma davranışı göstermiştir (Şekil 4.2).



Şekil 4.2. Şahlanma sayısı parametresinin gruplar arası karşılaştırılması * K1000'e göre (* = $p<0,05$). # Kontrole göre (# = $p<0,05$). Δ K500 grubuna göre (Δ = $p<0,05$). • aşırı değer.

Tımarlanma Sayısı ve Süresi

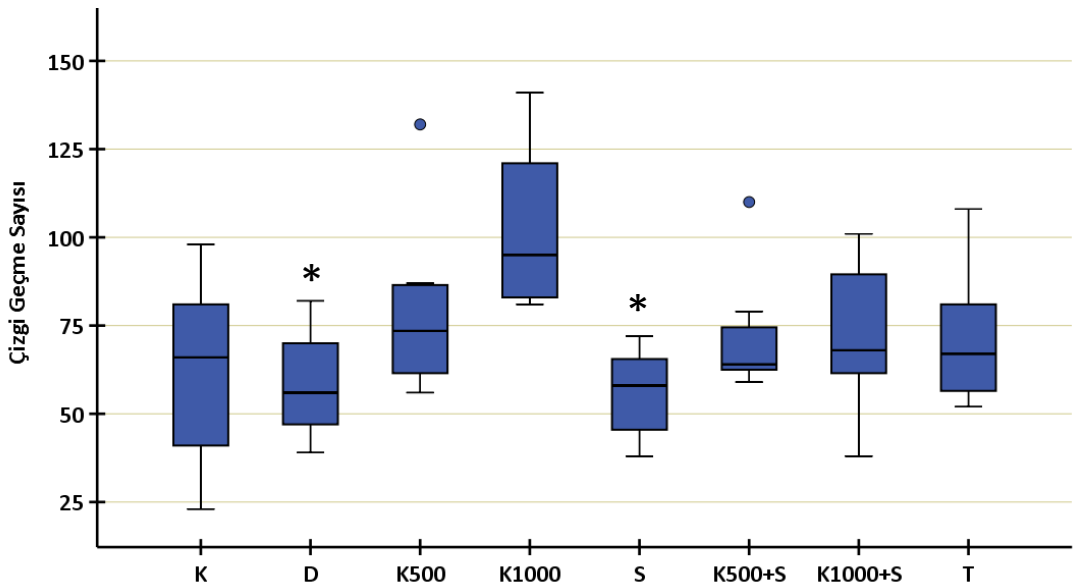
Tımarlanma sayısı incelendiğinde K500 grubunun tımarlanma sayısı, K1000 grubuna göre anlamlı derecede yüksek gözlenmiştir ($p<0,05$) (Şekil 4.3). Tımarlanma süresi dikkate alındığında ise gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p>0,05$) (Tablo 4.3).



Şekil 4.3. Timarlanma sayısı parametresinin gruplar arası karşılaştırılması * K1000'e göre (* = $p < 0,05$). • aşırı değer.

Çizgi Geçme Sayısı

Çizgi geçme sayısı incelendiğinde ise en çok sayıda çizgiyi geçen grubun K1000 grubu olduğu tespit edilmiştir (Tablo 4.3). K1000 grubunun çizgi geçme sayısı, diazepam ve sükroz gruplarına göre anlamlı derecede yüksek gözlenmiştir ($p < 0,05$) (Şekil 4.4).



Şekil 4.4. Çizgi geçme sayısı parametresinin gruplar arası karşılaştırılması * K1000'e göre (* = $p < 0,05$). • aşırı değer.

4.2.3. Yükseltilmiş Artı Labirent Testi Bulguları

Yükseltilmiş artı labirent testinde sıçanların açık ve kapalı kollara giriş sayısı, açık ve kapalı kollarda geçirdikleri süre, açık kola giriş sayısının yüzdesi ve açık kolda geçen sürenin yüzdesi istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. Grupların ortanca, maksimum ve minimum değerleri Tablo 4.4.te verilmiştir.

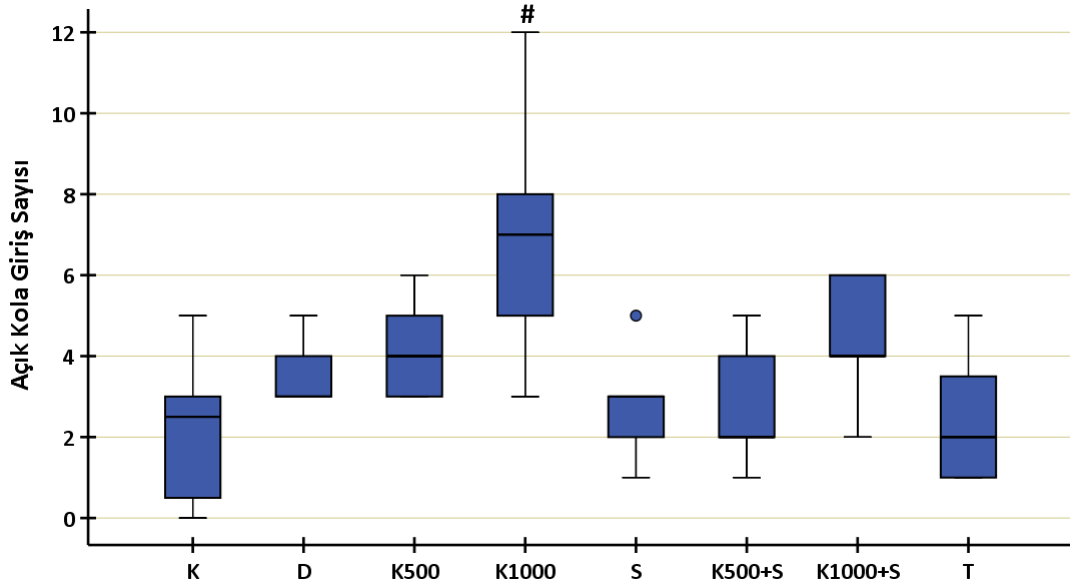
Deney esnasında düzenekten düşen hayvanlar istatistiksel olarak değerlendirilmeye alınmamıştır. Diazepam, K500, sükroz, K500+S ve tween80 gruplarının her birinden birer hayvan, K1000+S grubundan iki hayvan, K1000 grubundan ise üç hayvan test tamamlanmadan düşmüştür. Kontrol grubunda yer alan hayvanlar ise testi düşmeden tamamlamıştır. Böylece tüm analizler elli dört hayvan üzerinden gerçekleştirilmiştir. Sadece bu hayvanların verileri sunulmuştur.

Tablo 4.4. Yükseltilmiş artı labirent testi parametreleri

		K (n=8)	D (n=7)	K500 (n=7)	K1000 (n=5)	S (n=7)	K500+S (n=7)	K1000+S (n=6)	T (n=7)
Açık Kola Giriş Sayısı	Ortanca	2,5	3	4	7	3	2	4	2
	(Min-Maks)	0-5	3-5	3-6	3-12	1-5	1-5	2-6	1-5
Kapalı Kola Giriş Sayısı	Ortanca	3,5	3	3	6	3	4	3,5	3
	(Min-Maks)	1-8	0-4	2-5	3-7	2-5	2-5	2-4	1-6
Açık Kola Giriş Yüzdesi (%)	Ortanca	33,3	50	60	53,8	42,8	42,8	55	33,3
	(Min-Maks)	0-71,4	42,8-100	42,8-66,6	45,4-66,6	16,6-71,4	25-50	40-66,6	33,3-62,5
Açık Kolda Geçirilen Süre (sn)	Ortanca	18	51	72	65	33	30	32	38
	(Min-Maks)	0-50	32-295	65-220	30-166	9-65	7-94	22-74	16-70
Kapalı Kolda Geçirilen Süre (sn)	Ortanca	240,5	202	199	213	243	246	217,5	240
	(Min-Maks)	212-300	0-227	45-227	86-226	192-271	153-270	144-247	194-278
Açık Kolda Geçirilen Süre Yüzdesi (%)	Ortanca	6,9	23,7	26,6	23,4	11,8	10,5	12,3	13,9
	(Min-Maks)	0-18,2	13,5-100	20,5-83	12-65,8	3,5-25,2	2,7-38	9,6-33,9	5,4-26,5

Açık Kola Giriş Sayısı ve Yüzdesi

Açık kola giriş sayısında K1000 grubu, kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek gözlenmiştir ($p<0,05$) (Şekil 4.5). Ancak açık kola giriş sayısının yüzde olarak ifadesi değerlendirildiğinde gruplar arasında anlamlı bir fark ortaya çıkmamıştır ($p>0,05$) (Tablo 4.4).



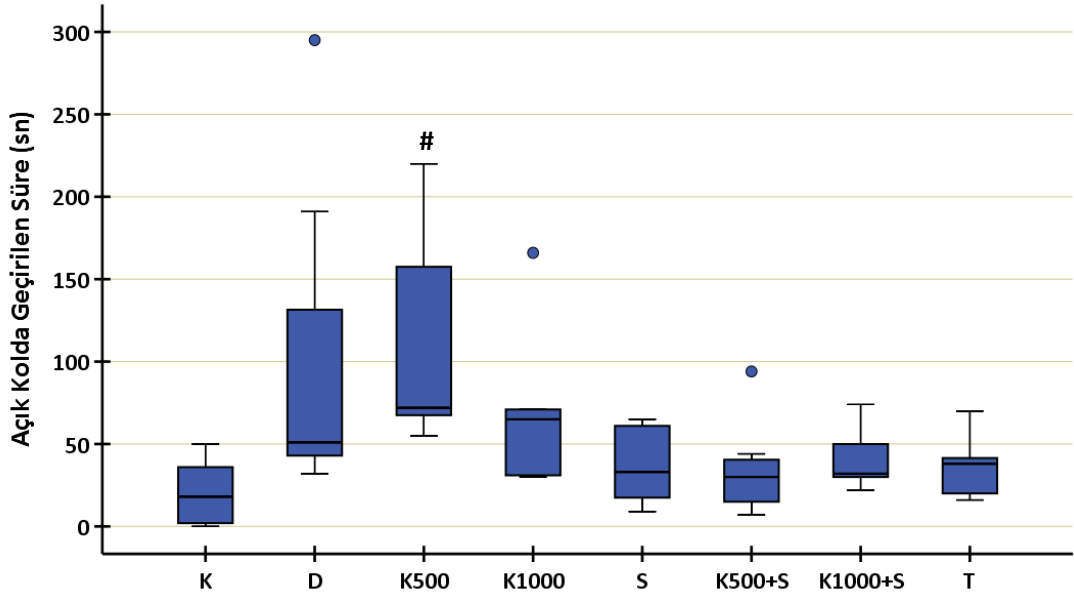
Şekil 4.5. Açık kola giriş sayısı parametresinin gruplar arası karşılaştırılması # Kontrolle göre (# = $p<0,05$). • aşırı değer.

Açık Kolda Geçirilen Süre ve Yüzdesi

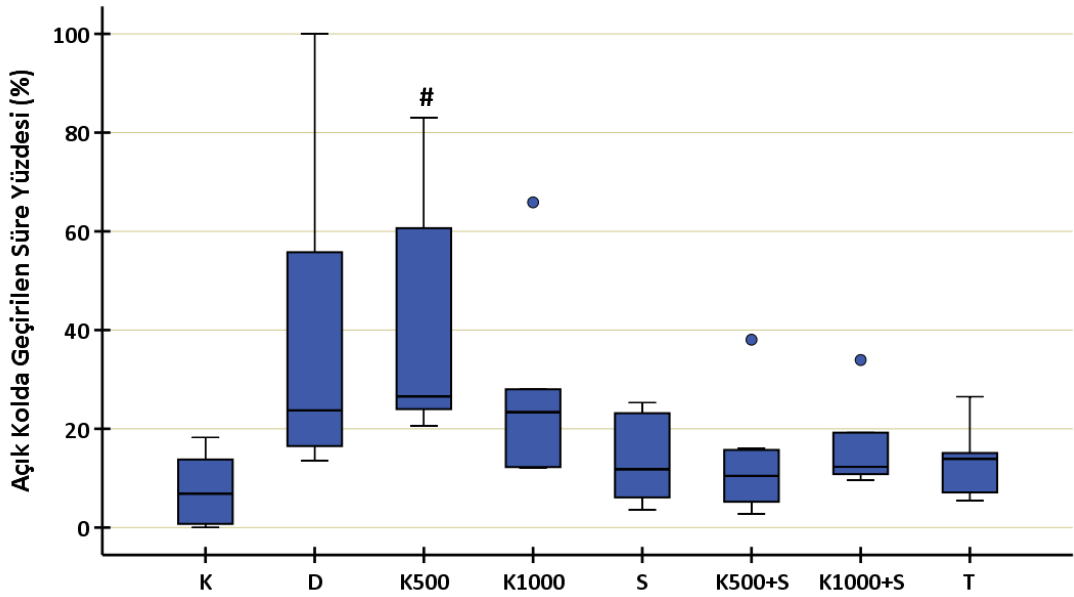
Açık kolda geçirilen süreler ve açık kolda geçirilen sürelerin yüzdelere ait veriler değerlendirildiğinde K500 ve kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur ($p<0,05$). K500 grubu, kontrol grubuna göre açık kolda daha fazla zaman geçirmiştir ($p<0,05$) (Şekil 4.6). Bu zamanın yüzdesi hesaplandığında da K500 grubunun kontrol grubuna göre daha yüksek bir sonuca sahip olduğu görülmüştür ($p<0,05$) (Şekil 4.7).

Kapalı Kola Giriş Sayısı ve Kapalı Kolda Geçirilen Süre

Kapalı kola giriş sayısı ve kapalı kolda geçirilen süreler için veriler değerlendirildiğinde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p>0,05$) (Tablo 4.4).



Şekil 4.6. Açık kolda geçirilen süre parametresinin gruplar arası karşılaştırılması # Kontrol göre (# = $p < 0,05$). • aşırı değer.

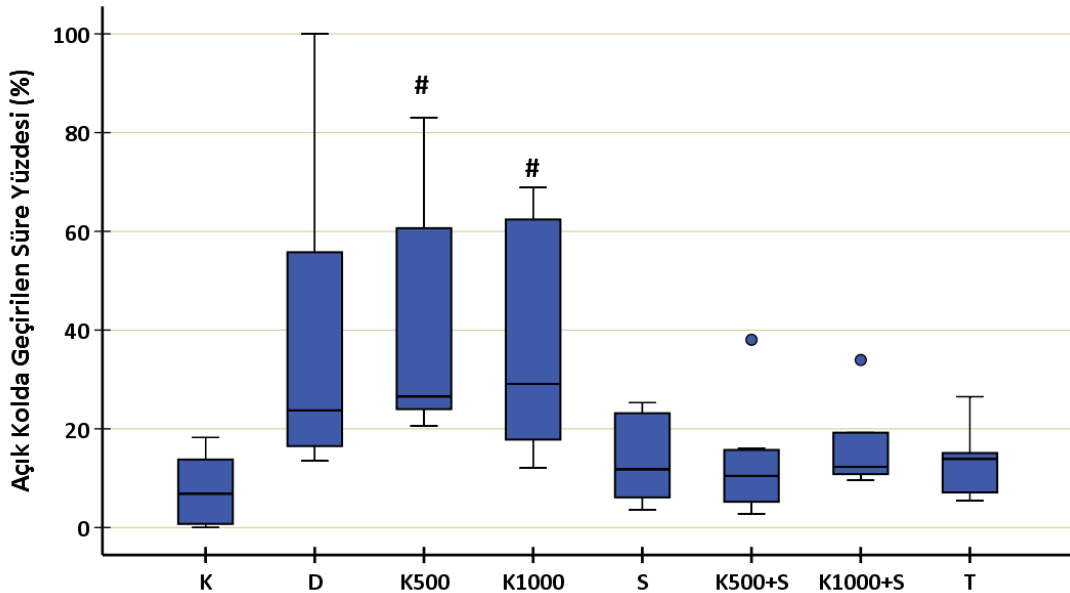


Şekil 4.7. Açık kolda geçirilen süre yüzdesi parametresinin gruplar arası karşılaştırılması # Kontrol göre (# = $p < 0,05$, K1000 için $n=5$). • aşırı değer.

Ön Çalışma Verileri ile Birlikte Ana Çalışma Verilerinin Değerlendirilmesi

K1000 grubundan yer alan 8 hayvandan 3'ü yükseltilmiş artı labirent testini tamamlayamamıştır. En fazla veri kaybı bu grupta yaşanmıştır. Bu yüzden süre tayini çalışmasına ait yükseltilmiş artı labirent testinin 90 dk grubunda yer alan hayvanların verileri (n=3), ana çalışmaya eklenip ortaya çıkan sonuçların tekrar değerlendirilmesi düşünülmüştür. Ön çalışma (süre tayini) verileriyle birlikte hayvan sayısı 8'e çıkmıştır ve bu veriler tekrar değerlendirilmeye alınmıştır. Bu yeni değerlendirmeye birlikte ana verilere (n=5) kıyasla herhangi bir farklılık oluşup oluşmadığına bakılmıştır. Sadece farklılık görülen parametrenin sonucu verilmiştir ve bu parametrenin grafiği oluşturulmuştur (Şekil 4.8.).

Açık kolda geçirilen sürenin yüzde hesabı değerlendirildiğinde kontrol grubuna göre K500 ve ek olarak K1000 grubunda anlamlı bir artış gözlemlenmiştir ($p<0,05$) (Şekil 4.8). Yeni sonuçlarla K1000 grubunun verileri istatistiksel olarak anlamlı çıkmıştır.



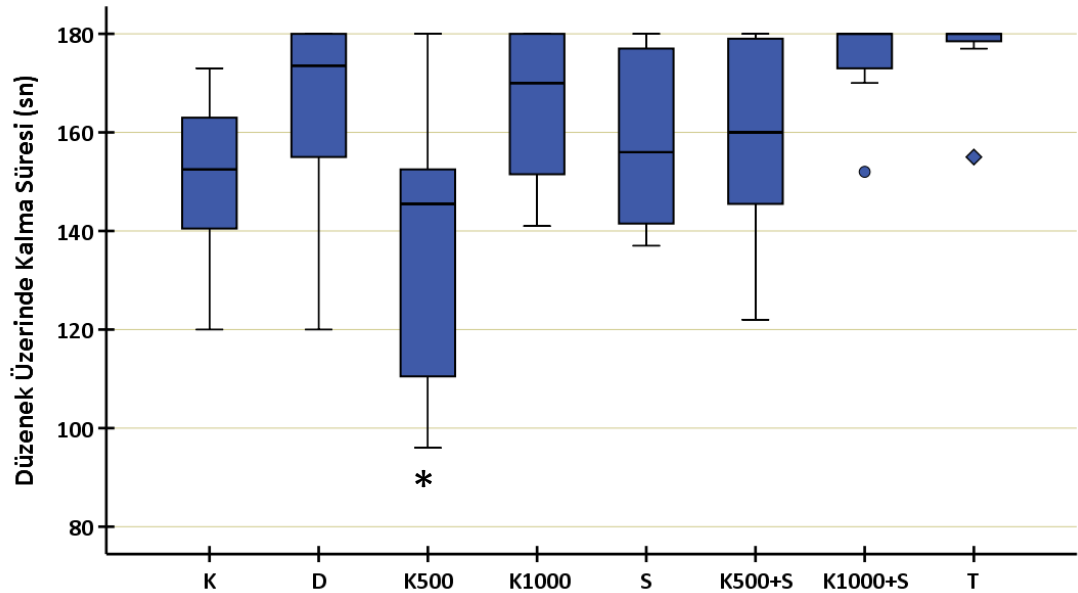
Şekil 4.8. Yükseltilmiş artı labirent testinin ön çalışma verileri ve ana çalışma verilerinin birlikte değerlendirilmesiyle açık kolda geçirilen süre yüzdesi parametresinin gruplar arası karşılaştırılması # Kontrolle göre ($\# = p<0,05$, K1000 için n=8). • aşırı değer.

4.2.4. Rotarod Testi Bulguları

Rotarod testinde, sıçanların düzenek üzerinde kalma süreleri istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. Rotarod testi değerlendirildiğinde düzenek üzerinde en az zaman geçiren grubun K500 grubu olduğu saptanmıştır. K500 ve tween80 grupları arasında anlamlı bir fark bulunmuştur ($p < 0,05$) (Şekil 4.9). Bu gruplar haricinde diğer grupların kendi aralarında kıyaslamalarında ise istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamıştır ($p > 0,05$). Tüm grupların düzenek üzerinde kalma sürelerine ait verilerin ortanca, maksimum ve minimum değerleri Tablo 4.5. ile verilmiştir.

Tablo 4.5. Rotarod testi

		K (n=8)	D (n=8)	K500 (n=8)	K1000 (n=8)	S (n=8)	K500+S (n=8)	K1000 S (n=8)	T (n=8)
Düzenek Üzerinde	Ortanca	152,5	173,5	145,5	170	156	160	180	180
Kalma Süresi (sn)	(Min-Maks)	120-173	120-180	96-180	141-180	137-180	122-180	152-180	155-180



Şekil 4.9. Düzenek üzerinde kalma süresinin gruplar arası karşılaştırılması
* Tween80'e göre ($* = p < 0,05$). ● aşırı değer. ◆ çok aşırı değer.

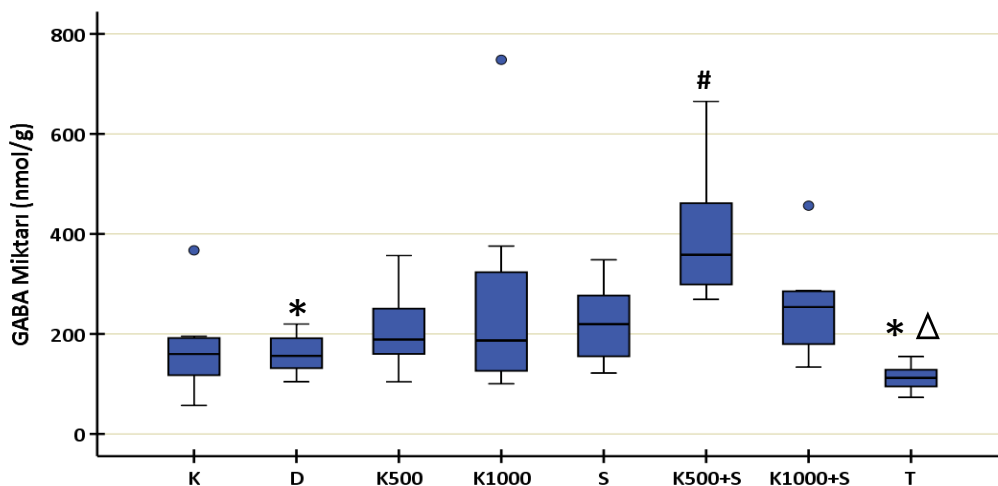
4.2.5. Hipokampus Dokusuna ait Bulgular

Hipokampus dokusuna ait GABA miktarları değerlendirildiğinde K500+S grubunun GABA miktarının diğer gruplara kıyasla daha yüksek düzeyde seyrettiği tespit edilmiştir. Bununla birlikte K500+S'nin sadece kontrol, diazepam ve tween80 grupları ile arasındaki ilişki istatistiksel olarak anlamlı çıkmıştır ($p<0,05$) (Şekil 4.10). Ayrıca K1000+S ve Tween80 grupları arasında da GABA miktarları açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmıştır. K1000+S grubunun GABA miktarının Tween80'e göre daha yüksek düzeyde olduğu gözlenmiştir ($p<0,05$) (Tablo 4.6) (Şekil 4.10).

Tablo 4.6. GABA, serotonin ve noradrenalin miktarları

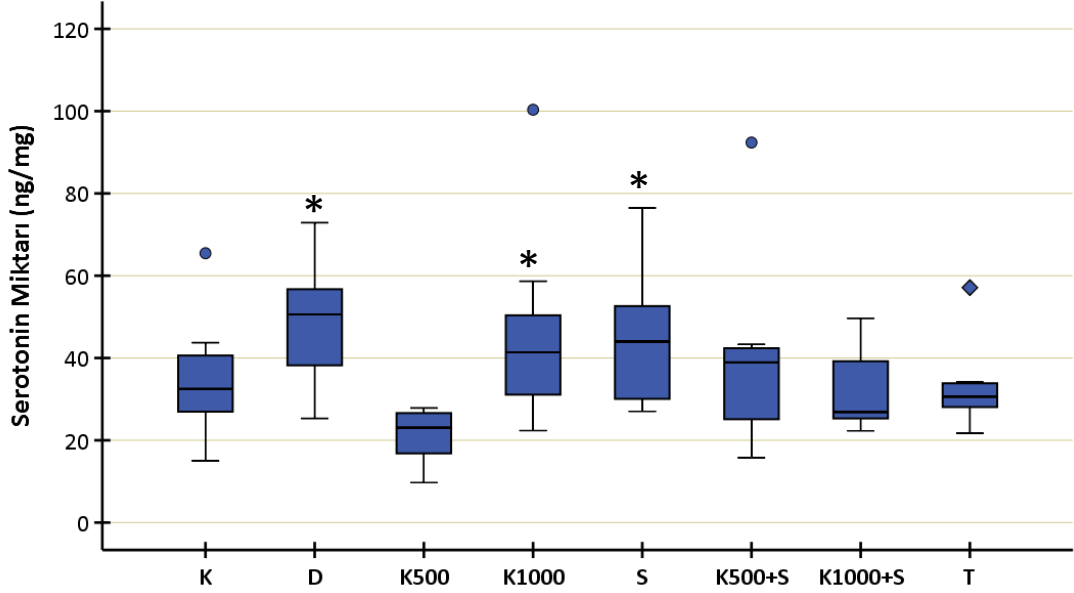
		K (n=8)	D (n=8)	K500 (n=8)	K1000 (n=8)	S (n=8)	K500+S (n=8)	K1000+S (n=8)	T (n=8)
GABA (nmol/g) ($R^2= 0,930$)	Ortanca	159,7	156,1	188,8	186,9	219,6	358,4	253,9	112,0
	(Min-Maks)	56-367	104-219	104-356	100-748	121-348	269-665	133-456	73-154
Serotonin (ng/mg) ($R^2= 0,939$)	Ortanca	32,5	50,6	23,1	41,4	44,0	38,9	26,9	30,6
	(Min-Maks)	15-65	25-72	9-27	22-100	27-76	15-92	22-49	21-57
Noradrenalin (ng/g) ($R^2= 0,996$)	Ortanca	115,2	94,6	58,7	108,2	108,6	96,3	104,3	57,9
	(Min-Maks)	65-183	69-122	30-167	38-160	50-173	61-113	65-203	16-113

R^2 = Determinasyon katsayısı, verilerin standart eğriye uyumunun göstergesi



Şekil 4.10. GABA miktarının gruplar arası karşılaştırılması * K500+S'ye göre (* = $p<0,05$). # Kontrolle göre (# = $p<0,05$) Δ K1000+S'ye göre (Δ = $p<0,05$). \bullet aşırı değer.

Serotonin miktarları değerlendirildiğinde K500 grubunun serotonin düzeyinin, diazepam, sükroz ve K1000 gruplarına kıyasla anlamlı olarak düşük miktarda olduğu tespit edilmiştir ($p<0,05$) (Şekil 4.11). Diğer grupların kendi aralarında kıyaslamalarında ise istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamıştır ($p>0,05$).



Şekil 4.11. Serotonin miktarının gruplar arası karşılaştırılması * K500 grubuna göre (* = $p<0,05$). ● aşırı değer. ◆ çok aşırı değer.

Son olarak hipokampus dokusuna ait noradrenalin miktarları değerlendirildiğinde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır ($p>0,05$) (Tablo 4.6). Tüm grupların GABA, serotonin ve noradrenalin miktarlarına ait ortanca, maksimum ve minimum değerleri Tablo 4.6. ile verilmiştir.

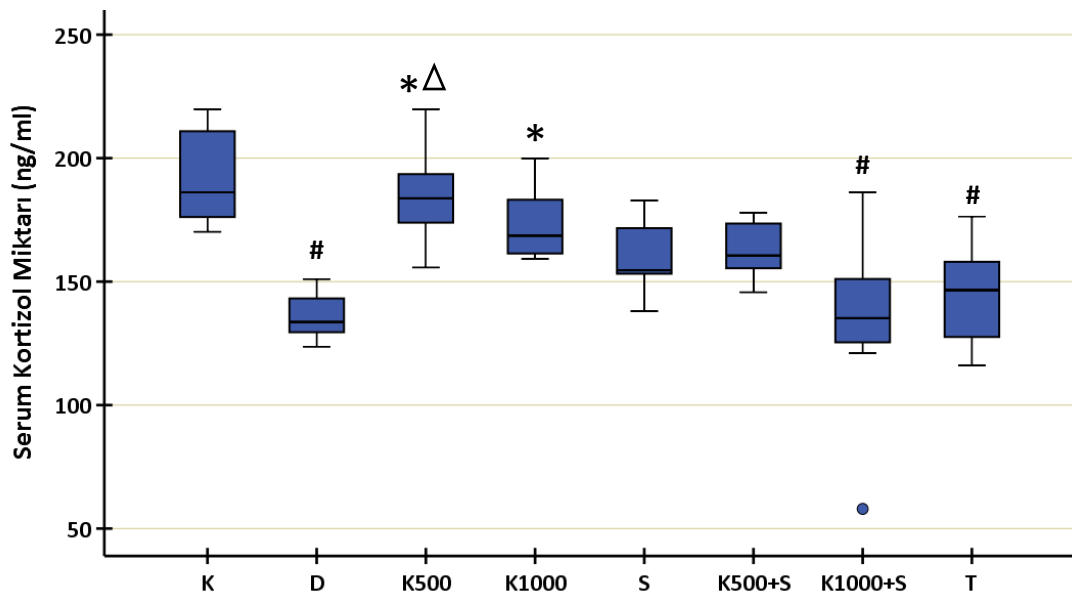
4.2.6. Kan Serum Parametrelerine ait Bulgular

Serum kortizol miktarı verilerine bakıldığında diazepam grubunun kortizol miktarının diğer gruplara oranla daha düşük seviyede olduğu tespit edilmiştir (Tablo 4.6). Diazepam grubunun kortizol seviyesi K1000, K500 ve kontrol gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük bulunmuştur (Şekil 4.12). Ayrıca K1000+S ve tween80 grubunun kortizol miktarı K500 ve kontrol grubuna göre düşük seviyede bulunmuştur ($p < 0,05$) (Şekil 4.12). Tüm grupların serum kortizol miktarlarına ait ortalanca, maksimum ve minimum değerleri Tablo 4.7'de sunulmuştur.

Tablo 4.7. Serum kortizol miktarları

	K (n=8)	D (n=8)	K500 (n=8)	K1000 (n=8)	S (n=8)	K500+S (n=8)	K1000+S (n=8)	T (n=8)
Kortizol (ng/ml)	186,1	133,7	183,7	168,6	154,6	160,6	135,2	146,6
(R²=0,999)								
(Min-Maks)	170-219	123-151	155-219	159-199	138-182	145-177	57-186	116-176

R²= Determinasyon katsayısı, verilerin standart eğriye uyumunun göstergesi



Şekil 4.12. Serum kortizol miktarının gruplar arası karşılaştırılması * Diazepama göre (* = $p < 0,05$). # Kontrole göre (# = $p < 0,05$). Δ K1000+S ve tween80 gruplarına göre (Δ = $p < 0,05$). ● aşırı değer.

Kan serum örneklerinde ayrıca karaciğer ve böbrek fonksiyonlarının değerlendirilmesi için ALT, AST, BUN ve kreatinin miktarları ölçüldü. Bunun yanında glikoz, trigliserid ve total kolesterol miktarları da incelendi. Ancak tüm bu parametreler değerlendirildiğinde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark ortaya çıkmamıştır ($p>0,05$). ALT, AST, BUN ve kreatinin miktarlarına ait ortalama, maksimum ve minimum değerleri Tablo 4.8. ile verilmiştir. Glikoz, trigliserid ve total kolesterol miktarlarına ait ortalama, maksimum ve minimum değerleri Tablo 4.9. ile verilmiştir.

Tablo 4.8. ALT, AST, BUN ve kreatinin miktarları

		K (n=7)	D (n=6)	K500 (n=6)	K1000 (n=7)	S (n=7)	K500+S (n=6)	K1000+S (n=7)	T (n=6)
ALT (U/L)	Ortanca	67	59	69	56	61	78	64	55
	(Min-Maks)	48-84	42-76	52-79	53-74	45-107	46-92	56-81	39-83
AST (U/L)	Ortanca	117	111	130	133	128	134	130	131
	(Min-Maks)	106-153	82-158	111-153	105-148	98-183	124-150	124-159	104-183
BUN (mg/dl)	Ortanca	23,4	20,4	21,2	23	20,30	19	21	22,2
	(Min-Maks)	20,8-24,2	17,9-25,8	16,2,25,5	20,5-25,2	19,5-23,7	18-23,4	18,5-26,1	17,8-25,2
Kreatinin (mg/dl)	Ortanca	0,32	0,25	0,26	0,30	0,35	0,23	0,29	0,31
	(Min-Maks)	0,29-0,39	0,24-0,36	0,21-0,34	0,27-0,34	0,23-0,39	0,19-0,41	0,26-0,39	0,26-0,39

Tablo 4.9. Glikoz, trigliserid ve total kolesterol miktarları

		K (n=7)	D (n=6)	K500 (n=6)	K1000 (n=7)	S (n=7)	K500+S (n=6)	K1000+S (n=7)	T (n=6)
Glikoz (mg/dl)	Ortanca	263	233	190	203	260	204	196	210
	(Min-Maks)	176-302	189-300	146-218	174-221	176-302	166-595	178-243	151-260
Trigliserid (mg/dl)	Ortanca	136	89	105	89	107	83	94	91
	(Min-Maks)	77-172	79-128	70-149	55-103	50-121	65-125	83-117	62-114
Total Kolesterol (mg/dl)	Ortanca	60	61	61	57	58	56	61	56
	(Min-Maks)	45-73	54-67	57-69	51-62	47-69	48-63	54-67	48-67

5. TARTIŞMA

5.1. Süre Tayini

Süre tayini için yapılan ön çalışmada açık alan testi ve yükseltilmiş artı labirent testi sonuçları incelendiğinde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir ($p>0,05$) (Tablo 4.1). Kullanılan hayvan sayısının yeterli miktarda olmamasından kaynaklı olarak anlamlı bir farkın ortaya çıkmadığı düşünülmüştür. Ancak yine de kakao uygulamasından 90 dk sonra sıçanlarda anksiyolitik benzeri davranışların 60 dakikaya göre daha fazla olduğu görülmüştür.

Kakaonun anksiyolitik etkisinin zengin antioksidan içeriğinden kaynaklı olduğu düşünülmektedir (144,145). Bu yüzden ana çalışma için ön çalışmanın sonuçlarının yanı sıra polifenollerin emilim hızları dikkate alınmıştır. Kakaonun başlıca polifenollerinden olan (-)-epikateşin ve (+)-kateşin alımdan 30 dk sonra plazmada saptanabilir ve ortalama 2 saat içerisinde maksimum değere ulaşır. Ayrıca bu süre zarfında metilksantinlerin plazmada hala yarılanmadıkları bilinir (153, 162). Bununla birlikte davranış deneylerinden sonra alınacak olan kan ve hipokampus dokusu örneklerinin polifenollerin kanda maksimum değerde olduğu zaman diliminde alınmasına önem verilmiştir. Tüm bu gerekçeler ve süre tayini (ön çalışma) deneyleri göz önüne alındığında ana çalışma için davranış deneyleri kakao alımından 90 dk sonra yapılmıştır.

5.2. Davranış Testlerinin Değerlendirilmesi

Davranış testleri için güncel olarak en sık kullanılan testler; açık alan testi ve yükseltilmiş artı labirent testidir (114). Bu testlerin bu kadar sık kullanılmasının sebebi hızlı ve kolay uygulanabilir olmasıdır (192). Bu testler, hayvanlara belirsizlik sunar. Belirsizlikten kaynaklı hayvanlarda içgüdüsel olarak tehlike algısı veya keşfetme arzusu oluşabilir. Bu da çeşitli davranış durumlarını ortaya çıkarır (193). Ortaya çıkan davranışların gözlemlenmesiyle hayvanların anksiyete düzeyi hakkında bilgi sahibi olunabilir. Bununla birlikte hayvanların anksiyete düzeylerini değerlendirebilmek için kullanılacak tek bir anksiyete ölçütü bulunmamaktadır (194). Bu yüzden aynı

hayvanlar için birden fazla testin kullanılması önerilen bir durumdur (195). Yapılan bu çalışmada açık alan testi ve yükseltilmiş artı labirent testi hayvanların anksiyete davranışlarının değerlendirilmesi amacıyla kullanılmıştır.

5.2.1. Açık Alan Testi

Açık alan testi için esas olarak hayvanların merkez alana giriş sayıları ve merkez alanda geçirdiği toplam süreler değerlendirilmiştir. Hayvanlar tehdit unsurlarına karşı kaçınma davranışı sergilerler (119). Hayvanlar, bu test genelinde merkez alanı tehdit unsuru olarak görür (115). Bu yüzden merkez alanda geçirilen sürenin ve merkez alana giriş sayılarının artışı sıçanlardaki anksiyete seviyesinin düşük olduğunu gösterir (117). Merkez bölgeye en fazla K1000 grubunun en az ise sükroz grubunun giriş yaptığı gözlenmiştir. Bununla birlikte K1000 grubunda merkez bölgeye giriş sayısında kontrol, tween80, diazepam ve sükroz gruplarına kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir artış gözlemlenmiştir ($p < 0,05$). Merkez alana giriş süresi incelendiğinde yine en fazla zamanı K1000 grubu merkez alanda geçirmiştir. Fakat merkez alanda geçirilen sürede istatistiksel olarak anlamlı bir fark oluşmamıştır. Bu veriler neticesinde K1000 grubunda anksiyete davranışlarının azaldığı söylenebilir.

Hayvanlar kaçınma davranışının yanı sıra yeni ortam hakkında fikir sahibi olmak için merak etme içgüdüleriyle birlikte keşfetme davranışları sergiler (119). Şahlanma (iki ayağı üzerinde yükselme) keşif davranışlarından biridir (117). Şahlanma ve normallik göstergesi olarak bilinen tımarlanma (tüylerini temizlemek üzere yalanma, kaşınma) davranışları destekleyici veri olarak bu çalışmada değerlendirilmiştir. Şahlanma sayısı, tımarlanma sayısı ve süresi hesaplanmıştır. Söz konusu bu parametreler sadece davranışsal gözlemlere dayalı oldukları için duygusal boyutları belirlemede tek başına görev almamaktadır (196). Şahlanma sayısının azalışı anksiyetenin bir göstergesi sayılır (117). Tımarlanma davranışı hakkında ise iki farklı görüş bulunmaktadır (117, 197). Hayvanların stres altında kendilerini rahatlatmak amacıyla tımarlanma davranışını arttırdığı görüşüne dayanarak bu çalışma için tımarlanma davranışının artışı anksiyete ile ilgili davranışlarla ilişkilendirilmiştir.

K1000 grubunda şahlanma sayısı en fazla görülürken tımarlanma sayısı ve süresi en az görülmüştür. K1000 grubunun şahlanma sayısı kontrol, tween80 ve diazepam gruplarına göre anlamlı şekilde yüksek seviyededir ($p<0,05$). K500 grubunda ise sadece diazepam grubuna göre şahlanma sayısı anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ($p<0,05$). Akut benzodiazepin uygulaması sıçanlarda keşif davranışlarını azaltabilir. Bu azalma düşük dozlarda ortaya çıkar (198). Çalışmamızda diazepam grubunun en az sayıda şahlanma davranışı göstermesi bu durumla ilişkilendirilebilir. Tımarlanma süresi gruplar arasında bir farklılık oluşturmazken tımarlanma sayısında kakao grupları (K500 ve K1000) arasında bir farklılık görülmüştür ($p<0,05$).

Son olarak açık alan testinde çizgi geçme sayısı değerlendirilmiştir. Çizgi geçme sayısında artış anksiyete benzeri davranışların azaldığını gösterirken aynı zamanda hayvanların genel aktivitesi hakkında bilgi verir (199). En çok sayıda çizgiyi K1000 grubu geçmiş olup bu grupta hareketlilik artışı gözlemlenmiştir. Bu gözlem önceki çalışmalar ile tutarlı sayılabilir (159, 170, 200, 201). K1000 grubunun çizgi geçme sayısında diazepam ve sükroz gruplarına kıyasla anlamlı bir yükseklik gözlenmiştir ($p<0,05$). Gözlemlenen hareketlilik, metilksantinlerden kaynaklı olarak adenosin reseptörlerinin blokajına bağlı bir şekilde gerçekleşmiş olabilir (201). Öte yandan en az sayıda çizgiyi geçen grubunun diazepam grubunun olduğu görülmektedir. Benzodiazepinlerin en sık görülen etkilerinden birinin motor yavaşlama olduğu düşünüldüğünde en az sayıda çizgiyi geçen grubun diazepam grubu olması normal karşılanabilir (109). Bununla birlikte akut BDZ uygulamasının keşif davranışlarını azalttığı gibi çizgi geçme sayısını da azaltabileceği düşünülebilir. Diazepam grubunda rotarod testinde belirgin hareket azalması gözlemlenmemesi bu son düşünceyi destekleyebilir.

Açık alan testine ait tüm bu veriler değerlendirildiğinde K1000 uygulamasının sıçanlarda anksiyete ile ilgili davranışları azalttığı düşünülmektedir. Ancak bu etki K500 grubunda görülmemiştir. Bu durum kakao dozuyla ilişkili olabilir. Bununla birlikte sükroz grubu, kontrol grubuyla karşılaştırıldığında sıçanların davranışlarında anlamlı bir fark ortaya çıkarmazken sükrozun kakaoyla birlikte kullanılmasının

kakaonun anksiyolitik etkisini düşürdüğü yönünde bir çıkarım yapılabilir. Sükrozun etkisini araştıran bir çalışmada 14 gün boyunca günlük sükroz ve sükroz+kafeine erişim sağlanmıştır. Anılan bu çalışmanın açık alan testinin sonuçlarında ise yaptığımız çalışmanın aksine kafein ve sükrozun birlikte kullanılmasıyla anksiyeteye ilişkili davranışların azaldığı görülmüştür. Ancak bizim çalışmamızın sadece tek bir seferlik uygulamaya bağlı akut etkiyi hedeflediği buna karşın söz konusu olan çalışmanın 14 gün uygulama içerdiği dikkate alınmalıdır. Bunun yanında bizim çalışmamıza benzer şekilde sükroz ve kontrol grupları birbirleriyle kıyaslandığında fark görülmediği raporlanmıştır (202).

5.2.2. Yükseltmiş Artı Labirent Testi

Yeni bir çevre ve yükseklik sıçanlarda anksiyete duygusu oluşturur. Bu yüzden sıçanlar açık kollardan kaçınma ve kapalı kollarda daha fazla zaman geçirme eğiliminde olur. Dolayısıyla kapalı kollarda zaman geçirmek yüksek anksiyete düzeyine işaret eder (123). Ayrıca anksiyolitik aktiviteye sahip ilaçlar açık kola giriş sayısını ve açık kolda geçirilen süreyi arttırırken anksiyojenik aktiviteye sahip ilaçlar bu değişkenlerin her ikisini de azaltmaktadır (203). Yükseltmiş artı labirent testi yapılırken 64 hayvan içinden 10 hayvanın açık kollardan düştüğü tespit edilmiştir. Bu hayvanlar testi tamamlayamamış kabul edilmiş ve bu test için verileri değerlendirme harici bırakılmıştır. Test sonuçlarının doğruluğu ve güvenirligi için bu uygulamanın yapılması önerilen bir durumdur (182). Bu yüzden 54 hayvanın verilerine göre istatistiksel değerlendirme yapılmıştır. Yapılan bu çalışma için kullanılan test düzeneğinde hayvanların açık kollardan düşmesini engelleyecek bir bariyer bulunmamaktadır. Dolayısıyla hayvanların düşmesi test düzeneğinin tasarımından kaynaklı gerçekleşmiş olabilir. Bu durumu önlemek amacıyla açık kollara bariyer koyulması yapılacak daha sonraki çalışmalar için tavsiye edilebilir.

Açık kola en fazla K1000 grubunun (n=5) girdiği, en az ise kontrol grubunun (n=8) girdiği gözlemlenmiştir ve iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur ($p < 0,05$). Öte yandan açık kola giriş yüzdesi hesaplandığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark ortaya çıkmamıştır ($p > 0,05$). Açık kolda en fazla süreyi sırasıyla

K500 ve K1000 grubu geçirirken en az süreyi kontrol grubu geçirmiştir. K500 grubu (n=7), kontrol grubuna kıyasla daha fazla açık kolda zaman geçirmiştir ($p<0,05$). Bununla birlikte orantılı bir şekilde açık kolda geçirilen sürenin yüzde hesabında da K500 grubu, kontrol grubuna göre daha yüksek yüzdeye sahiptir ($p<0,05$). Bu sonuçlar kateşinin farklı dozlarda uzun süreli uygulandığı bir çalışmayla benzer çıkmıştır. Açık kola giriş sayısı yüksek dozda kateşin uygulanan grupta görülürken açık kola giriş süresi daha düşük dozdaki grupta görülmüştür (159).

Kakao kullanılarak yapılan ve kakaonun anksiyolitik etkisini gösteren literatürde bulunan tek hayvan çalışmasında T labirent kullanıldığı için parametrelerin karşılaştırılması yapılamamıştır (170). Diğer yandan yükseltilmiş artı labirentin kullanıldığı bizim çalışmamız da kakaonun anksiyete benzeri davranışları azaltabileceği düşüncesini destekler niteliktedir. Açık kolda en fazla süreyi K500 grubu geçirirken açık kola en fazla giriş yapan K1000 grubudur ($p<0,05$). Ayrıca açık kolda geçirilen süre ve sürenin yüzdesinde K500 grubundan sonra K1000 grubunun değerleri gelmektedir. K1000 grubunda labirentten düşmeye bağlı veri kaybının diğer gruplara göre daha fazla olması sonuçların istatistiksel olarak anlamlılığını etkilemiş olabilir.

K500 grubunun bu testte görülen anksiyolitik etkisinin açık alan testinde görülmediğini vurgulamak gerekmektedir. Yapılan her bir anksiyete testi için hayvanların duygusal profilinin sadece bir kısmı hakkında bilgi verdiği yönünde görüşler bulunmaktadır. Yani farklı testler anksiyetenin bir diğer yönünü sunabilir. Çalışmamızda kullanılan anksiyete testlerinin bulgularının bazı farklılıkları bu durumla ilişkili olabilir. Bununla beraber uygulanan farklı anksiyete testlerinin sonuçlarının birbiriyle örtüşmeme durumuna literatürde de rastlanmıştır (195, 204).

K1000 grubuna (n=5), daha önce yapılan ve hazır olarak elde bulunan süre tayini (ön çalışma) çalışmasının 90 dk grubunda yer alan hayvanların verileri (n=3) eklenip herhangi bir değişiklik olup olmadığı incelenmiştir. Ana çalışma sonuçları değerlendirildiğinde K1000 grubunda açık kolda geçirilen sürenin yüzde hesabı istatistiksel anlamlılık oluşturmazken ön çalışma sonuçlarıyla birleştirildiğinde

istatistiksel anlamlılık düzeyine ulaşılmıştır (Şekil 4.8). Bu durum da hayvan sayısının arttırılmasıyla birlikte K1000 uygulamasının anksiyolitik etki üzerinde istatistiksel anlamlılığın ortaya çıkarabileceğini göstermiştir.

Yükseltilmiş artı labirent testinin verilerinde sükrozun etkisine bakıldığında, sükroz grubunda yer alan sıçanlarla kontrol grubunda yer alan sıçanların davranışlarında anlamlı bir fark ortaya çıkmazken sükrozun kakaoyla birlikte kullanılmasının kakaonun anksiyolitik etkisini düşürdüğü söylenebilir. Önceki bir çalışma, kakao gibi antioksidan yönünden zengin olan bal ve sükrozun anksiyete ile ilişkisini araştırmıştır. Bal ve sükroz hayvanların diyetlerine eklenmiştir. Balın anksiyete davranışlarını azalttığı gözlenirken sükrozun bir etki göstermediği ortaya çıkmıştır. Bununla birlikte bal bazlı diyet ne kadar uzun süre uygulanırsa, anksiyetede azalmanın o kadar fazla olduğu görülmüştür (179). Bu da antioksidanlar açısından zengin içeriğe sahip kakaonun diyete eklenmesinin ve uygulanma süresinin arttırılmasının anksiyolitik etkisini arttırabileceğini düşündürmektedir.

Davranış testlerinin sonuçları hakkında genel bir yorumda bulunmak gerekirse kakaonun anksiyeteyle ilişkili davranışları azalttığı fakat sükrozla birlikte uygulandığında anksiyete azaltıcı etkiyi düşürdüğü görülmektedir. Sükrozun anksiyete davranışlarını arttırdığına yönelik az sayıda çalışma bulunmasına rağmen yapılan bu çalışma anksiyete davranışlarını arttırdığı yönde sonuçlar ortaya çıkarmıştır (176). Davranış testlerinin polifenollerin kanda maksimum seviyede olduğu zaman diliminde (yaklaşık 2 saat) veya polifenollerin kanda ilk görüldüğü (30 dk) anda yapılması kakaonun anksiyete davranışları üzerindeki etkilerinin farklı yönlerini ortaya koyabilir. Bununla beraber hayvanların bireysel kaygı düzeyleri ve duygusal strese dirençleri birbirinden farklılık gösterebileceği düşünölmelidir (195). Bu tarz farklılıklar çıkan sonuçları negatif yönde etkileyebilir. Bu olası negatif etkinin azaltılması için daha fazla sayıda hayvanın kullanılması önerilebilir.

5.2.3. Rotarod Testi

Anksiyete testlerinin doğru bir şekilde yorumlanabilmesi için hayvanların motor aktivitesi hakkında fikir sahibi olmak önemlidir. Çünkü hareket sistemindeki

değişimlere bağlı olarak davranışlarda değişiklikler gözlemlenebilir (125). Kakaonun içerisinde adenozin reseptörleri blokajıyla psikomotor uyarımı arttıran metilksantinler olduğu için lokomotor aktivitenin kakaonun miktarına göre artması ya da değişmemesi beklenir (201). Çalışmamızda K500 grubunda yer alan sıçanlar rotarod testi düzeneği üzerinde en az zaman geçiren grup olmuştur ancak kontrol grubuyla karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark ortaya çıkmamıştır. Bununla birlikte diğer kakao gruplarıyla kontrol grubu kıyaslandığında aralarında herhangi bir motor aktivite değişikliği gözlemlenmemiştir. Bu durum anksiyete testlerinde (açık alan testi ve yükseltilmiş artı labirent testi) kakao uygulamasına bağlı olarak anksiyete davranışlarında azalma yönünde görülen etkinin lokomotor aktivitedeki değişime bağlı olmadığını ve daha çok anksiyolitik etkiye bağlı olduğunu düşündürmektedir.

Benzodiazepinlerin motor aktiviteleri yavaşlattığı veya bozduğu bilinmektedir (93, 109, 198). Bu yüzden diazepam grubunun düzenekte en az zamanı geçirmesi beklenmiştir. Ancak diğer gruplarla arasında istatistiksel olarak bir fark ortaya çıkmamıştır ($p>0,05$). Böylelikle tüm bu sonuçlarla motor aktiviteye (motor koordinasyon) bağlı olarak davranışsal testlerdeki performansın etkilenmediği yönünde yorum yapılabilir.

5.3. Hipokampüs GABA Seviyeleri

GABA, kemirgenlerde anksiyete ile ilgili davranışların ana düzenleyicisi olarak kabul edilmektedir (197). Anksiyete bozukluğunda GABA konsantrasyonunun azaldığını bildiren çalışmalar mevcuttur (205). Benzodiazepinlerin akut uygulamasının GABA miktarlarını arttırarak veya azaltarak etki gösterdiğine ilişkin çalışmalar literatürde mevcuttur ancak etki mekanizması hala belirsizliğini korumaktadır (206, 207). Yapılan bir çalışma, düşük hipokampal GABA seviyesini artan stres davranışlarıyla ilişkilendirmektedir (197). Bu doğrultuda yüksek hipokampal GABA seviyesini azalan anksiyete düzeyiyle ilişkilendirmek mümkündür.

Bu çalışmada diazepam grubunda yer alan sıçanların GABA miktarları, tween80 ve kontrol grubundaki sıçanlarla birlikte düşük seviyede izlenmiştir. Sadece

kakaonun verildiği grupta GABA miktarı diazepam, kontrol ve tween80 gruplarına göre yüksek seviyede seyretmekle birlikte istatistiksel olarak anlamlı bir sonuç ortaya çıkmamıştır. İlginç bir şekilde kakao ve sükrozun birlikte verildiği gruplarda GABA miktarının arttığı görülmüştür. K500+S'nin kontrol, diazepam ve tween80 grupları ile arasındaki ilişki istatistiksel olarak anlamlı çıkarken K1000+S grubunun sadece tween80 ile arasındaki ilişki istatistiksel olarak anlamlıdır ($p<0,05$).

Literatür tarandığında sükrozun daha çok dopaminerjik sistemler üzerinden etkisini gösterdiği gözlemlenmiştir. Bu yüzden kakaoyla birlikte sükrozun verildiği durumlarda kakaonun var olan etkisinin değişmemesi beklenen bir durumdur. Literatürde sükrozun veya şekerin GABA ile ilişkisini araştıran çalışmaların sayısı oldukça azdır. Bu çalışmalardan birinde sıçanlara 3 hafta boyunca fruktoz yönünden zengin bir diyet uygulanmıştır. Çalışmanın sonucunda beyin GABA seviyelerinin değişmediği gözlemlenmiştir (208). Bununla birlikte bazı polifenollerin GABA_A reseptörleri üzerinden etki gösterdiği bilinmektedir (156, 157). Kakaonun da etki etme mekanizmasının GABA_A üzerinden olması olasıdır. Bu yüzden sükroz ve kakaonun birlikte uygulandığı gruplarda ortaya çıkan GABA artışını kakaoyla ilişkilendirilebilir.

5.4. Hipokampüs Serotonin Seviyeleri

Serotonin seviyesindeki azalmanın anksiyete ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir (209). Anksiyolitik ilaçların bir kısmı serotonerjik iletimi ve serotonin miktarını arttırmayı hedefler (106, 107). Artan serotonin miktarı, hipokampüs dahil olmak üzere farklı beyin bölgelerinde gözlemlenebilir (210).

Düzenli kakao tüketiminin beyindeki serotonin konsantrasyonlarını arttırdığı literatürde bildirilmiştir. Bunun yanı sıra akut kakao tüketiminde serotonin konsantrasyonunda bir değişim gözlemlenmemiştir (170). Yapılan bu çalışmada en yüksek serotonin miktarı diazepam grubunda görülmüştür. Bunu takiben sükroz ve K1000 gruplarında serotonin miktarı yüksek düzeyde saptanmıştır. En düşük serotonin miktarı ise K500 grubunda görülmüştür. Diazepam, sükroz ve K1000 gruplarının serotonin miktarı K500'e göre daha yüksek bulunmuştur ($p<0,05$). Ancak

tüm bu grupların (diazepam, sükroz, K1000, K500) kontrolle kıyaslandığı durumda anlamlı bir farkın ortaya çıkmadığını belirtmek gereklidir ($p>0,05$).

Flavonoidlerin etkisini araştıran bir çalışma, artan flavonoid dozlarında serotonin miktarında artış görüldüğünü raporlamıştır. Fakat bu etki uzun süreli kullanım sonucu ortaya çıkmıştır (211). Bizim çalışmamızın sonuçlarıyla birlikte bahsi geçen bu çalışmanın bulguları serotonin artışının akut kullanımdan ziyade uzun süreli kullanıma bağlı olarak ortaya çıkabileceğini düşündürebilir.

Kakao ve sükroz birlikte kullanıldığında serotonin miktarında istatistiksel olarak anlamlı bir değişim görülmemiştir. Bu da sükrozun serotonin miktarına yönelik etkisinin herhangi bir değişkenlik oluşturmadığı yönde olduğunu gösterebilir.

5.5. Hipokampüs Noradrenalin Seviyeleri

Anksiyeteli bireylerde *locus coeruleus* bölgesinde aktivite artışıyla birlikte noradrenalin seviyelerinde artış görüldüğü bildirilmiştir (212). Kakaonun hem tek doz hem de uzun süreli olarak uygulandığı bir çalışma, NA seviyesini değiştirmedini ortaya koymuştur (170). Yaptığımız bu çalışmanın sonuçları benzer şekilde çıkararak bu görüşü destekler niteliktedir.

5.6. Kan Serum Parametreleri

Performans kaygısı gibi akut anksiyete durumlarında, kortizol miktarı yükselirken kronik anksiyete bozukluklarında kortizol miktarı düşer (88). Benzodiazepinler, akut uygulamayı takiben kortizol salınımını azaltır (213). Yapılan bu çalışmada serum kortizol miktarı değerlendirildiğinde literatürle uyumlu olarak diazepam grubunun kortizol miktarı diğer gruplara oranla daha düşük seviyede bulunmuştur. Diazepam grubunun kortizol seviyesi K1000, K500 ve kontrol gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük düzeydedir ($p<0,05$). Önceki çalışmalar uzun süreli kakao tüketiminin ya da kakaonun diyetle eklenmesinin kortizol miktarını düşürdüğünü ve bunu da 11β -hidroksisteroid dehidrogenaz enziminin inhibe edilmesi sonucunda ortaya çıkabileceğine dikkat çekmiştir (158, 214). Ancak kakaonun tek seferlik kullanımında kortizol miktarıyla ilişkisini araştıran bir çalışmaya

rastlanmamakla birlikte yaptığımız çalışma da tek doz kakaonun kortizol miktarı üzerinde bir farklılık ortaya çıkarmamıştır.

Sükrozun uzun süreli kullanımının kortizol miktarını düşürdüğüne yönelik çalışmalar literatürde mevcuttur (174, 175). Yapılan bu çalışma, sükrozun tek doz kullanımı sonrasında kortizol miktarının düşük seviyelerde olduğunu göstermektedir. Ancak bu sonuç istatistiksel olarak anlamlı değildir. Bununla birlikte sükroz ve kakaonun birlikte kullanılmasının kortizol salınım düzeyini azalttığı gözlemlenmiştir. K1000+S grubunun kortizol miktarı K500 ve kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde düşük seviyede bulunurken K500+S grubunun kortizol miktarı ise kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı olmasa dahi daha düşük seviyede bulunmuştur. Bu etki sükrozun varlığıyla ilişkilendirilebilir. Ayrıca kakao miktarının artışının artan polifenol miktarıyla orantılı olarak bu etkiyi güçlendirebileceği varsayılabilir.

Akut kakao uygulamasının 500 ve 1000 mg/kg doz olarak verilmesinin karaciğer ve böbrek fonksiyonlarını bozmaması beklenilmiştir. Yaptığımız çalışmada beklenildiği gibi uygulanan dozlarda herhangi bir toksik etki görülmemiştir.

Kakaonun uzun süreli kullanımında lipit profilini iyileştirdiği ve glikoz seviyesini düşürdüğü bilinmektedir (215, 216). Total kolesterolü ve düşük yoğunluklu lipoproteini (LDL) azalttığı raporlanırken trigliserid ve yüksek yoğunluklu lipoproteini (HDL) etkilemediği gözlemlenmiştir (215). Yapılan bir çalışmada Tip 2 diyabetli bireylerin akut kakao takviyesi sonrasında toplam kolesterol ve trigliserid seviyelerinde herhangi bir değişim görülmezken HDL seviyesinde artış gözlemlenmiştir (217). Yaptığımız çalışma sağlıklı denekleri içeren hayvan çalışması olmasıyla beraber benzer şekilde total kolesterol ve trigliserid seviyelerinde gruplar arasında bir fark görülmemiştir. Bunun yanı sıra glikoz seviyesi incelendiğinde yine gruplar arasında anlamlı bir değişim ortaya çıkmamıştır.

Hem kakaonun hem şekerin anksiyete mekanizması üzerine literatürde az sayıda çalışmaya rastlanmıştır. Bununla birlikte daha önce yapılan sükroz çalışmalarının sonuçları değişkenlik göstermektedir. Bu durum da esas olarak etkisini araştırdığımız kakaonun sonuçlarını yorumlamayı zorlaştırmaktadır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

- Kakao uygulaması sıçanlarda doz farkına göre davranış testlerinde farklı sonuçlar ortaya çıkarmıştır. Bununla birlikte genel olarak anksiyeteye ilişkili davranış parametrelerindeki değişimler dikkate alındığında kakaonun anksiyete davranışlarını azalttığı söylenebilir. Sükrozla birlikte uygulandığında ise bu etkinin kaybolduğu gözlemlenmiştir.
- Kakao, GABA miktarları üzerinde bir etki oluşturmamıştır. Sükrozla birlikte uygulandığında kakao GABA üzerindeki yükseltici etki göstermiştir.
- Kakao ve kakaoyla birlikte sükroz uygulaması serotonin ve noradrenalin miktarını değiştirmemiştir.
- Kakao, kortizol miktarları üzerinde herhangi bir farklılık ortaya çıkarmamıştır. Ancak kakao ve sükroz birlikte kullanıldığında kortizol miktarı azalmıştır.
- Akut kakao uygulaması karaciğer ve böbrek fonksiyonları üzerinde herhangi bir değişiklik yapmamıştır. Ayrıca kan glikozu, total kolesterol ve trigliserid seviyelerini de değiştirmemiştir.

Kakaonun akut anksiyolitik etkilerinin doza bağımlılığını, etki süresini ve kesin etki mekanizmasını ortaya çıkarabilmek için daha fazla çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır.

Kakao birçok farklı bileşeni barındıran bir maddedir. İçeriğinde bulunan maddelerin kana karışma süreleri farklılık göstermektedir ve bu maddelerden hangisi ya da hangilerinin anksiyete mekanizmasını etkilediği net olarak bilinmemektedir. İçeriğinde bulunan kafeinin dozuna göre hem anksiyojenik hem anksiyolitik etkisi varken polifenollerin anksiyolitik etki oluşturduğu düşünülmektedir. Yani bu iki etken madde birbirine zıt çalışabilir veya birbirinin etkisini büyütebilir. Bu yüzden kakaodan elde edilen çeşitli biyoaktif maddelerle birlikte kakaonun daha detaylı şekilde araştırılması literatüre katkı sağlayacaktır.

7. KAYNAKLAR

1. Penninx BW, Pine DS, Holmes EA, Reif A. Anxiety disorders. *Lancet*. 2021; 397(10277): 914-927.
2. Cartwright-Hatton S, McNicol K, Doubleday E. Anxiety in a neglected population: Prevalence of anxiety disorders in pre-adolescent children. *Clin Psychol Rev*. 2006; 26(7): 817-833.
3. Michael T, Zetsche U, Margraf J. Epidemiology of anxiety disorders. *Psychiatry*. 2007; 6(4): 136-142.
4. Baldwin DS, Huneke NTM. Treatment of Anxiety Disorders. Geddes JR, Andreasen NC, Goodwin GM, editors. *New Oxford Textbook of Psychiatry*. 3rd ed. Oxford: Oxford University Press; 2020.
5. Mendlowicz MV, Stein MB. Quality of Life in Individuals with Anxiety Disorders. *Am J Psychiatry*. 2000; 157 (5): 669-682.
6. Rapaport MH, Clary C, Fayyad R, Endicott J. Quality-of-life impairment in depressive and anxiety disorders. *Am J Psychiatry*. 2005; 162(6): 1171-1178.
7. Barrera TL, Norton PJ. (2009). Quality of life impairment in generalized anxiety disorder, social phobia, and panic disorder. *J Anxiety Disord*. 2009; 23(8): 1086-1090.
8. Meier SM, Mattheisen M, Mors O, Mortensen PB, Laursen TM, Penninx BW. Increased mortality among people with anxiety disorders: total population study. *Br J Psychiatry*. 2016; 209 (3): 216-221.
9. Chisholm D, Sweeny K, Sheehan P, Rasmussen B, Smit F, Cuijpers P, et al. Scaling-up treatment of depression and anxiety: a global return on investment analysis. *Lancet Psychiatry*. 2016; 3: 415-424.
10. 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. *Epidemiol Psychiatr Sci*. 2021; 30: e36.
11. WHO. Depression and Other Common Mental Disorders: Global Health Estimates. Geneva: World Health Organization; 2017.
12. Garakani A, Murrrough JW, Freire RC, Thom RP, Larkin K, Buono FD, et al. Pharmacotherapy of anxiety disorders: current and emerging treatment options. *Front Psychiatry*. 2020; 11: 595584.
13. Ko YH, Kim SK, Lee SY, Jang CG. Flavonoids as therapeutic candidates for emotional disorders such as anxiety and depression. *Arch Pharm Res*. 2020; 43: 1128-1143.
14. Bandelow B. Current and Novel Psychopharmacological Drugs for Anxiety Disorders. In: Kim Y-K, (eds). *Anxiety Disorders: Advances in Experimental Medicine and Biology*, vol 1191. Singapore: Springer; 2020.
15. Del Prete M, Samoggia A. Chocolate consumption and purchasing behaviour review: Research Issues and Insights for Future Research. *Sustainability*. 2020; 12(14): 5586.

16. Bickel Haase T, Schweiggert-Weisz U, Ortner E, Zorn H, Naumann S. Aroma Properties of Cocoa Fruit Pulp from Different Origins. *Molecules*. 2021; 26(24): 7618.
17. Aprotosoai AC, Luca SV, Miron A. Flavor chemistry of cocoa and cocoa products—an overview. *Compr Rev Food Sci Food Saf*. 2016; 15(1): 73-91.
18. Sheludiakova A, Rooney K, Boakes RA. Metabolic and behavioural effects of sucrose and fructose/glucose drinks in the rat. *Eur J Nutr*. 2012; 51: 445–454.
19. Kending MD. Cognitive and behavioural effects of sugar consumption in rodents. A review. *Appetite*. 2014; 80: 41-54.
20. Sadock BJ, Sadock VA, Ruiz P. Anxiety Disorders. Pataki CS, Sussman N, editors. *Synopsis Of Psychiatry: Behavioral Sciences/Clinical Psychiatry*. 11th ed. Philadelphia: Wolters Kluwer; 2015.
21. Wittchen HA, Baum KB. Epidemiology of anxiety disorders. Geddes JR, Andreasen NC, Goodwin GM, editors. *New Oxford Textbook of Psychiatry*. 3rd ed. Oxford: Oxford University Press; 2020.
22. Crocq MA. A history of anxiety: from Hippocrates to DSM. *Dialogues Clin Neurosci*. 2015; 17(3): 319-325.
23. Horwitz AV. Classical Anxiety. Rosenberg CE, editor. *Anxiety: A Short History*. Baltimore: The Johns Hopkins University Press; 2013.
24. Noyes R, Hoehn-Saric R. The Anxiety Disorders. New York: Cambridge University Press; 1998. Chapter 1, Normal anxiety and fear: psychological and biological aspects; p.1-36.
25. Cooper R. What is wrong with the DSM. *History of Psychiatry*. 2004; 15(1): 5-25.
26. American Psychiatric Association. *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*, 5th ed. Arlington VA: American Psychiatric Association; 2013. p.189-233.
27. Steimer T. The biology of fear- and anxiety-related behaviors. *Dialogues Clin Neurosci*. 2002; 4(3): 231-249.
28. Hoffman KL. Modeling neuropsychiatric disorders in laboratory animals. Woodhead Publishing; 2015. Chapter 3, Modeling disorders of fear and anxiety in animals; p.87-159.
29. Stein MB, Sareen J. Anxiety Disorders. Roberts LA, editor. *The American Psychiatric Association Publishing Textbook of Psychiatry*. 7th ed. Washington, DC: American Psychiatric Association Publishing; 2019.
30. Bandelow B, Michaelis S. Epidemiology of anxiety disorders in the 21st century. *Dialogues Clin Neurosci*. 2015; 17(3): 327-335.
31. Kupfer DJ. Anxiety and DSM-5. *Dialogues Clin Neurosci*. 2015; 17(3): 245–246.
32. Agoraphobia [Internet]. 2022 [Erişim tarihi 17 Şubat 2023]. Erişim adresi: <https://dictionary.apa.org/agoraphobia>.
33. Hoehn-Saric R. Psychic and somatic anxiety: worries, somatic symptoms and physiological changes. *Acta Psychiatr Scand*. 1998; 98(s393): 32-38.
34. Anxiety [Internet]. 2022 [Erişim tarihi 13 Temmuz 2022]. Erişim adresi: <https://dictionary.apa.org/anxiety>.

35. Anksiyete. Işık E, Uzbay T, editörler. Güncel Temel ve Klinik Psikofarmakoloji. Ankara: Golden Medya; 2009.
36. Anxiety disorder [Internet]. 2022 [Erişim tarihi 13 Temmuz 2022]. Erişim adresi: <https://dictionary.apa.org/anxiety-disorder>.
37. Stein DJ, Scott KM, de Jonge P, Kessler RC. Epidemiology of anxiety disorders: from surveys to nosology and back. *Dialogues Clin Neurosci*. 2017; 19(2): 127–136.
38. Ströhle A, Gensichen J, Domschke K. The Diagnosis and Treatment of Anxiety Disorders. *Dtsch Arztebl Int*. 2018; 115(37): 611–620.
39. Noyes R, Hoehn-Saric R. The Anxiety Disorders. New York: Cambridge University Press; 1998. Chapter 2, Generalized anxiety disorder; p.37-85.
40. McLean CP, Asnaani A, Litz BT, Hofmann SG. Gender differences in anxiety disorders: Prevalence, course of illness, comorbidity and burden of illness. *J Psychiatr Res*. 2011; 45(8): 1027-1035.
41. Stein MB, Kean YM. Disability and Quality of Life in Social Phobia: Epidemiologic Findings. *Am J Psychiatry*. 2000; 157(10): 1606-1613.
42. Garakani A, Freire RC, Murrugh JW. Editorial: Pharmacotherapy of Anxiety Disorders: Promises and Pitfalls. *Front Psychiatry*. 2021; 12: 662963.
43. Calhoun GG, Tye KM. Resolving the neural circuits of anxiety. *Nat Neurosci*. 2015; 18(10): 1394-1404.
44. Kim J, Gorman J. The psychobiology of anxiety. *Clin Neurosci Res*. 2005; 4: 335–347.
45. Rajmohan V, Mohandas E. The limbic system. *Indian J Psychiatry*. 2007;49(2): 132–139.
46. Rosen JB, Schulkin J. From normal fear to pathological anxiety. *Psychol Rev*. 1998; 105(2): 325-350.
47. Kim MJ, Loucks RA, Palmer AL, Brown AC, Solomon KM, Marchante AN, et al. The structural and functional connectivity of the amygdala: From normal emotion to pathological anxiety. *Behav Brain Res*. 2011; 223(2): 403-410.
48. Boehme S, Ritter V, Tefikow S, Stangier U, Strauss B, Miltner WHR, et al. Brain activation during anticipatory anxiety in social anxiety disorder. *Soc Cogn Affect Neurosci*. 2014; 9(9): 1413–1418.
49. Ehrlich I, Humeau Y, Grenier F, Ciochi S, Herry C, & Lüthi A. Amygdala inhibitory circuits and the control of fear memory. *Neuron*. 2009; 62(6): 757-771.
50. Tovote P, Fadok JP, Lüthi A: Neuronal circuits for fear and anxiety. *Nat Rev Neurosci* 2015; 16: 317-331.
51. Jie F, Yin G, Yang W, Yang M, Gao S, Lv J, et al. Stress in regulation of GABA amygdala system and relevance to neuropsychiatric diseases. *Front Neurosci*. 2018; 12: 562.
52. Babaev O, Piletti Chatain C, Krueger-Burg D. Inhibition in the amygdala anxiety circuitry. *Exp Mol Med*. 2018; 50: 1-16.
53. Nuss P. Anxiety disorders and GABA neurotransmission: a disturbance of modulation. *Neuropsychiatr Dis Treat*. 2015; 11: 165–175.

54. LeDoux JE, Pine DS. Using Neuroscience to Help Understand Fear and Anxiety: A Two-System Framework. *Am J Psychiatry*. 2016; 173: 1083-1093.
55. Lezak KR, Missig G, Carlezon WA Jr. Behavioral methods to study anxiety in rodents. *Dialogues Clin Neurosci*. 2017; 19(2): 181–191
56. Xie S, Zhang X, Cheng W, Yang Z. Adolescent anxiety disorders and the developing brain: comparing neuroimaging findings in adolescents and adults. *Gen Psychiatr*. 2021; 34(4): e100411.
57. Forster GL, Novick AM, Scholl, Watt MJ. The Role of the Amygdala in Anxiety Disorders. Ferry B, editor. *The Amygdala- a Discrete Multitasking Manager*. Rijeka, Croatia: InTech; 2012.
58. Paulus MP, Feinstein JS, Castillo G, Simmons AN, Stein MB. Dose-Dependent Decrease of Activation in Bilateral Amygdala and Insula by Lorazepam During Emotion Processing. *Arch Gen Psychiatry*. 2005; 62(3) :282-288.
59. Fogwe LA, Reddy V, Mesfin FB. *Neuroanatomy, Hippocampus*. StatPearls Publishing, Treasure Island (FL). 2018.
60. İzci Y, Erbaş YC. Hipokampus: Yapısı ve Fonksiyonları. *Türk Nöroşir Derg*. 2015;25(3):287-295.
61. Fanselow MS, Dong HW. Are the Dorsal and Ventral Hippocampus Functionally Distinct Structures. *Neuron*. 2010;65(1):7-19.
62. Bannerman DM, Rawlins JNP, McHugh SB, Deacon RM, Yee BK, Bast T et al. Regional dissociations within the hippocampus—memory and anxiety. *Neurosci Biobehav Rev*. 2004;28(3):273-283.
63. Goosens KA. Hippocampal regulation of aversive memories. *Curr Opin Neurobiol*. 2011;21(3):460-466.
64. Adhikari A, Topiwala MA, Gordon JA. Synchronized Activity between the Ventral Hippocampus and the Medial Prefrontal Cortex during Anxiety. *Neuron*. 2010; 65(2): 257-269.
65. Felix-Ortiz AC, Beyeler A, Seo C, Leppla CA, Wildes CP, Tye KM. BLA to vHPC Inputs Modulate Anxiety-Related Behaviors. *Neuron*. 2013;79(4):658-664.
66. Ghasemi M, Navidhamidi M, Rezaei F, Azizikia A, Mehranfard N. Anxiety and hippocampal neuronal activity: Relationship and potential mechanisms. *Cogn Affect Behav Neurosci*. 2022; 22: 431–449.
67. Diniz DM, Calabrese F, Brivio P, Riva MA, Grandjean J, Homberg JR. BDNF Overexpression in the Ventral Hippocampus Promotes Antidepressant- and Anxiolytic-Like Activity in Serotonin Transporter Knockout Rats. *Int J Mol Sci*. 2021; 22(9):5040.
68. Miller BR, Hen R. The current state of the neurogenic theory of depression and anxiety. *Curr Opin Neurobiol*. 2015;30: 51–58.
69. Shiba Y, Santangelo AM, Roberts AC. Beyond the medial regions of prefrontal cortex in the regulation of fear and anxiety. 2016; *Front Syst Neurosci*. 2016; 10: 12.
70. Ishikawa A, Nakamura S. Convergence and Interaction of Hippocampal and Amygdalar Projections within the Prefrontal Cortex in the Rat. *J Neurosci*. 2003; 23 (31): 9987-9995.

71. Davidson RJ. Anxiety and affective style: role of prefrontal cortex and amygdala. *Biol Psychiatry*. 2002; 51(1): 68-80.
72. Nejati V, Majdi R, Salehinejad MA, Nitsche MA. The role of dorsolateral and ventromedial prefrontal cortex in the processing of emotional dimensions. *Sci Rep*. 2021; 11: 1971.
73. Aupperle RL, Paulus MP. Neural systems underlying approach and avoidance in anxiety disorders. *Dialogues Clin Neurosci*. 2010; 12; 517–531.
74. Felix-Ortiz AC, Burgos-Robles A, Bhagat ND, Leppla CA, Tye KM. Bidirectional modulation of anxiety-related and social behaviors by amygdala projections to the medial prefrontal cortex. *Neuroscience*. 2016; 321: 197-209.
75. Ishikawa A, Nakamura S. Ventral hippocampal neurons project axons simultaneously to the medial prefrontal cortex and amygdala in the rat. *J Neurosci*. 2006; 96(4): 2134-2138.
76. Padilla-Coreano N, Bolkan SS, Pierce GM, Blackman DR, Hardin WD, Garcia-Garcia AL, et al. Direct Ventral Hippocampal-Prefrontal Input Is Required for Anxiety-Related Neural Activity and Behavior. *Neuron*. 2016; 89(4): 857-866.
77. Daviu N, Bruchas MR, Moghaddam B, Sandi C, Beyeler A. (2019). Neurobiological links between stress and anxiety. *Neurobiol Stress*. 2019; 11: e100191.
78. Lago T, Davis A, Grillon C, Ernst M. Striatum on the anxiety map: Small detours into adolescence. *Brain Res*. 2017; 1654: 177-184.
79. Porter JN, Roy AK, Benson B, Carlisi C, Collins PF, Leibenluft E, et al. Age-related changes in the intrinsic functional connectivity of the human ventral vs. dorsal striatum from childhood to middle age. *Dev Cogn Neurosci*. 2015; 11: 83–95.
80. Leisman G, Melillo R. The basal ganglia: motor and cognitive relationships in a clinical neurobehavioral context. *Rev Neurosci*. 2013; 24(1): 9-25.
81. Tafet GE, Nemeroff CB. Pharmacological treatment of anxiety disorders: the role of the HPA axis. *Frontiers in psychiatry*. 2020; 11: 443.
82. Kirschbaum C, Hellhammer DH. Salivary cortisol in psychoneuroendocrine research: recent developments and applications. *Psychoneuroendocrinology*. 1994; 19(4):313-333.
83. Liu D, Hu H, Hong Y, Xiao Q, Tu J. Sugar Beverage Habitation Relieves Chronic Stress-Induced Anxiety-like Behavior but Elicits Compulsive Eating Phenotype via vLSG^{AD2} Neurons. *Int J Mol Sci*. 2023; 24(1):661.
84. Smith SM, Vale WW. The role of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in neuroendocrine responses to stress. *Dialogues Clin Neurosci*. 2006; 8(4): 383-395.
85. Faravelli C, Lo Sauro C, Lelli L, Pietrini F, Lazzeretti L, Godini L, et al. The Role of Life Events and HPA Axis in Anxiety Disorders: A Review. *Curr Pharm Des*. 2012; 18: 5663–5674.
86. Jacques A, Chaaya N, Beecher K, Ali SA, Belmer A, Bartlett S. The impact of sugar consumption on stress driven, emotional and addictive behaviors. *Neurosci Biobehav Rev*. 2019; 103: 178–199.

87. Łoś K, Waszkiewicz N. Biological Markers in Anxiety Disorders. *J Clin Med*. 2021; 10(8): 1744.
88. Hek K, Direk N, Newson RS, Hofman A, Hoogendijk WJ, Mulder CL, et al. Anxiety disorders and salivary cortisol levels in older adults: a population-based study. *Psychoneuroendocrinology* 2013; 38(2): 300–305.
89. Jazvinscak Jembrek M, Vlainic J. GABA receptors: pharmacological potential and pitfalls. *Curr Pharm Des*. 2015; 21(34): 4943-4959.
90. Watanabe M, Maemura K, Kanbara K, Tamayama T, Hayasaki H. GABA and GABA receptors in the central nervous system and other organs. *Int Rev Cytol*. 2002; 213: 1-47.
91. Roy-Byrne PP. The GABA-benzodiazepine receptor complex: structure, function, and role in anxiety. *J Clin Psychiatry*. 2005; 66(Suppl 2): 14-20.
92. Freitas-Ferrari MC, Hallak JE, Trzesniak C, Filho AS, Machado-de-Sousa JP, Chagas MHN, et al. Neuroimaging in social anxiety disorder: a systematic review of the literature. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2010; 34(4): 565–580.
93. Griffin CE, Kaye AM, Bueno FR, Kaye AD. Benzodiazepine pharmacology and central nervous system-mediated effects. *Ochsner J*. 2013; 13(2): 214-223.
94. Durant C, Christmas D, Nutt D. The pharmacology of anxiety. Stein M, Steckler T, editors. *Behavioral Neurobiology of Anxiety and Its Treatment. Current Topics in Behavioral Neurosciences*, vol 2. Berlin, Heidelberg: Springer; 2009.
95. Berger M, Gray JA, Roth BL. The expanded biology of serotonin. *Annu Rev Med*. 2009; 60: 355.
96. Asan E, Steinke M, Lesch KP. Serotonergic innervation of the amygdala: targets, receptors, and implications for stress and anxiety. *Histochem Cell Biol*. 2013; 139: 785-813.
97. Zangrossi JrH, Graeff FG. Serotonin in anxiety and panic: contributions of the elevated T-maze. *Neurosci Biobehav Rev*. 2014; 46: 397-406.
98. Taciak PP, Lysenko N, Mazurek AP. Drugs which influence serotonin transporter and serotonergic receptors: pharmacological and clinical properties in the treatment of depression. *Pharmacol Rep*. 2018; 70(1): 37-46.
99. Gordon JA, Hen R. The Serotonergic System and Anxiety. *Neuromol Med*. 2004; 5 (1): 27-40.
100. Benarroch EE. Locus coeruleus. *Cell Tissue Res*. 2018; 373: 221-232.
101. Terbeck S, Savulescu J, Chesterman LP, Cowen PJ. Noradrenaline effects on social behaviour, intergroup relations, and moral decisions. *Neurosci Behav Rev*. 2016; 66: 54–60.
102. Bystritsky A, Khalsa SS, Cameron ME, Schiffman J. Current diagnosis and treatment of anxiety disorders. *P & T*. 2013; 38(1): 30–57.
103. Tanaka M, Yoshida M, Emoto H, Ishii H. (2000). Noradrenaline systems in the hypothalamus, amygdala and locus coeruleus are involved in the provocation of anxiety: basic studies. *Eur J Pharmacol*. 2000; 405(1-3): 397–406.

104. Montoya A, Bruins R, Katzman MA, Blier P. The noradrenergic paradox: implications in the management of depression and anxiety. *Neuropsychiatr Dis Treat.* 2016; 12; 541-557.
105. Bandelow B. Current and Novel Psychopharmacological Drugs for Anxiety Disorders. *Adv Exp Med Biol.* 2020; 1191: 347-365.
106. Koen N, Stein DJ. Pharmacotherapy of anxiety disorders: a critical review. *Dialogues Clin Neurosci.* 2011; 13(4): 423-437.
107. Baldwin DS. Serotonin noradrenaline reuptake inhibitors: A new generation of treatment for anxiety disorders. *Int J Psychiatry Clin Pract.* 2006; 10: 12-15.
108. Soyka M. Treatment of benzodiazepine dependence. *N Engl J Med.* 2017; 376: 1147–1157.
109. Bandelow B. Role of Benzodiazepines in Anxiety Disorders. Kim Y-K, editor. *Anxiety Disorders: Advances in Experimental Medicine and Biology*, vol 1191. Singapore: Springer; 2020.
110. Repova K, Aziriova S, Krajcovicova K, Simko F. Cardiovascular therapeutics: A new potential for anxiety treatment?. *Medicinal Research Reviews.* 2022; 42(3): 1202-1245.
111. Schneier FR. Pharmacotherapy of social anxiety disorder. *Expert Opinion on Pharmacotherapy.* 2011; 12(4): 615-625.
112. MacCormack JK, Armstrong-Carter EL, Gaudier-Diaz MM, Meltzer-Brody S, Sloan EK, Lindquist KA, et al. β -Adrenergic Contributions to Emotion and Physiology During an Acute Psychosocial Stressor. *Psychosom Med.* 2021; 83(9): 959-968.
113. Riebe CJ, Wotjak CT. A Practical Guide to Evaluating Anxiety-Related Behavior in Rodents. Szallasi A, Bíró T, editors. *TRP Channels in Drug Discovery. Methods in Pharmacology and Toxicology*, vol 2. Totowa, NJ: Humana Press; 2012.
114. Ennaceur A. Tests of unconditioned anxiety — Pitfalls and disappointments. *Physiol Behav.* 2014; 135: 55-71.
115. Ohl F. Testing for anxiety. *Clin Neurosci Res.* 2003; 3(4-5): 233-238.
116. Çalışkan H, Fırat A, Zaloğlu N. Şartsız Hayvan Anksiyete Testleri. *Ankara Sağlık Hizmetleri Dergisi.* 2017; 16(1): 35-40.
117. Koç A, Görmüş ZI. Deney hayvanlarında anksiyete çalışmaları. *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi.* 2018; 11(2): 51-57.
118. Gould TD, Dao DT, Kovacsics CE. The Open Field Test. Gould TD, editor. *Mood and Anxiety Related Phenotypes in Mice. Neuromethods*, vol 42. Totowa, NJ: Humana Press; 2009.
119. Takahashi LK, Kalin NH, Vanden Burgt JA, Sherman JE. Corticotropin-releasing factor modulates defensive-withdrawal and exploratory behavior in rats. *Behav Neurosci.* 1989; 103(3): 648-654.
120. Dawson GR, Tricklebank MD. Use of the elevated plus maze in the search for novel anxiolytic agents. *Trends Pharmacol Sci.* 1995; 16(2): 33-36.
121. Kumar V, Bhat ZA, Kumar D. Animal models of anxiety: A comprehensive review. *J Pharmacol Toxicol Methods.* 2013; 68(2): 175-183.

122. Hogg S. A review of the validity and variability of the elevated plus-maze as an animal model of anxiety. *Pharmacol Biochem Behav.* 1996; 54(1): 21-30.
123. Sharma S, Pandey J, Jain S, Singh V. Examining Anxiety and Risk-taking in Healthy Male and Female Wistar Rats using Spatial and Temporal Analysis of Elevated Plus Maze. *bioRxiv.* 2022; 202211.
124. Blanchard RJ, Blanchard DC, Griebel G, Nutt D, editors. *Handbook of Fear and Anxiety.* Amsterdam: Academic Press, Elsevier; 2008. p.81-99.
125. Ramos A. Animal models of anxiety: do I need multiple tests. *Trends Pharmacol Sci.* 2008; 29(10): 493-498.
126. Crawley J, Goodwin FK. Preliminary report of a simple animal behavior model for the anxiolytic effects of benzodiazepines. *Pharmacol Biochem Behav.* 1980; 13(2): 167-170.
127. Ellam S, Williamson G. Cocoa and Human Health. *Annu Rev Nutr.* 2013; 33(1): 105-28.
128. Verna R. The history and science of chocolate. *Malaysian J Pathol.* 2013; 35(2): 111-121.
129. Scapagnini G, Davinelli S, Di Renzo L, De Lorenzo A, Olarte HH, Micali G, et al. Cocoa bioactive compounds: significance and potential for the maintenance of skin health. *Nutrients.* 2014; 6(8): 3202-3213.
130. Soares TF, Oliveira M. Cocoa By-Products: Characterization of Bioactive Compounds and Beneficial Health Effects. *Molecules.* 2022; 27(5): 1625.
131. Tan T, Lim XY, Yeo J, Lee S, Lai NM. The Health Effects of Chocolate and Cocoa: A Systematic Review. *Nutrients.* 2021; 13(9): 2909.
132. Özkan M. Çikolatada kakao oranı en az yüzde 35 olmalı [Internet]. 2020 [Erişim Tarihi 1 Eylül 2022]. Erişim adresi: <http://www.turktarim.gov.tr/Haber/406/cikolatada-kakao-orani-en-az-yuzde-35>
133. Valverde García D, Pérez Esteve É, Barat Baviera JM. Changes in cocoa properties induced by the alkalization process: A review. *Compr Rev Food Sci Food Saf.* 2020; 19(4): 2200-2221.
134. Rawel HM, Huschek G, Sagu ST, Homann T. Cocoa Bean Proteins-Characterization, Changes and Modifications due to Ripening and Post-Harvest Processing. *Nutrients.* 2019; 11(2): 428.
135. Wickramasuriya AM, Dunwell JM. Cacao biotechnology: current status and future prospects. *Plant biotechnology journal.* 2018; 16(1): 4-17.
136. Quelal-Vásconez MA, Lerma-García MJ, Pérez-Esteve É, Talens P, Barat JM. Roadmap of cocoa quality and authenticity control in the industry: A review of conventional and alternative methods. *Compr Rev Food Sci Food Saf.* 2020; 19(2): 448-478.
137. Sioriki E, Tuenter E, de Walle DV, Lemarcq V, Cazin CSJ, Nolan SP, et al. The effect of cocoa alkalization on the non-volatile and volatile mood-enhancing compounds. *Food Chemistry.* 2022; 381: 132082.
138. Dyer B. Alkalized cocoa powders. *Manufacturing Confectioner.* 2003; 83(6): 47-54.

139. Sioriki E, Lemarcq V, Alhakim F, Triharyogi H, Tuenter E, Cazin CS, et al. Impact of alkalization conditions on the phytochemical content of cocoa powder and the aroma of cocoa drinks. *LWT*. 2021; 145: 111181.
140. Valverde D, Behrends B, Pérez-Esteve É, Kuhnert N, Barat JM. Functional changes induced by extrusion during cocoa alkalization. *Food Research International*. 2020; 136: 109469.
141. Li Y, Feng Y, Zhu S, Luo C, Ma J, Zhong F. The effect of alkalization on the bioactive and flavor related components in commercial cocoa powder. *J Food Compos Anal*. 2012; 25(1): 17-23.
142. Ramiro-Puig E, Castell M. Cocoa: Antioxidant and immunomodulator. *Br J Nutr*. 2009; 101(7): 931-940.
143. Oracz J, Nebesny E, Zyzelewicz D, Budryn G, Luzak B. Bioavailability and metabolism of selected cocoa bioactive compounds: A comprehensive review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr*. 2019; 60(12): 1947-1985.
144. Melo TS, Pires TC, Engelmann JVP, Monteiro ALO, Maciel LF, Bispo EDS. Evaluation of the content of bioactive compounds in cocoa beans during the fermentation process. *J Food Sci Technol*. 2021; 58: 1947–1957.
145. Goya L, Kongor JE, de Pascual-Teresa S. From Cocoa to Chocolate: Effect of Processing on Flavanols and Methylxanthines and Their Mechanisms of Action. *International Journal of Molecular Sciences*. 2022; 23(22):14365.
146. Barišić V, Kopjar M, Jozinović A, Flanjak I, Ačkar Đ, Miličević B, et al. The Chemistry behind Chocolate Production. *Molecules*. 2019; 24(17): 3163.
147. Calvo AM, Botina BL, García MC, Cardona WA, Montenegro AC, Criollo J. Dynamics of cocoa fermentation and its effect on quality. *Sci Rep*. 2021; 11: 16746.
148. Katz DL, Doughty K, Ali A. Cocoa and chocolate in human health and disease. *Antioxid Redox Signal*. 2011; 15(10): 2779-2811.
149. Mayorga-Gross AL, Esquivel P. Impact of Cocoa Products Intake on Plasma and Urine Metabolites: A Review of Targeted and Non-Targeted Studies in Humans. *Nutrients*. 2019; 11(5): 1163.
150. Andújar I, Recio MC, Giner RM, Ríos JL. Cocoa polyphenols and their potential benefits for human health. *Oxid Med Cell Longev*. 2012; 2012: 906252.
151. Kim J, Kim J, Shim J, Lee CY, Lee KW, Lee HJ. Cocoa phytochemicals: recent advances in molecular mechanisms on health. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2014; 54(11): 1458-1472.
152. Zeli C, Lombardo M, Storz MA, Ottaviani M, Rizzo G. Chocolate and Cocoa-Derived Biomolecules for Brain Cognition during Ageing. *Antioxidants*. 2022; 11(7):1353.
153. Lau-Cam CA. The Absorption, Metabolism, and Pharmacokinetics of Chocolate Polyphenols. Watson RR, Preedy VR, Zibadi S, editors. *Chocolate in Health and Nutrition*. Nutrition and Health, vol 7. Totowa, NJ: Humana Press; 2013. pp 201-246.
154. Magrone T, Russo MA, Jirillo E. Cocoa and Dark Chocolate Polyphenols: From Biology to Clinical Applications. *Front Immunol*. 2017; 8: 677.

155. Stringer T, Guerrieri D, Vivar C, Van Praag H. Plant-derived flavanol (–) epicatechin mitigates anxiety in association with elevated hippocampal monoamine and BDNF levels, but does not influence pattern separation in mice. *Transl Psychiatry*. 2015; 5(1): e493.
156. Vignes M, Maurice T, Lante F, Nedjar M, Thethi K, Guiramand J, et al. Anxiolytic properties of green tea polyphenol (–)-epigallocatechin gallate (EGCG). *Brain Res*. 2006; 1110(1): 102-115.
157. Goutman JD, Waxemberg MD, Doñate-Oliver F, Pomata PE, Calvo DJ. Flavonoid modulation of ionic currents mediated by GABAA and GABAC receptors. *Eur J Pharmacol*. 2003; 461(2-3): 79–87.
158. Tsang C, Hodgson L, Bussu A, Farhat G, Al-Dujaili E. Effect of Polyphenol-Rich Dark Chocolate on Salivary Cortisol and Mood in Adults. *Antioxidants*. 2019; 8(6):149.
159. Lee B, Sur B, Kwon S, Yeom M, Shim I, Lee H, et al. Chronic administration of catechin decreases depression and anxiety-like behaviors in a rat model using chronic corticosterone injections. *Biomol Ther*. 2013; 21(4): 313–322.
160. Smit HJ, Gaffan EA, Rogers PJ. Methylxanthines are the psychopharmacologically active constituents of chocolate. *Psychopharmacology*. 2004; 176: 412–419.
161. Cova I, Leta V, Mariani C, Pantoni L, Pomati S. Exploring cocoa properties: is theobromine a cognitive modulator?. *Psychopharmacology*. 2019; 236: 561–572.
162. Schuster J, Mitchell ES. More than just caffeine: psychopharmacology of methylxanthine interactions with plant-derived phytochemicals. *Progress in Neuropsychopharmacology and Biological Psychiatry*. 2019; 89:263-74.
163. Smit HJ. Theobromine and the Pharmacology of Cocoa. In: *Methylxanthines. Handbook of Experimental Pharmacology*, vol 200. Berlin, Heidelberg: Springer; 2011. pp 201–234.
164. Franco R, Oñatibia-Astibia A, Martínez-Pinilla E. Health benefits of methylxanthines in cacao and chocolate. *Nutrients*. 2013; 5(10): 4159-73.
165. Judelson DA, Preston AG, Miller DL, Muñoz CX, Kellogg MD, Lieberman HR. Effects of theobromine and caffeine on mood and vigilance. *J clin psychopharmacol*. 2013;33(4): 499–506.
166. Rojo-Poveda O, Barbosa-Pereira L, Zeppa G, Stévigny C. Cocoa Bean Shell—A By-Product with Nutritional Properties and Biofunctional Potential. *Nutrients*. 2020; 12(4):1123.
167. Arnold MR, Williams PH, McArthur JA, Archuleta AR, O'Neill CE, Hassell Jr, et al. Effects of chronic caffeine exposure during adolescence and subsequent acute caffeine challenge during adulthood on rat brain serotonergic systems. *Neuropharmacology*. 2019; 148: 257–271.
168. Fiani B, Zhu L, Musch BL, Briceno S, Andel R, Sadeq N, et al. The neurophysiology of caffeine as a central nervous system stimulant and the resultant effects on cognitive function. *Cureus*. 2021; 13(5): e15032.
169. Hughes RN, Hancock NJ, Henwood GA, Rapley SA. Evidence for anxiolytic effects of acute caffeine on anxiety-related behavior in male and female rats

- tested with and without bright light. *Behavioural Brain Research*. 2014; 271: 7-15.
170. Yamada T, Yamada Y, Okano Y, Terashima T, Yokogoshi H. Anxiolytic effects of short-and long-term administration of cacao mass on rat elevated T-maze test. *J Nutr Biochem*. 2009; 20(12): 948-955.
171. Sakkaroz [Internet]. 2021 [Erişim Tarihi 27.02.2023]. Erişim adresi: <https://tr.wikipedia.org/wiki/Sakkaroz>.
172. Spoelma MJ, Boakes RA. Sugar consumption and behavioural inhibition in the rat. *Appetite*. 2021; 159: 105043.
173. Liu D, Hu H, Hong Y, Xiao Q, Tu J. Sugar Beverage Habitation Relieves Chronic Stress-Induced Anxiety-like Behavior but Elicits Compulsive Eating Phenotype via vLS^{GAD2} Neurons. *Int J Mol Sci*. 2023; 24(1):661.
174. Jacques A, Chaaya N, Beecher K, Ali SA, Belmer A, Bartlett S. The impact of sugar consumption on stress driven, emotional and addictive behaviors. *Neurosci Biobehav Rev*. 2019; 103: 178–199.
175. Ulrich-Lai YM, Christiansen AM, Ostrander MM, Jones AA, Jones KR, Choi DC, et al. Pleasurable behaviors reduce stress via brain reward pathways. *Proc Natl Acad Sci*. 2010; 107: 20529-20534.
176. Murphy M, Mercer JG. Diet-regulated anxiety. *Int J Endocrinol*. 2013; 2013: 1–9.
177. Ulrich-Lai YM, Christiansen AM, Ostrander MM, Jones AA, Jones KR, Choi DC, et al. Pleasurable behaviors reduce stress via brain reward pathways. *Proc Natl Acad Sci*. 2010; 107(47): 20529-34.
178. Xu TJ, Reichelt AC. Sucrose or sucrose and caffeine differentially impact memory and anxiety-like behaviours, and alter hippocampal parvalbumin and doublecortin. *Neuropharm*. 2018; 137: 24-32
179. Chepulis LM, Starkey NJ, Waas JR, Molan PC. The effects of long-term honey, sucrose or sugar-free diets on memory and anxiety in rats. *Physiol Behav*. 2009; 97(3-4): 359-368.
180. Ramiro-Puig E, Pérez-Cano FJ, Ramos-Romero S, Pérez-Berezo T, Castellote C, Permanyer J, et al. Intestinal immune system of young rats influenced by cocoa-enriched diet. *J Nutr Biochem*. 2008;19(8):555-65.
181. Taiwo AE, Leite FB, Lucena GM, Barros M, Silveira D, Silva MV, et al. Anxiolytic and antidepressant-like effects of *Melissa officinalis* (lemon balm) extract in rats: Influence of administration and gender. *Indian J Pharmacol*. 2012; 44(2): 189- 192.
182. Walf A, Frye C. The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents. *Nat Protoc*. 2007; 2: 322-328.
183. Pellow S, Chopin P, File SE, Briley M. Validation of open: closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *J Neurosci Methods*. 1985; 14: 149-167.
184. Özbeyli D, Gülhan R, editörler. *Deneyisel Araştırma Modelleri Uygulama El Kitabı*. Ankara: Ankara Nobel Tıp Kitabevleri; 2021. s.338.


185. Bohlen M, Cameron A, Metten P, Crabbe JC, Wahlsten D. Calibration of rotational acceleration for the rotarod test of rodent motor coordination. *J Neurosci Methods*. 2009; 178(1): 10-14.
186. Jakkamsetti V, Scudder W, Kathote G, Ma Q, Angula G, Dobariya A, et al. Quantification of early learning and movement sub-structure predictive of motor performance. *Sci Rep*. 2021; 11: 14405.
187. Deacon RM. Measuring motor coordination in mice. *J Vis Exp*. 2013; 75: e2609.
188. Ferrante RJ, Andreassen OA, Dedeoglu A, Ferrante KL, Jenkins BG, Hersch SM, et al. Therapeutic effects of coenzyme Q10 and remacemide in transgenic mouse models of Huntington's disease. *J. Neurosci*. 2002; 22(5): 1592-1599.
189. Spijker S. Dissection of rodent brain regions. Li KW editor. *Neuroproteomics (Neuromethods, vol 57)*. Totowa, NJ: Humana Press; 2011.
190. Ma H, Shieh KJ. ELISA Technique. *Nat Sci*. 2006;4(2):36-37.
191. Satija J, Punjabi N, Mishra D, Mukherji S. Plasmonic-ELISA: expanding horizons. *RSC Advances*. 2016; 6(88): 85440–85456.
192. Kuleshkaya N, Voikar V. Assessment of mouse anxiety-like behavior in the light–dark box and open-field arena: Role of equipment and procedure. *Physiology & behavior*. 2014; 133; 30-38.
193. La-Vu M, Tobias BC, Schuette PJ, Adhikari A. To approach or avoid: an introductory overview of the study of anxiety using rodent assays. *Front Behav Neurosci*. 2020; 14; 145.
194. Ennaceur A, Chazot PL. Preclinical animal anxiety research—flaws and prejudices. *Pharmacol Res Perspect*. 2016; 4(2): e00223.
195. Sudakov SK, Nazarova GA, Alekseeva EV, BaškatoVA VG. Estimation of the Level of Anxiety in Rats: Differences in Results of Open-Field Test, Elevated Plus-Maze Test, and Vogel's Conflict Test. *Bull Exp Biol Med*. 2013; 155: 295–297.
196. Ohl F, Toschi N, Wigger A, Henniger MSH, Landgraf RJB. Dimensions of emotionality in a rat model of innate anxiety. *Behav Neurosci*. 2001; 115(2); 429-436.
197. Zhang C, Kalueff AV, Song C. Minocycline ameliorates anxiety-related self-grooming behaviors and alters hippocampal neuroinflammation, GABA and serum cholesterol levels in female Sprague-Dawley rats subjected to chronic unpredictable mild stress. *Behav Brain Res*. 2019; 363: 109–117.
198. File SE. Behavioural pharmacology of benzodiazepines. *Prog Neuro-Psychopharmacol Biol Psychiatry*. 1984; 8(1): 19-31.
199. Özbeyli D, Gülhan R, editörler. *DeneySEL Araştırma Modelleri Uygulama El Kitabı*. Ankara: Ankara Nobel Tıp Kitabevleri; 2021. s.340.
200. Messaoudi M, Bisson J-F, Nejdi A, Rozan P, Javelot H. Antidepressant-like effects of a cocoa polyphenolic extract in Wistar-Unilever rats. *Nutritional Neuroscience*. 2008; 11(6): 269- 276.
201. Marin MT, Zancheta R, Paro AH, Possi AP, Cruz FC, Planeta CS. Comparison of caffeine-induced locomotor activity between adolescent and adult rats. *European j pharmacol*. 2011; 660(2-3): 363-367.

202. Xu TJ, Reichelt AC. Sucrose or sucrose and caffeine differentially impact memory and anxiety-like behaviours, and alter hippocampal parvalbumin and doublecortin. *Neuropharmacology*. 2018;137:24-32.
203. Rosa VP, Vandresen N, Calixto AV, Kovaleski DF, Faria MS. Temporal analysis of the rat's behavior in the plus-maze: effect of midazolam. *Pharmacol Biochem Behav*. 2000; 67(1): 177-182.
204. Ramos A, Pereira E, Martins GC, Wehrmeister TD, Izídio GS. Integrating the open field, elevated plus maze and light/dark box to assess different types of emotional behaviors in one single trial. *Behav Brain Res*. 2008; 193(2): 277-288.
205. Bandelow B, Baldwin D, Abelli M, Altamura C, Dell'Osso B, Domschke K, et al. Biological markers for anxiety disorders, OCD and PTSD—a consensus statement. Part I: neuroimaging and genetics. *The World J Biol Psychiatry*. 2016; 17(5): 321-365
206. Roy-Byrne PP, Cowley DS, Hommer D, Greenblatt DJ, Kramer GL, Petty F. Effect of acute and chronic benzodiazepines on plasma GABA in anxious patients and controls. *Psychopharmacology*. 1992; 109: 153–156.
207. Wu M, Qiu X, Chen C, Chen K, Li M, Xu H, et al. Short-term and persistent impacts of sublethal exposure to diazepam on behavioral traits and brain GABA levels in juvenile zebrafish (*Danio rerio*). *Sci Total Environ*. 2020; 740: 140392.
208. Spagnuolo MS, Mazzoli A, Nazzaro M, Troise AD, Gatto C, Tonini C, et al. Long-Lasting Impact of Sugar Intake on Neurotrophins and Neurotransmitters from Adolescence to Young Adulthood in Rat Frontal Cortex. *Mol Neurobiol*. 2022; 60: 1004-1020.
209. Beecher K, Wang J, Jacques A, Chaaya N, Chehrehasa F, Belmer A and Bartlett SE. Sucrose Consumption Alters Serotonin/Glutamate Co-localisation Within the Prefrontal Cortex and Hippocampus of Mice. *Front Mol Neurosci*. 2021; 14: 678267.
210. Pizarro Meléndez GP, Valero-Jara V, Acevedo-Hernández P, ThomasValdés S. Impact of polyphenols on stress and anxiety: a systematic review of molecular mechanisms and clinical evidence. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2022; 26 :1-18.
211. Zhang LM, Yao JZ, Li Y, Li K, Chen HX, Zhang YZ, et al. Anxiolytic effects of flavonoids in animal models of posttraumatic stress disorder. *Evi Based Complement Altern Med*. 2012; 2012: 623753.
212. Krishnakumar D, Hamblin MR, Lakshmanan S. Meditation and Yoga can Modulate Brain Mechanisms that affect Behavior and Anxiety-A Modern Scientific Perspective. *Ancient Science*. 2015; 2(1): 13-19.
213. Pomara N, Willoughby LM, Sidtis JJ, Cooper TB, Greenblatt DJ. Cortisol response to diazepam: its relationship to age, dose, duration of treatment, and presence of generalized anxiety disorder. *Psychopharmacol*. 2005; 178: 1-8.
214. Ruiz-Iglesias P, Massot-Cladera M, Pérez-Cano FJ, Castell M. Influence of Diets Enriched with Flavonoids (Cocoa and Hesperidin) on the Systemic Immunity of Intensively Trained and Exhausted Rats. *Biomolecules*. 2022; 12(12):1893.

215. Tokede O, Gaziano J, Djoussé L. Effects of cocoa products/dark chocolate on serum lipids: a meta-analysis. *Eur J Clin Nutr.* 2011; 65: 879-886.
216. Ruzaidi A, Amin I, Nawalyah AG, Hamid M, Faizul HA. The effect of Malaysian cocoa extract on glucose levels and lipid profiles in diabetic rats. *J ethnopharmacol.* 2005; 98(1-2): 55-60.
217. Basu A, Betts NM, Leyva MJ, Fu D, Aston CE, Lyons TJ. Acute cocoa supplementation increases postprandial HDL cholesterol and insulin in obese adults with type 2 diabetes after consumption of a high-fat breakfast. *J Nutr.* 2015; 145(10): 2325-2332.

8. EKLER

EK-1: Tez Çalışması ile İlgili Etik Kurul İzni



**T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ**
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu

Sayı : 52338575-111

HAYVAN DENEYLERİ ETİK KURUL KARARI

TOPLANTI TARİHİ	: 28.09.2021 (SALI)
TOPLANTI SAYISI	: 2021/07
DOSYA KAYIT NUMARASI	: 2021/56
KARAR NUMARASI	: 2021/07- 02
ONAY BİTİŞ TARİHİ	: 28.09.2026
ARAŞTIRMA YÜRÜTÜCÜSÜ	: Doç. Dr. Okan ARIHAN
HAYVAN DENEYLERİNDE	: Doç. Dr. Okan ARIHAN, Dr. Öğr. Üyesi Serkan
GÖREVLİ ARAŞTIRMACILAR	: KARAİSMAİLOĞLU, Esra Nur ALKAN (Yüksek Lisans Tezi),
DİĞER YARDIMCI	:
ARAŞTIRMACILAR	: Kardelen PEKASLAN
ONAYLANAN HAYVAN TÜRÜ ve SAYISI	: 76 Adet Wistar Albino Sıçan (4-8 Haftalık)

Üniversitemiz Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Doç. Dr. Okan ARIHAN'ın araştırma yürütücüsü olduğu 2021/56 kayıt numaralı "*Farklı Dozlarda ve Sükrozla Birlikte Uygulanan Kakaonun (Theobroma Cacao) Sıçanlar Üzerindeki Anksiyolitik Etkisinin İncelenmesi*" isimli çalışma Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Yönergesi'ne göre uygun bulunarak oy birliği ile onaylanmasına karar verilmiştir.

Araştırma yürütücüsü en geç, onay bitiş tarihinden sonraki 1 ay içerisinde proje sonuç raporunu Kurulumuza teslim etmekle yükümlüdür.

Prof. Dr. Sema ÇALIŞ
Etik Kurul Başkanı

EK-2: Dijital Makbuz



Dijital Makbuz

Bu makbuz ödevinizin Turnitin'e ulaştığını bildirmektedir. Gönderiminize dair bilgiler şöyledir:

Gönderinizin ilk sayfası aşağıda gönderilmektedir.

Gönderen: Esra Nur Alkan
Ödev başlığı: FARKLI DOZLARDA VE SÜKROZLA BİRLİKTE UYGULANAN KAK...
Gönderi Başlığı: FARKLI DOZLARDA VE SÜKROZLA BİRLİKTE UYGULANAN KAK...
Dosya adı: A_CACAO_SI_ANLAR_ZER_NDEK_ANKS_YOL_T_K_ETK_S_N_N_N...
Dosya boyutu: 3.22M
Sayfa sayısı: 73
Kelime sayısı: 14,330
Karakter sayısı: 99,932
Gönderim Tarihi: 28-May-2023 02:28ÖS (UTC+0300)
Gönderim Numarası: 2103584896



EK-3: Tez Çalışması Orjinallik Formu

FARKLI DOZLARDA VE SÜKROZLA BİRLİKTE UYGULANAN KAKAONUN (THEOBROMA CACAO) SIÇANLAR ÜZERİNDEKİ ANKSİYOLİTİK ETKİSİNİN İNCELENMESİ

ORJİNALLIK RAPORU

% **7**

BENZERLİK ENDEKSİ

% **7**

İNTERNET KAYNAKLARI

% **3**

YAYINLAR

% **2**

ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1

acikbilim.yok.gov.tr
İnternet Kaynağı

% **3**

2

openaccess.hacettepe.edu.tr:8080
İnternet Kaynağı

% **1**

3

www.openaccess.hacettepe.edu.tr:8080
İnternet Kaynağı

<% **1**

4

dergipark.org.tr
İnternet Kaynağı

<% **1**

5

earsiv.atauni.edu.tr
İnternet Kaynağı

<% **1**

6

Submitted to Bülent Ecevit Üniversitesi
Öğrenci Ödevi

<% **1**

7

dspace.baskent.edu.tr
İnternet Kaynağı

<% **1**

8

nek.istanbul.edu.tr:4444
İnternet Kaynağı

<% **1**

abis-files.erciyes.edu.tr

9. ÖZGEÇMİŞ