

FERULİK ASİTİN ve FERULİK ASİT YÜKLÜ
TAŞIYICI SİSTEMİN ANKSİYETE ÜZERİNE
ETKİLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI

Doktora Tezi

Mevcude ÇAM

ESKİŞEHİR 2024

**FERULİK ASİTİN ve FERULİK ASİT YÜKLÜ TAŞIYICI SİSTEMİN
ANKSİYETE ÜZERİNE ETKİLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI**

Mevcude ÇAM

DOKTORA TEZİ

Farmakoloji Ana Bilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Rana ARSLAN

Eskişehir

Anadolu Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü

Ocak 2024

Bu tez çalışması BAP Komisyonu tarafından kabul edilen 2101S005 no'lu proje kapsamında desteklenmiştir.

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Mevcude ÇAM'ın 'Ferulik Asitin ve Ferulik Asit Yüklü Taşıyıcı Sistemin Anksiyete Üzerine Etkilerinin Karşılaştırılması' başlıklı tezi 16.01.2024 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından değerlendirilerek Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca, Farmakoloji Ana Bilim Dalında Doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

<u>Unvanı Adı-Soyadı</u>		<u>İmza</u>
Üye (Tez Danışmanı)	: Prof. Dr. Rana ARSLAN
Üye	: Prof. Dr. Nurcan BEKTAŞ TÜRKMEN
Üye	: Doç. Dr. Evrim AKYIL
Üye	: Prof.Dr. Engin YILDIRIM
Üye	: Dr. Öğr. Üyesi Hazal EKEN

Prof. Dr. Saime ÖNCE

Anadolu Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Müdürü

ÖZET

FERULİK ASİTİN ve FERULİK ASİT YÜKLÜ TAŞIYICI SİSTEMİN ANKSİYETE ÜZERİNE ETKİLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI

MEVCUDE ÇAM

Farmakoloji Ana Bilim Dalı

Anadolu Üniversitesi, Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Ocak,2024

Danışman: Prof. Dr. Rana ARSLAN

Anksiyete hastalığının toplumda yaygın görülen psikiyatrik bozukluklardan biri olduğu bildirilmiştir. Anksiyete rahatsızlığının çeşitli sebeplere bağlı olarak ortaya çıkabileceği düşünülmektedir. Günümüzde birkaç geleneksel anksiyolitik ilaç kullanılmaktadır, ancak bu ilaçların ciddi birçok yan etkiye neden olduğu bildirilmektedir. Bu nedenle, doğal kaynaklardan hedefine uygun, daha etkili ve güvenli ilaç kaynakları bulmak için çalışmalar araştırmacılar tarafından büyük bir hızla yürütülmektedir. Bu kapsamda, köklü anksiyolitik aktiviteleri ve yapı-aktivite ilişkileri ile nöropsikofarmakolojik yönleri olan fitokimyasal bileşikler kapsamlı bir şekilde gözden geçirilmektedir. Sonuçlar fenolik fitokimyasalların güvenli anksiyolitik etkilere sahip olduğunu bildirmiştir. Ferulik asitin düşük toksisiteye sahip bir fenolik bir bileşik olduğu çalışmalarda görülmüştür. Ferulik asitin, anksiyolitik etkisi de dâhil olmak üzere birçok fizyolojik fonksiyona sahip olduğu bildirilmektedir. Bu proje kapsamında ferulik asidin yüklü ilaç taşıyıcı sisteme yüklenerek akut ve subkronik uygulamada biyoyararlanımının artırılması ve bu yönde gözlenen etkinin anksiyolitik tedavideki değeri değerlendirilecektir.

Anahtar Kelimeler: Ferulik asit, Anksiyolitik etki, İlaç taşıyıcı sistem, Katı lipit nanopartikül.

ABSTRACT

COMPARISON OF THE EFFECTS OF FERULIC ACID AND FERULIC ACID LOADED CARRIER SYSTEM ON ANXIETY

MEVCUDE ÇAM

Department of Pharmacology

Anadolu University, Postgraduate Education Institute, January, 2024

Supervisor: Prof. Dr. Rana ARSLAN

It has been reported that anxiety disease is one of the common psychiatric disorders in society. It is thought that anxiety disorder may occur due to various reasons. Several traditional anxiolytic drugs are used today, but these drugs are reported to cause many serious side effects. For this reason, studies are carried out at great speed by researchers to find more effective and safe drug sources suitable for their target from natural sources. In this context, phytochemical compounds with well-established anxiolytic activities, structure-activity relationships and neuropsychopharmacological aspects are comprehensively reviewed. The results reported that phenolic phytochemicals have safe anxiolytic effects. Studies have shown that ferulic acid is a phenolic compound with low toxicity. Ferulic acid is reported to have many physiological functions, including its anxiolytic effect. Within the scope of this project, increasing the bioavailability of ferulic acid in acute and subchronic administration by loading it into the loaded drug carrier system and the value of this observed effect in anxiolytic treatment will be evaluated.

Keywords: Ferulic acid, Anxiolytic effect, Drug delivery systems, Solid lipid nanoparticle.

TEŞEKKÜR

Doktora çalışmalarında, tezimin doğru bir şekilde yönlendirilip sonuçlanmasında bilgi ve birikiminden faydalandığım, tüm süre zarfında desteğini esirgemeyen, göstermiş olduğu hoşgörü ve sabrından dolayı kıymetli danışman hocam sayın Prof. Dr. Rana ARSLAN'a çok teşekkür ederim.

Doktora eğitimimde, özellikle doktora yeterlik sınavımda çok destek olan kıymetli hocam sayın Prof. Dr. Nurcan Bektaş Türkmen'e çok teşekkür ederim.

Ferulik asiti taşıyıcı bir sisteme (Katı Lipit Nanopartikül) yükleyerek tez çalışmamın olgunlaşmasında çok büyük emeği olan kıymetli hocam sayın Doç. Dr. Evrim YENİLMEZ'e çok teşekkür ederim.

Hayatımın her alanında benim için fedakârlıktan kaçınmayan, her zaman yanımda olan maddi ve manevi desteğini esirgemeyen, haklarımı ödeyemeyeceğim sevgili aileme; annem Funda ÇAM'a, babam Arif ÇAM'a ve kardeşim Halil Gürkan ÇAM'a çok teşekkür ederim.

Her zaman yanımda olan ve desteğini hiç esirgemeyen iyikim Recep Ali KARAGÖZ'e çok teşekkür ederim.

Doktora sürecim, 100/2000 YÖK Doktora Bursu ile desteklenmiştir. 100/2000 YÖK Doktora Bursu desteği için T.C. Yükseköğretim Kurulu'na sonsuz teşekkür ederim.

Doktora tezimin araştırılmasını destekleyen Anadolu Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi Koordinatörlüğü'ne ve Anadolu Üniversitesi'ne sonsuz teşekkür ederim.

Tez yazım-teslim aşamamda çok yardımcı olan, sabırla benimle ilgilenen Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Tez-proje teslim birimi şefi sayın Habibe DUMAN'a, İdari personel sayın Hızır AÇIKGÖZ'e, Tez-proje teslim birimi personeli sayın Yasin ÖZDEVE'ye çok ama çok teşekkür ederim. İyi ki varsınız!

17/01/2024

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ

Bu tezin bana ait, özgün bir çalışma olduğunu; çalışmamın hazırlık, veri toplama, analiz ve bilgilerin sunumu olmak üzere tüm aşamalarında bilimsel etik ilke ve kurallara uygun davrandığımı; bu çalışma kapsamında elde edilen tüm veri ve bilgiler için kaynak gösterdiğimi ve bu kaynaklara kaynakçada yer verdiğimi; bu çalışmanın Anadolu Üniversitesi tarafından kullanılan “bilimsel intihal tespit programı”yla tarandığını ve hiçbir şekilde “intihal içermediğini” beyan ederim. Herhangi bir zamanda, çalışmamla ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması durumunda, ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçları kabul ettiğimi bildiririm.

Mevcude Çam

17/01/2024

STATEMENT OF COMPLIANCE WITH ETHICAL PRINCIPLES AND RULES

I hereby truthfully declare that this thesis is an original work prepared by me; that I have behaved in accordance with the scientific ethical principles and rules throughout the stages of preparation, data collection, analysis and presentation of my work; that I have cited the sources of all the data and information that could be obtained within the scope of this study, and included these sources in the references section; and that this study has been scanned for plagiarism with “scientific plagiarism detection program” used by Anadolu University, and that “it does not have any plagiarism” whatsoever. I also declare that, if a case contrary to my declaration is detected in my work at any time, I hereby express my consent to all the ethical and legal consequences that are involved.

Mevcude Çam

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
BAŞLIK SAYFASI	i
JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI	ii
ÖZET	iii
ABSTRACT.....	iv
TEŞEKKÜR	v
ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ.....	vi
STATEMENT OF COMPLIANCE WITH ETHICAL PRINCIPLES AND RULES	vii
İÇİNDEKİLER	viii
TABLolar DİZİNİ.....	xiv
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xv
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xviii
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Anksiyete	3
2.2. Anksiyete Oluşumunda Rolü Olan Temel Nörotransmitter Sistemler.....	4
2.2.1. GABAerjik sistem	4
2.2.2. Noradrenerjik sistem	4
2.2.3. Serotonerjik sistem	4
2.2.4. Dopaminerjik sistem	5
2.2.5. Glutamat	5
2.2.6. Nitrik oksit	5
2.2.7. Kolesistokinin (CCK).....	5

2.2.8. RAS-HPA eksenini (Renin-anjiotensin sistemi/ Hipotalamik-pituitory adrenal eksenini).....	6
2.3. Anksiyete Tedavisi.....	6
2.3.1. Psikoterapi.....	6
2.3.1.1. Bilişsel davranışçı terapi.....	6
2.3.1.1.1. Maruz kalma tedavisi.....	6
2.3.1.2. Farkındalık ve kabul temelli psikoterapiler.....	7
2.3.2. İlaç tedavisi.....	7
2.3.2.1. Serotonin-noradrenalin geri alım inhibitörleri.....	7
2.3.2.2. Benzodiazepinler.....	8
2.3.2.3. Diğer tedavi seçenekleri.....	8
2.3.2.3.1. Buspiron.....	9
2.3.2.3.2. Hidroksizin.....	9
2.3.2.3.3. Beta blokörler.....	9
2.3.2.3.4. Pregabalin.....	9
2.3.2.3.5. Monoamin oksidaz (MAO) inhibitörleri.....	10
2.3.2.3.6. TCA (Trisiklik antidepresanlar).....	10
2.4. Anksiyete Bozukluklarının Hayvan Modelleri.....	11
2.4.1. Açık alan testi (Open-field area test).....	11
2.4.2. Yükseltilmiş artı labirent testi (Elevated plus maze test, EPM).....	13
2.4.3. Yükseltilmiş 0 testi (Elevated zero maze= EZM).....	14
2.4.4. Yükseltilmiş T testi (Elevated T maze=ETM).....	14
2.4.5. Aydınlık-karanlık kutu testi (Light-dark box test=LDB TEST).....	15
2.4.6. Delikli tahta testi (Hole-board test).....	15
2.4.7. Emosyonel hipofaji (Hiponeofaji).....	15

2.4.8. Sosyal etkileşim testi	16
2.4.9. Merdiven testi (Staircase test).....	16
2.4.10. Koşullu anksiyete testi	16
2.4.11. Geller-Seifter testi	17
2.4.12. Vogel çalışma testi.....	17
2.4.13. Spontan lokomotor aktivite testi.....	17
2.5. Anksiyete Tedavisinde Etkili Olduğu Düşünülen Bitkiler.....	17
2.5.1. <i>Piper methysticum</i>	19
2.5.2. <i>Centella asiatica</i>	19
2.5.3. <i>Ginkgo biloba</i>	20
2.5.4. <i>Matricaria chamomilla</i>	20
2.5.5. <i>Passiflora incarnata</i>	20
2.5.6. <i>Scutellaria lateriflora</i>	21
2.5.7. <i>Valeriana officinalis</i>	21
2.5.8. <i>Magnolia officinalis</i>	22
2.5.9. <i>Lavandula angustifolia</i>	22
2.5.10. <i>Melissa officinalis</i>	22
2.5.11. <i>Rhodiola rosea</i>	22
2.5.12. <i>Crocus sativus</i>	22
2.5.13. <i>Albizia julibrissin</i>	23
2.5.14. <i>Echium amoenum</i>	23
2.5.15. <i>Melittis melisophyllum</i>	23
2.5.16. <i>Biebersteinia multifida</i>	23
2.5.17. <i>Ferula assafoetida</i>	23
2.5.18. <i>Tribulus terrestris</i>	23

2.5.19. <i>Oryza sativa</i>	24
2.5.20. <i>Origanum majorana</i>	24
2.6. Fenolik Bileşikler	24
2.6.1. Ferulik asit	25
2.7. Katı Lipit Nanopartiküller	28
2.7.1. Tanımı ve genel özellikleri.....	28
2.7.2. Katı lipit nanopartiküllerin hazırlanma yöntemleri.....	30
2.7.2.1. <i>Yüksek basınçlı homojenizasyon</i>	30
2.7.2.1.1. <i>Sıcak homojenizasyon</i>	30
2.7.2.1.2. <i>Soğuk homojenizasyon</i>	31
2.7.2.2. <i>Emülsifikasyon-çözücü uçurma yöntemi</i>	31
2.7.2.3. <i>Mikroemülsiyon yöntemi</i>	31
2.7.2.4. <i>Çift emülsifikasyon yöntemi</i>	31
2.7.2.5. <i>Çözücü emülsifikasyon-difüzyon yöntemi</i>	32
2.7.2.6. <i>Çözücü enjeksiyon yöntemi</i>	32
2.7.2.7. <i>Yüksek hızla karıştırma (Ultrasonikasyon) yöntemi</i>	33
2.7.2.8. <i>Membran kontaktörü</i>	33
2.7.3. KLN üzerinde karakterizasyon çalışmaları	33
2.7.3.1. <i>Etkin madde yükleme kapasitesi</i>	33
2.7.3.2. <i>Parçacık boyutu ve dağılımı</i>	34
2.7.3.3. <i>Partikül morfolojisinin incelenmesi</i>	34
2.7.3.4. <i>Zeta potansiyel ölçümü</i>	35
2.7.3.5. <i>Fizikokimyasal analiz</i>	35
2.7.3.6. <i>Etkin madde salımı</i>	35
3. MATERYAL VE METOD	36

3.1. Kullanılan Kimyasallar	36
3.2. Kullanılan Cihazlar	36
3.3. KLN Sistem Formülasyonlarının Hazırlanması ve Karakterizasyonu	39
3.3.1. Ferulik asit miktar tayini yöntemi.....	40
3.3.2. KLN karakterizasyonuna ait çalışmalar	41
3.3.2.1. Parçacık boyutu ve dağılımı analizi.....	41
3.3.2.2. Zeta potansiyel	41
3.3.2.3. Formülasyonda etkin madde miktar tayini.....	41
3.4. Deney Hayvanları	41
3.5. Deney Gruplarının Oluşturulması ve İlaç Uygulamaları	42
3.6. Anksiyete Modelleri.....	43
3.6.1. Açık alan testi (Open-field area test).....	43
3.6.2. Delikli tahta testi (Hole-board test)	43
3.6.3. Yükseltilmiş artı labirent testi (Elevated plus maze test).....	43
3.6.4. Spontan lokomotor aktivite testi.....	43
3.6.5. Aydınlık-karanlık kutu testi (Light–dark box test)	43
3.7. İstatistiksel Analiz.....	44
4. BULGULAR.....	45
4.1. Akut Uygulama Sonuçları.....	45
4.1.1. Aydınlık-karanlık kutu (Light-dark box) testi sonuçları	45
4.1.2. Açık alan (Open-field area) testi sonuçları.....	46
4.1.3. Delikli tahta (Hole-board) testi sonuçları	48
4.1.4. Yükseltilmiş artı labirent (Elevated plus maze) testi sonuçları	50
4.1.5. Spontan lokomotor aktivite testi sonuçları.....	51
4.2. Subkronik Uygulama Sonuçları	53

Sayfa

4.2.1. Aydınlık-karanlık kutu (Light-dark box) testi sonuçları	53
4.2.2. Açık alan (Open-field area) testi sonuçları.....	54
4.2.3. Delikli tahta (Hole-Board) testi sonuçları.....	56
4.2.4. Yükseltilmiş artı labirent (Elevated plus maze) testi sonuçları	58
4.2.5. Spontan lokomotor aktivite test sonuçları.....	59
4.3. KLN Formülasyonlarının Hazırlanması ve Karakterizasyonu.....	61
4.3.1. Ferulik asit miktar tayini	61
4.3.2. Parçacık boyutu ve dağılımı analizi	62
5. TARTIŞMA	63
6. ÖNERİLER	69
KAYNAKÇA.....	71

EKLER

ÖZGEÇMİŞ

TABLÖLAR DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Tablo 3.3.1. Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi çalışma koşulları	40
Tablo 3.5. Deney ve kontrol grupları	42
Tablo 4.3. Optimum formülasyon içeriği (MC1: KLN-FA)	61
Tablo 4.3.2. Optimum formülasyona ait karakterizasyon çalışmaları ve 3 aylık stabilite sonuçları	62

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 1. Açık alan (Open-field area) testinde kullanılan parametreler	13
Şekil 2. Açık alan (Open-field area) testi	13
Şekil 3. Anksiyolitik etkileri olan farklı bitkisel doğal bileşik sınıflarının kimyasal yapıları	18
Şekil 4. Fitokimyasalların GABA olarak bir pozitif allosterik modülasyonlarla-Benzodizepin reseptör ligandları	19
Şekil 5. Doğada bulunan ferulik asidin iki farklı izomerik formunun şematik gösterimi	25
Şekil 6. Ferulik asitin biyoyararlanımı	26
Şekil 7. Periton boşluğundan sistemik dolaşıma küçük ve makromoleküller için absorpsiyon yollarının şematik genel görünümü	27
Şekil 8. Ferulik asidin farklı kullanım alanları	28
Şekil 9. Yükseltilmiş artı labirent testi (Elevated plus maze) testi	37
Şekil 10. Delikli tahta (Hole-board) testi	38
Şekil 11. Açık alan (Open-field area) testi	38
Şekil 12. Aydınlık-karanlık kutu (Light-Dark Box) testi	39
Şekil 13. Spontan lokomotor aktivite testi	39
Şekil 14. Akut Aydınlık-Karanlık Kutu (Light-Dark Box) Testinde aydınlık alanda geçirilen süre verileri	45
Şekil 15. Akut Aydınlık-Karanlık Kutu (Light-Dark Box) Testinde karanlık alanda geçirilen süre verileri	46

Şekil 16. Akut Açık Alan (Open-Field Area) Testinde merkezde geçirilen süre verileri	47
Şekil 17. Akut Açık Alan (Open-Field Area) Testinde merkezde geçilen kare sayısı verileri	48
Şekil 18. Akut Delikli Tahta (Hole-Board) Testinde kafa daldırma sayısı verileri	49
Şekil 19. Akut Delikli Tahta (Hole-Board) Testinde keşfedilen delik sayısı verileri	50
Şekil 20. Akut Yükseltilmiş Artı Labirent (Elevated Plus Maze) Testinde merkezde geçirilen süre verileri	51
Şekil 21. Akut Spontan Lokomotor Aktivite Testinde yatay hareketlerin sayı verileri.....	52
Şekil 22. Akut Spontan Lokomotor Aktivite Testinde dikey hareketlerin sayı verileri.....	52
Şekil 23. Subkronik Aydınlik-Karanlık Kutu (Light-Dark Box) Testinde aydınlık alanda geçirilen süre verileri	53
Şekil 24. Subkronik Aydınlik-Karanlık Kutu (Light-Dark Box) Testinde karanlık alanda geçirilen süre verileri	54
Şekil 25. Subkronik Açık Alan (Open-Field Area) Testinde merkezde geçirilen süre verileri	55
Şekil 26. Subkronik Açık Alan (Open-Field Area) Testinde merkezde geçilen kare sayısı verileri	56
Şekil 27. Subkronik Delikli Tahta (Hole-Board) Testinde keşfedilen delik sayısı verileri	57

Şekil 28. Subkronik Delikli Tahta (Hole-Board) Testinde kafa daldırma	
sayısı verileri	58
Şekil 29. Subkronik Yükseltilmiş Artı Labirent (Elevated Plus Maze) Testinde	
merkezde geçirilen süre verileri	59
Şekil 30. Subkronik Spontan Lokomotor Aktivite Testinde yatay hareketlerin	
sayı verileri	60
Şekil 31. Subkronik Spontan Lokomotor Aktivite Testinde dikey hareketlerin	
sayı verileri	60
Şekil 32. MC-1 formülasyonu liyofilizasyon öncesi	61

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

¹ H NMR	: Nükleer Manyetik Rezenans Spektroskopisi
5-HT (S)	: Serotonin: 5-Hidroksitriptamin
5HT _{1A}	: Serotonin 1A Reseptörü
7-NI	: 7-Nitroindazolün
AFM	: Atomik Kuvvet Mikroskobu
AMPA	: α -amino-3-hidroksi-5-metil-4-izoksazolpropiyonik asit
ANOVA	: Varyans Analizi
AT ₁	: Anjiotensin II reseptörü(AT ₁ tipi)
CCK	: Kolesistokinin
dl- TH	: dl-Tetrahidropalmatin
DSÖ	: Dünya Sağlık Örgütü
DZP	: Diazepam
EKG	: Elektrokardiyografi
EPM	: Elevated Plus Maze Testi
ETM	: Elevated T Maze Testi
EZM	: Elevated Zero Maze Testi
FA	: Ferulik Asit
FTIR	: Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi
GABA	: Gama Aminobütirik Asit
GABA _A	: Gama Aminobütirik Asit-A
GABA-T	: Gama Aminobütirik Asit Transaminaz
HPA	: Hipotalamik-Hipofiz-Adrenal Eksen
IC50	: Enzim aktivitesini yarıya düşüren inhibitör konsantrasyonu
im	: İntramüsküler

i.p.	: İntraperitoneal
iv	: İntravenöz
KLN	: Katı Lipit Nanopartikül
LD	: Lazer Kırınımı
LDB	: Light Dark Box Testi
MAO	: Monoamin Oksidaz
MAO-A	: Monoamin Oksidaz –A
MAOI	: Monoamin Oksidaz İnhibitörleri
MRN	: Medyan Rafe Çekirdeği
NA	: Noradrenalin
NMDA	: N-metil-D-aspartat
NOS	: Nitrik Oksit Sentaz
PCS	: Foton Korelasyon Spektroskopisi
PIDS	: Polarizasyon Yoğunluğu Diferansiyel Saçılımı
RAS	: Renin Anjiotensin Sistemi
RAS-HPA eksen	: Renin-Anjiotensin Sistemi/Hipotalamik-Pituitary-Adrenal Ekseni
SEM	: Taramalı Elektron Mikroskopu
SNRI	: Serotonin-Noradrenalin Geri Alım İnhibitörleri
SSRI	: Seçici Serotonin Geri Alım İnhibitörleri
TCA	: Trisiklik Antidepresanlar
TEM	: Transmision Elektron Mikroskopu
YBSK	: Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografi
YEM	: Yüzeysel Etkin Madde
α	: Alfa
γ	: Gama

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Anksiyet bozukluğunun insanlar arasında en yaygın görülen psikiyatrik bozukluklardan biri olduğu araştırmacılar tarafından bildirilmiştir. Serotonin, noradrenalin ve GABA (Gama aminobütirik asit) gibi çeşitli nörotransmitterlerin işlev bozukluklarının anksiyete bozukluğuna yol açtığı belirtilmektedir. Bu nörotransmitterlerin işlev bozukluklarının psikofarmakolojik tedavilerin hedefi haline geldiği bildirilmektedir (Melaragno vd., 2020). Günümüzde anksiyete tedavisinde kullanılan ilaçların hasta da sedasyon, bilişsel bozukluk, ataksi, saldırganlık, cinsel işlev bozukluğu, tolerans ve bağımlılık gibi yaygın ve ciddi yan etkileri olduğu bildirilmiştir. Bu ilaçların uzun süreli kullanımından sonra tedaviyi sonlandırma da yoksunluk sendromlarının görülmesi bu ajanların kullanımının sınırlandırılmasında etkili olmuştur (Singh ve Singh, 2002). Anksiyete bozukluğu tedavisinde kullanılan mevcut ilaçların, verimlilik ve tolere edilebilirlik açısından yetersiz olduğu bildirilmiştir ve bu ilaçların ciddi yan etkilerine, suistimal edilmesine, terapötik etkinin gecikmesine, bağımlılığa ve toleransa yol açması nedeniyle yeni ilaç tedavilerine ihtiyaç duyulmuştur (Sartori ve Singewald, 2019; Agatonovic-Kustrin vd., 2020). Anksiyete semptomlarını azaltmak için geleneksel olarak kullanılan doğal ilaçlar çok geniştir ve yeni tedavi stratejilerini tanımlamak için yeni doğal bitki bileşikleri ve bitki özleri araştırılmaktadır (Fedotova vd., 2017; Savage vd., 2018).

Ferulik asit (FA), birçok yenilebilir tahıl, domates, tatlı mısır ve pirinç kepeği gibi meyve ve sebze de dahil olmak üzere çok sayıda bitki de yaygın olarak bulunan fenolik bir madde ve fitokimyasal olarak çalışmalarda karşımıza çıkmaktadır (Srinivasan vd., 2007; Lenzi vd, 2015). Doğal bir fitokimyasal olan ferulik asitin, ticari olarak kolay bulunabileceği bildirilmiştir. Düşük maliyetli olması ve ciddi yan etkisinin olmaması gibi nedenlerle tedavilerde karşımıza çıkmaktadır. Ferulik asidin terapötik etkilerine; antioksidan ve antiinflamatuvar özelliklerinin aracılık ettiği yapılan çalışmalarda bildirilmiştir. Anti-apoptotik, anti-kanserojen, anti-diyabetik, hepatoprotektif, kardiyoprotektif, nöroprotektif gibi farklı biyolojik aktiviteleri gösterdiği bulunmuştur (Ghosh vd., 2017). Ayrıca yapılan birçok çalışma da depresyonun da tedavisinde de faydalı olduğu belirtilmektedir (Zhang vd., 2011; Xu vd., 2013; Lenzi vd., 2015; Zeni vd., 2012; Chen vd., 2015; Zeni vd, 2017; Li vd., 2015; Liu vd., 2017). Ferulik asitin

anksiyolitik benzeri etkisi olduğu yönünde de çalışmalar bildirilmiştir (Sandeep vd., 2018, Kotwal vd., 2015).

Ferulik asitin biyoyararlanımı incelendiğinde insanlarda ve deney hayvanlarında biyoyararlanımının düşük olduğu deneysel çalışmalarda görülmüştür (Govindaswamy, 2015). Ratlarda %9-20, insanlarda yaklaşık olarak %20 olduğu görülmektedir (Mancuso ve Santangelo, 2014).

Ferulik asitin biyoyararlanımını arttırmak için biyolojik olarak geçimli olan ve dokulara etkin madde hedeflemesinin yapılabildiği katı lipit nanopartikül formülasyonu hazırlanacaktır ve akut ve subkronik formda verilecektir ve bu doğrultuda var olan anksiyolitik etkideki değişimin incelenmesi amaçlanmaktadır.

Katı lipit nanopartiküller; lipozomların, emülsiyonların ve katı partiküllerin avantajlarının kombinasyonunu içerdiği bildirilmiştir. Birçok avantaja sahip olduğu da bildirilmektedir (Demirel ve Yazan, 2000; Bummer, 2004).

Bu proje kapsamında ferulik asitin katı lipit nanopartikül ilaç taşıyıcı sistemi formülasyonu hazırlayarak akut ve subkronik uygulamada biyoyararlanımının artırılması ve beklenen anksiyolitik terapötik etkisinin de bu doğrultuda artırılması hedeflenmektedir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Anksiyete

İnsanların çoğu sağlık, para, aile sorunları gibi yaşam koşulları ile ilgili günlük hayatında kaygı yaşadığını bildirmiştir. İnsanların günlük yaşamlarında ara sıra kaygının olması normaldir ancak yapılan çalışmalarda görüldüğü gibi anksiyete bozukluğu, normalde yaşanandan daha fazla endişe veya korku halini içerdiği belirtilmiştir. Anksiyete bozukluğu olan insanlarda yaşadıkları kaygının ortadan kalkmayacağı daha da zamanla kötüleşebileceği bildirilmiştir. Anksiyete bozukluğu hastaların günlük aktivitelerini de olumsuz etkileyen yaygın bir psikiyatrik bir rahatsızlık olduğu görülmüştür (http-1; Munir vd., 2019). Anksiyete bozukluğunun oluşumunda rol oynayan en önemli bölüm beynin temporal lobunda bulunan amigdala olduğu yapılan çalışmalarda görülmüştür (Davis, 1994). Depresyonu olan hastaların genellikle anksiyete bozukluğuna da sahip olduğu bildirilmektedir (Tiller; 2013).

Çeşitli anksiyete bozuklukları tanımlanmıştır. Sıklıkla karşılan anksiyete bozuklukları arasında yaygın anksiyete bozukluğu, sosyal anksiyete bozukluğu, panik bozukluğu ve sosyal fobiler sayılabilir. Diğer anksiyete bozuklukları arasında agorafobi, seçici konuşmazlık, ayrılık anksiyetesi bozukluğu ve madde/ilaç kaynaklı anksiyete bozukluğu yer almaktadır (Moini vd., 2021). Anksiyetenin belirtileri arasında çarpıntı, nefes alma da zorluk, hızlı hızlı nefes alma, ellerde ve ayaklarda titreme, aşırı terleme gibi belirtilerin yanında psikolojik özellikler olarak sıkıntı, heyecan, aniden çok kötü bir şey olacakmış hissi ve korkusu sayılabilir (Karamustafalıoğlu ve Yumrukçal,2011). Sempatik sinir sisteminin anksiyetede görülen semptomların çoğuna aracılık ettiği bildirilmektedir (Chand vd., 2021; Hang vd., 2015). Anksiyete bozukluğunun etiolojisinde genetik, nörobiyolojik ve psikososyal faktörler bulunur (Zwanzger, 2016). Anksiyete bozukluğunun nörobiyolojik faktörlerinin arasında noradrenalin, serotonin, dopamin, glutamat gibi nörotransmitterlerin işlev bozuklukları, gama-aminobütirik asit (GABA), kolesistokinin (CCK) ve renin-anjiyotensin sistemi-hipotalamik-hipofiz-adrenal (RAS-HPA) eksenin hiperaktivasyonun olduğu düşünülmektedir. Bu işlev bozuklukları psikofarmakolojik yaklaşımların hedefleri olmuştur (Melaragno vd., 2020; Daugé ve Léna, 1998; Balthazar vd., 2021).

2.2. Anksiyete Oluşumunda Rolü Olan Temel Nörotransmitter Sistemler

Anksiyete bozukluklarının patolojik özelliklerinin altında yatan mekanizmalar henüz tam olarak aydınlatılmadığı bildirilmiştir (Nemeroff, 2003). Ancak hayvan çalışmalarında anksiyolitik ilaçların temelinde üç büyük nörotransmitterin etkisi olduğu bildirilmiştir. Bunlar, noradrenerjik (NA) sistem, serotonin (S) ve gama aminobütirik asit (GABA)'dır (Özakkaş, 2014).

2.2.1. GABAerjik sistem

GABA (Gama aminobütirik asit)'nın birçok fizyolojik ve psikolojik durumlarda etkili ana inhibitör nörotransmitter olduğu çalışmalar ile kanıtlanmıştır (Mombereau vd., 2004). Anksiyete bozukluklarının patofizyolojisinde önemli bir rol oynadığı bilinen en yaygın araçlardan biri amigdaladaki GABA nörotransmisyonunun olduğu bildirilmiştir. Yapılan hayvan çalışmalarında amigdala'ya GABAerjik sistem nörotransmisyonu; GABA veya GABA reseptör agonistleri, anksiyolitik benzeri etki gösterirken, GABA antagonistleri anksiyojenik benzeri etki gösterdiği bulunmuştur (Nemeroff, 2003; Nuss, 2015).

2.2.2. Noradrenerjik sistem

Locus coeruleus'un nöronları, tüm ön beyin aktivitelerinde anahtar rol oynayan nöromodülatör noradrenalinin tek kaynağı olduğu bildirilmiştir (Sara, 2009). Locus coeruleus noradrenerjik sistemindeki, düzensizliğin psikiyatrik bozukluklarda etkili olduğu düşünülmektedir (Berridge ve Waterhouse, 2003). Locus coeruleusda noradrenerjik nöronların artışı, anksiyete benzeri davranışa neden olabileceği yapılan çalışmalarda bildirilmiştir (McCall vd., 2017).

2.2.3. Serotonerjik sistem

Serotonin (5-hidroksitriptamin,5-HT), hem periferde otakoid etkili hem de beyinde nörotransmitter olarak çalışabileceği düşünülmektedir (Mosienko vd., 2012). Serotonin uyku, iştah ve ruh hali gibi birçok süreci düzenlediğinden serotonerjik sistem majör depresyon ve anksiyete gibi psikiyatrik bozuklukların tedavisinde önemli olabileceği bildirilmiştir (Zmudzka vd., 2018). Yapılan çalışmalarda, medyan rafe çekirdeği (MRN) içindeki serotonin nöronlarının dorsal hipokampus içindeki serotonerjik sinyalleme yolu ile anksiyojenik bir durumu neden olduğu görülmüştür (Abela vd., 2020). Anksiyete de etkili serotonerjik reseptörler; 5-HT_{1A}, 5-HT_{1C} ve 5-HT₂ olduğu bildirilmiştir (Baldwin ve Rudge, 1995).

2.2.4. Dopaminerjik sistem

Dopaminerjik sistemin sosyal davranış, öğrenme gibi birçok süreçte ayrıca sosyal anksiyolitik bozuklukta etkili olabileceği öne sürülmüştür (Cervenka vd., 2012). Hem dopamin D₁ hem de D₂ reseptör mekanizmalarının, anksiyete üzerine etkili olabileceği bildirilmiştir (Zarrindast ve Khakpai; 2015).

2.2.5. Glutamat

Basit bir molekül olan glutamatın, limbik sistemde anksiyolitik etkisinden iyonotropik ve metabotropik glutamat reseptörlerinin kombinasyonunun aracılık edeceği belirtilmiştir. Klinik öncesi çalışmalar, NMDA/AMPA/kâinat ve metabotropik reseptörlerde aktif bileşiklerin anksiyolitik etkili olduğu bildirilmiştir. Günümüze kadar yapılan deneylerin NMDA reseptörleri üzerinde olduğu belirtilmiştir. NMDA/AMPA/kâinat reseptörleri antagonistlerinin kullanımının ciddi yan etkiler yaratabileceği için kullanılmaması gerektiği bildirilmektedir (Bergink vd., 2004).

2.2.6. Nitrik oksit

Nitrik oksitin anksiyete benzeri davranışları iyileştirme de önemli rol oynayan bir nörotransmitter olabileceği düşünülmektedir (Gulati vd., 2017). Stresli uyaranlara maruz kalındığında nitrik oksit sentazın (NOS) aktive olduğu bildirilmiştir (Kumar ve Chanana, 2017). Yapılan bir çalışma da NOS inhibitörü madde olan 7-nitroindazolün (7-NI) EPM testinde açık kollarda harcanan süreyi ve açık alana geçiş sayısının yüzdesini önemli bir şekilde arttığı gözlenmiştir. Uygun dozlarda diğer deneysel anksiyete modellerinde de anksiyolitik etki gösterdiği düşünülmektedir (Volke vd., 1997).

2.2.7. Kolesistokinin (CCK)

CCK'nın stresli uyaranlara karşı etkili olabileceği bildirilmiştir. Ayrıca, birkaç seçici CCK-B agonisti anksiyojenik benzeri etki gösterirken, CCK-B antagonistleri, çeşitli anksiyete modellerinde anksiyolitik benzeri etki gösterdiği belirtilmiştir. CCK'nın bağlanma bölgesinde bulunan CCK-B₁ anksiyete bozukluğunda etkili olduğu bildirilmiştir (Daugé, ve Léna,1998). Yapılan bir çalışma da CCK'nin yükseltilmiş artı labirent testinde anksiyolitik benzeri etkisi incelenmiştir. Anksiyolitik benzeri etkisi incelendiğinde seçici CCK-B reseptörü antagonistleri anksiyolitik benzeri etkisi CCK-A reseptörü antagonistinin anksiyolitik benzeri etkisinden daha yüksek olduğu belirtilmiştir (Singh vd., 1991).

2.2.8. RAS-HPA eksenini (Renin-anjiotensin sistemi/ Hipotalamik-pituitary-adrenal eksenini)

RAS-HPA ekseninin deney hayvanları üzerinde yapılan bir çalışmasında stresli uyarılara maruz kalma sırasında görülen anksiyete bozukluğunda incelendiğinde, RAS-HPA ekseninin aşırı aktivasyonu sonucu AT₁ reseptörü agonistlerinin anksiyojenik benzeri etki gösterdiği, AT₁ reseptör antagonistlerinin anksiyolitik benzeri etki gösterdiği bulunmuştur (Balthazar vd., 2021).

2.3. Anksiyete Tedavisi

Anksiyete bozukluklarının tedavisinde psikoterapi, farmakoterapi veya her iki tedavinin birlikte kullanıldığı bildirilmiştir. Tedavinin; hastalığın şiddeti, komorbiditeler, eşlik eden hastalıklar, madde kullanımı, intihar riski, önceki tedavi geçmişi, etkinlik, yan etkiler, etkileşimler, maliyetler ve hastanın tercihi göz önünde bulundurularak hazırlanması gerektiği belirtilmiştir (Bandelow vd., 2017; Brahmbhatt vd., 2021).

2.3.1. Psikoterapi

2.3.1.1. Bilişsel davranışçı terapi

Farmakolojik olmayan tedavilerden olan bilişsel(kognitif) davranışçı psikoterapi türü semptomları azaltmada en çok araştırmaya konu olan tedavi türü olarak belirtilmiştir (Bandelow vd., 2017). İnsanlarda gözlenen anksiyete bozukluğuna ve korku veren durumlara karşı farklı düşünme ve farklı tepki verme durumlarında etkili olduğu görülmüştür (http-1). İlaç tedavisinin psikolojik tedavilerle kombinasyon şeklinde birlikte kullanılabilmesi bildirilmiştir. Seçici serotonin geri alım inhibitörlerinin (SSRI), pregabalin veya serotonin-noradrenalin geri alım inhibitörleri (SNRI) gibi ilaçların bilişsel-davranışçı terapi ile birlikte anksiyete bozukluklarının tedavisinde ilk tercih edilen ilaçlar olarak kullanılabilmesi bildirilmiştir (Cloos ve Ferreira, 2009).

2.3.1.1.1. Maruz kalma tedavisi

Maruz kalma tedavisinin, anksiyete bozukluğunun altında yatan insanların yapmaktan kaçındıkları davranışları ve korkularıyla yüzleşmesini temel alan sosyal anksiyete bozukluğunun tedavisinde kullanıldığı bildirilmiştir (http-1).

2.3.1.2. Farkındalık ve kabul temelli psikoterapiler

Farkındalık ve kabul temelli psikoterapilerin, yaygın anksiyete bozukluğu, panik ve agorafobi bozukluğu gibi anksiyete bozuklukları içinde bir miktar etkinlik gösterdiği çalışmalarda bulunmuştur (Hoge vd., 2013; Dahlin vd., 2016; Crits-Christoph P vd., 2005; Gloster vd, 2015).

Psikodinamik terapinin yaygın anksiyete bozukluğu, panik bozukluğu ve sosyal anksiyete bozukluğu dahil olmak üzere çeşitli anksiyete bozuklukları için etkili bir tedavi yöntemi olarak kullanılabileceği bazı araştırmalarda kanıtlanmıştır (Crits-Christoph P. vd, 2005; Milrod vd., 2007; Leichenring vd., 2013). Bunların yanında doğal yöntem kullanarak yapılan anksiyolitik tedavilerde mevcuttur ve hastalara güvenle önerilebileceği bildirilmiştir. Son zamanlarda farkındalık temelli stres azaltma, meditasyon ve yoga çalışmalarına odaklanılmıştır. Bu tedavilerin anksiyetesi olan hastalara güvenle kullanılabileceği düşünülmektedir (Saeed vd., 2019).

2.3.2. İlaç tedavisi

Çok sayıda anksiyolitik ilaç sınıfının bulunmasına rağmen, bu anksiyolitik ilaçların hastalık semptomlarını tam olarak iyileştiremediği bildirilmiştir. Bu ilaçların klinik kullanımında birçok yan etki ortaya çıkmıştır ve tolere edilebilirliğinin düşük olduğu görülmüştür (Fajemiroye vd., 2016).

2.3.2.1. Serotonin-noradrenalin geri alım inhibitörleri

Anksiyete bozukluğunun tedavisindeki yerine bakıldığında yarar/zarar oranına göre birinci basamak tedavisinde kullanılan ilaçlar arasında sitalopram, essitalopram, fluoksetin, fluvoksamin, paroksetin ve sertralin gibi seçici serotonin geri alım inhibitörlerinin (SSRI); ve venlafaksin ve duloksetin gibi serotonin-noradrenalin geri alım inhibitörlerinin (SNRI) olduğu bildirilmiştir (Bandelow, 2020). Bu ilaçların ilk kullanıldığı zaman anksiyete bozukluğunun semptomların da artışa neden olabilecekleri ve 2-4 haftaya kadar bazı durumlarda 6 haftaya kadar uzayan yan etkiler görülebileceği belirtilmektedir. Ciddi olmamakla birlikte çeşitli yan etkileri vardır. SSRI ların yan etkileri arasında; gastrointestinal bozukluklar, baş ağrısı, sedasyon, uykusuzluk, kilo alımı, aşırı terleme, parastezi ve cinsel işlev bozukluğu bildirilmiştir. Fluoksetin, fluvoksamin ve paroksetin gibi SSRI'lar ve SNRI ilaçların sitokrom P450 inhibitörü olabileceği ve diğer ilaçlar ile farmakokinetik etkileşime girebileceği konusunda görüşler

vardır. Yine yan etki olarak sertralin ve paroksetin gibi SSRI'ların tedavisinin kesildikten sonra geri çekilme sendromuna neden olabileceği konusunda çalışmalar da vardır. Sertralin ve paroksetinin yoksunluk oranı fluoksetinden daha fazla bulunmuştur (Muscatello vd., 2012; Stahl vd., 1997; Bandelow vd., 2022; Masand ve Gupta, 1999).

2.3.2.2. Benzodiazepinler

Türkiye'de bulunan müstahzarlarının diazepam, klordiazepoksit, lorazepam ve alprazolam olduğu bildirilmiştir. Etki mekanizmasının, GABA_A (Gama aminobütirik asit-A) reseptörlerinin kendine özgü bağlanma yerlerine bağlanarak GABA_A'yı aktive edeceği belirtilmiştir. Bu kapsamda reseptöre kenetlenmiş Cl⁻ iyon kanalını açtığı bildirilmiştir. Nöronlar üzerinde benzodiazepinlerin etki gösterebilmesi için ortamda GABA'nın bulunmasının gerekli olduğu bildirilmiştir. Ortamdaki GABA düzeyinin artması benzodiazepinlerin etkinliğini de paralel olarak arttıracığı belirtilmiştir (Kayaalp, 2012). Anksiyete bozukluğunun tedavisinde etkili olmaları ve genellikle anksiyete bozukluğu için reçete edilen diğer antidepresan ilaçlardan daha hızlı etki göstermeleri benzodiazepinlerin avantajları arasına sayılabilir. Uzun süreli kullanımlarında tolerans oluşturmaları ve aynı anksiyolitik etkiyi oluşturabilmek için daha yüksek dozlara ihtiyaç duyulması gibi dezavantajları bildirilmiştir (http-1). Diazepam, alprazolam ve lorazepam gibi anksiyete bozukluğu tedavisinde kullanılan benzodiazepinlerin, bağımlılık yapabilme potansiyelleri olduğu için rutin kullanımda önerilemeyeceği belirtilmiştir (Bandelow, 2020; Muscatello vd., 2012). Benzodiazepin kullanımı aniden bırakılırsa, yoksunluk semptomlarının gözlenebileceği veya anksiyete bozukluğu tekrarlayabileceği bildirilmiştir. Bu nedenle, benzodiazepin dozunun yavaş yavaş azaltılarak bırakılması gerektiği belirtilmiştir. (http-1).

2.3.2.3. Diğer tedavi seçenekleri

Diğer tedavi seçenekleri arasında kalsiyum kanal modülatörü pregabalin, imipramin ve klomipramin gibi trisiklik antidepresanlar, buspiron, moklobemid ve geri dönüşümsüz monoamin oksidaz (MAO) inhibitörleri bulunur. Buspiron, trisiklik antidepresanlar (TCA'lar), monoamin oksidaz A (MAO-A) 'nın geri dönüşümlü inhibitörü, moklobemid ve geri dönüşümsüz monoamin oksidaz inhibitörleri (MAOI'ler) gibi ilaçların, genellikle daha önceki tedavilere yanıt vermeyen hastalar için kullanılacağı bildirilmektedir (http-1).

2.3.2.3.1. Buspiron

Özellikle kronik anksiyete bozukluğu tedavisi için kullanıldığı bildirilmektedir (http-1). Etki mekanizması tam olarak aydınlatılamamıştır. 5HT₁ reseptörlerinin parsiyel agonistidir ve anksiyete bozukluğu tedavisinin bu reseptör üzerinden olduğu düşünülmektedir. Buspironun benzodiazepin reseptörlerini ve GABA bağlanmasını etkilemediği gösterilmiştir. Benzodiazepinler gibi antikonvülsif, sedasyon ve kas gevşetici etkisinin olmadığı bilinmektedir. Buspironun, serotonin ve asetilkolin nörotransmitterlerinin aktivitesini düşürdüğü halde spesifik noradrenerjik ve dopaminerjik yollar üzerinde aktivasyonu arttıracakları düşünülmektedir. Günde 2 ya da 3 defa 5 mg verilebileceği gibi görüşler vardır. Maksimum dozu 45 mg geçmemesi gerektiği bildirilmektedir. En sık gözlenen yan etkileri arasında; sersemlik, baş dönmesi, baş ağrısı, heyecan, sinirlilik, serotonin sendromu, döküntü, diyare, mide bulantısı, kaslarda zayıflık, uyuşma, koordinasyon bozukluğu, bulanık görme bildirilmiştir (RxMediaPharma, 2023; Taylor, 1988). Buspironun, sedasyon ve fiziksel bağımlılığa neden olmadan anksiyolitik etki göstereceği konusunda bilgiler vardır (Eison ve Temple, 1986; Goldberg ve Finnerty, 1979).

2.3.2.3.2. Hidroksizin

Hidroksizin, anksiyete tedavisi için kullanılan FDA tarafından onaylı en güçlü H₁ reseptör blokörü olarak bildirilmektedir (Guaiana vd., 2010; RxMediaPharma, 2023). Yaygın gözlenen yan etkileri arasında baş ağrısı, ağız kuruluğu, halsizlik, sedasyon olduğu bildirilmiştir (RxMediaPharma, 2023).

2.3.2.3.3. Beta blokörler

Beta bloker ilaçlar sıklıkla antihipertansif olarak kullanılsa da, hızlı kalp atışı ve titreme gibi anksiyetenin semptomlarını azaltmaya yardımcı olmak için de kullanılabilir (http-1). Propranolol anksiyete bozukluğu ve anksiyete bozukluğuna bağlı taşikardi tedavisinde kullanılan bir beta blokör olarak belirtilmektedir (RxMediaPharma, 2023).

2.3.2.3.4. Pregabalin

Pregabalinin inhibitör bir nörotransmitter madde olan GABA'ya benzediği düşünülmüştür. Ancak etkisinin GABA üzerinde etkili olmadığı görülmüştür. "Aşırı uyarılmış" presinaptik nöronlarda P/Q tipi voltaj kapılı kalsiyum kanalının alfa-2-delta

alt birimine yüksek affinite ile bağlanması anksiyete bozukluğu tedavisine aracılık ettiği görülmüştür. Böylece yapılan çalışmalarda glutamat gibi uyarıcı nörotransmitterlerin salınımını azalttığı bildirilmiştir (Baldwin vd., 2013). Yapılan bir çalışma da pregabalin baş dönmesi ve somnolans (uyuklama) gibi yan etkilerine neden olmasına rağmen yaygın anksiyete tedavisinde etkili olabileceği gösterilmiştir. 65 yaş üzeri hastalarda dikkatli kullanılması gerektiği bildirilmektedir (Wensel vd., 2012).

2.3.2.3.5. Monoamin oksidaz (MAO) inhibitörleri

Araştırmacılar tarafından MAO'nun iki izoformu olduğu belirtilmiştir. MAO-A'nın serotonin, noradrenalin ve adrenalin yıkımından sorumlu olduğu, MAO-B'nin ise dopamin, beta feniletilamin ve benzilamin yıkımından sorumlu olduğu bildirilmektedir. Bu kapsamda MAO-A'nın inhibisyonunun depresyon ve anksiyete bozukluklarında etkili olduğu ve tedavi yöntemi olarak kullanılabileceği ileri sürülmüştür. Tiraminin hem MAO-A hem de MAO-B için substrat olduğu belirtilmektedir. Seçici olmayan MAO inhibitörlerinin hem MAO-A yı hem de MAO-B yi inhibe ederek tiraminin ilk geçiş metabolizmasına etkili olabileceği konusunda görüşler mevcuttur. Bu kapsamda seçici olmayan MAO inhibitörlerinin tiramin birikimine peynir reaksiyonları denen tehlikeli hipertansif krize neden olabileceği düşünülmektedir. Agorofobi gibi anksiyete bozukluklarının tedavisinde MAO inhibitörlerinin etkili olduğu bulunmuştur. Tedavinin genellikle uzun süreli olduğu ve farmakolojik bağımlılık gelişebileceği konusunda görüşler vardır (Tyrrer ve Shawcross, 1988; Yamada ve Yasuhara, 2004).

2.3.2.3.6. TCA (Trisiklik antidepresanlar)

TCA'ların hem noradrenalin hem de serotoninin geri alımını inhibe edeceği yapılan çalışmalarla kanıtlanmıştır (Koen ve Stein, 2022). Klomipramin ve imipraminde genellikle tedavinin 2-3. haftasında anksiyolitik etkinin ortaya çıkacağı deneyler sonucunda bildirilmiştir. Fobi ve panik atak tedavisinde kullanılabileceği konusunda yapılan çalışmalar bildirilmiştir. İştah artışı, huzursuzluk, sersemlik, tremor, baş ağrısı, uyuklama hali, akomodasyon bozukluğu, bulanık görme, kulak çınlaması, sinüs taşikardisi, çarpıntı, ortostatik hipertansiyon, kalp rahatsızlığı olmayan hastalarda EKG değişiklikleri, sıcak basması, bulantı, ağız kuruluğu, kabızlık, yorgunluk, hiperhidroz, kas zayıflığı, idrar yapma bozukluğu, lipido bozukluğu gibi yan etkileri bildirilmiştir. İmipraminin, noradrenalin ve serotonin geri alımını aynı derecede inhibe edeceği bildirilmektedir (RxMediaPharma, 2023)

Yeni tedavi stratejilerinde, GABA, glutamat ve diğer nörotransmitter sistemler üzerine odaklanılmıştır. Ancak hastalığın semptomlarının azaldığı veya kaybolduğu dönem sonrasında ilaçlara 6-12 ay süre devam edilmesi gerektiği bildirilmiştir (Bandelow, 2020; Muscatello vd., 2012).

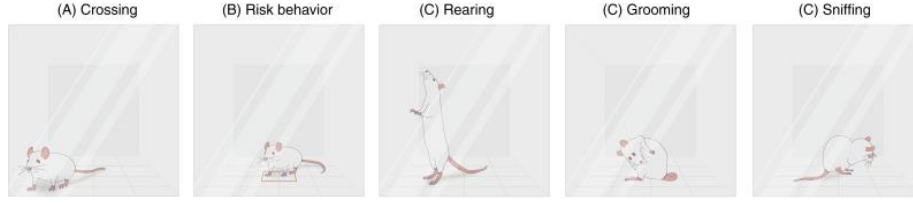
Günümüzde anksiyete bozukluğu tedavisinde kullanılan ilaçların hemen hemen hepsi hasta da sedasyon, bilişsel bozukluk, ataksi, saldırganlık, cinsel işlev bozukluğu, tolerans ve bağımlılık gibi çok sayıda ve sıklıkla gözlenen ciddi yan etkilere neden olduğu bildirilmiştir. Uzun süreli uygulamadan sonra ilaç kullanımını sonlandırma da yoksunluk (çekilme) sendromlarının gözlenmesi bu ajanların kullanımını sınırladığı konusunda düşünceler vardır (Singh ve Singh, 2002). Anksiyete bozuklukları için kullanılan mevcut ilaçların, verimlilik ve tolere edilebilirlik açısından yetersiz olduğu konusunda çalışmalar vardır. İlaçların kötüye kullanımına, terapötik etkinin gecikmesine, bağımlılığa ve toleransa yol açması iyileştirilmiş ilaç tedavilerine duyulan ihtiyacı vurgulamaktadır (Sartori ve Singewald, 2019; Agatonovic-Kustrin vd., 2020). Yan etkileri ve ilaç etkileşimlerinin olması, dar bir güvenlik marjının olması ve suistimal edilmesi gibi durumların gözlenmesi birçok araştırmacıyı daha az yan etkileri olan diğer anksiyolitik ilaçları belirleme umuduyla yeni bileşikler değerlendirmeye ittiği bildirilmektedir (Baldwin vd., 2013; Lader ve Kyriacou, 2016; Grundmann vd., 2007; Grundmann vd., 2009; Thanacoody ve Thomas, 2005). Anksiyete semptomlarını azaltmak için kullanılan geleneksel doğal ilaçların kullanımının kapsamlı olduğu belirtilmektedir. Anksiyete bozukluğunun tedavisinde kullanılmak üzere yeni doğal bitki bileşikler ve bitki özleri araştırılmakta olduğu belirtilmektedir (Fedotova vd., 2017; Savage vd., 2018).

2.4. Anksiyete Bozukluklarının Hayvan Modelleri

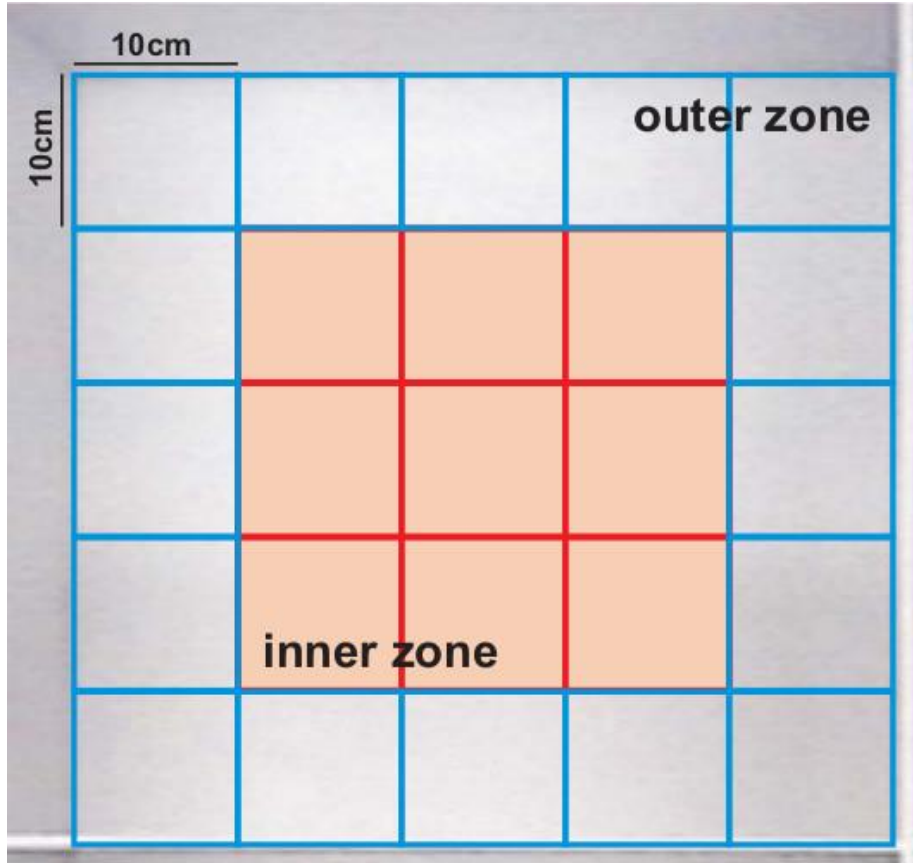
2.4.1. Açık alan testi (Open-field area test)

Open-field area testi, keşif ve lokomotor aktivitenin yanı sıra anksiyete bozukluğunun araştırılmasında yaygın olarak kullanılan bir test olarak çalışmalarda kullanıldığı bildirilmektedir (Archer, 1993; Walsh ve Cummins, 1976; Seibenhener vd., 2015). Anksiyete araştırmalarının yanında sedasyon, hiperaktivite ve lokomotor aktivitenin kalitatif ve kantitatif ölçümü için de kullanılması öngörülmüştür (Prut ve Belzung, 2003; Valvassori vd., 2017). Open-field area testinin kare, dikdörtgen veya daire şeklinde etrafı duvarlarla çevrili bir düzenden oluştuğu bildirilmiştir. Yapılan çalışmalarda genellikle test düzeneğinin üst kısmının açık bırakılacağı belirtilmiştir. Deney düzeneğinin ortasına

yerleştirilen hayvan etrafını dolaşıp çevresini keşfederken hareketlerinin kaydedileceği bildirilmiştir. Deney tamamlandıktan sonra bilgisayar izleme programlarının hayvanın zaman içindeki hareketlerinin analizini yaptığı bildirilmiştir (Carter ve Shieh, 2015). Open-field area testinin şartsız korku oluşturan anksiyete modeli olduğu belirtilmektedir. Open-field area testinde hayvanın kendi ortamından farklı bir ortamda bulunduğu için huzursuz olacağı ve etrafı keşfetme isteği ile lokomotor aktivitesi artacağı bildirilmiştir (Küçük vd., 2005). Fotofobikliği nedeniyle, hayvan parlak aydınlatılmış açık alanlardan ve merkezden kaçınıp duvarlara yakın kalmayı tercih edeceği yapılan çalışmalarda görülmüştür. Bu nedenle duvardan uzaklık belirlenirken keşif veya lokomotor davranışın ölçülmesi gerektiği ve idrara çıkma ve dışkılama gibi otonomik aktivitelerin de değerlendirilmesi gerektiği bildirilmiştir (Fuchs ve Flügge, 2022). Deney düzeneğinde kat edilen toplam mesafenin (genel aktivitenin bir ölçüsü), hareket için harcanan zamanın, şahlanma sayısının, süslenme davranışının (uzun süreli tüylerini temizleme davranışı) ve hayvanın merkezden kaçınma eğiliminin ölçülmekte olduğu bildirilmektedir. Deney hayvanlarının açık bir alanda keşfetmeye meyilli oldukları bilinmektedir. Tigmotaksis adı verilen bu hareket anksiyete parametresi olarak deneysel çalışmalarda kullanılmakta olduğu bildirilmektedir. Farelerin ve sıçanların tigmotaksis adı verilen parametre ile duvara yakın yerde yürüyeceği bilinmektedir (Prut ve Belzung, 2003). Test düzeneğinin merkezinde geçirilen sürenin azalması anksiyete bozukluğunun göstergesi olduğu bildirilmiştir (Simon vd.,1994). Yapılan çalışmalarda anksiyete ölçümlerinde merkezde kalma süresi 5 dakikalık süre için incelenmiştir (Gould vd., 2009; Lipkind vd., 2004; Aynur ve Görmüş, 2018). Locomotor aktivitenin çizgi geçme sayısı (line crossing), çevreyi keşfetme sayısı (rearing) ve arka ekstremiteleri üzerinde yükselmeye değerlendirileceği bildirilmiştir. Kaçınma ve defekasyon sayısının otonom fonksiyonların değerlendirilmesinde kullanılan parametreler olduğu düşünülmektedir (Küçük vd., 2002). Hiperaktivite, şahlanma(rearing) ve geçiş(crossing) davranış parametreleriyle değerlendirildiği bildirilmektedir. Geçiş (Crossing) hayvanların lokomotor aktivitesinin ölçülmesini sağlamak için kullanılan test süresi boyunca toplamda geçilen kare sayısını ifade ettiği belirtilmiştir. şahlanma davranışının (rearing) test süresi boyunca kemirgen tarafından keşfetmek amacıyla benimsenen dik duruşların toplam sayısı olduğu bildirilmiştir.



Şekil 1. Açık alan (Open-field area) testinde kullanılan parametreler (Valvassori vd.,2017).



Şekil 2. Açık alan (Open-field area) testi.

Dış bölge 16 bloktan, iç bölge ise 9 bloktan oluşmaktadır. Labirentin orta bölgesini tercih etmeyip kenarlardan ilerlemesi(tigmotaksis) anksiyetenin arttığını gösterir (Seibenhener ve Wooten;2015).

2.4.2. Yükseltilmiş artı labirent testi (Elevated plus maze test, EPM)

Elevated plus maze testi anksiyete bozukluğunun tanımlanması için 2 açık kol ve 2 kapalı koldan oluşan bir yöntem olarak tanımlanmıştır (Pellow vd., 1985). Son 24 yılda, Elevated plus maze testi, anksiyete bozukluğu tedavisinde kullanılan ilaç etkilerini araştırmak için en yaygın kullanılan hayvan modeli olarak bildirilmiştir (Hogg, 1996; Rodgers, 1997). Test düzeneğinde anksiyete benzeri davranışın açık koldan kaçınması ile değerlendirilirken; lokomotor aktivitesin en güvenilir şekilde kapalı kol girişlerinin

sıklığı ile ölçüldüğü bildirilmektedir (Holmes vd., 2000). Deney düzeneğinde kemirgen kafası açık bir kola bakacak şekilde labirent platformunun ortasına farenin yerleştirilmesi gerektiği bildirilmektedir. Hayvanlar, sadece bir kez 5 dakika boyunca tek tek test edileceği ve çalışma süresince her bir denekten sonra, düzenekteki idrar ve dışkı kalıntıları %70'lik etanol ile temizlenmesi gerektiği belirtilmektedir (Yoon, 2007). EPM'ye yerleştirilen deney hayvanlarının 5 dakika süre ile açık ve kapalı kol giriş sayısı, açık ve kapalı kollarda geçirilen toplam süresinin ölçülmesi gerektiği belirtilmektedir (Andreatini ve Bacellar, 1999). Deney hayvanlarında anksiyete bozukluğu belirtileri, açık kol için harcanan zamanın toplam süreye bölünmesiyle ve açık kol giriş sayısının toplam kol girişi sayısına bölünmesiyle elde edileceği belirtilmiştir (Carobrez ve Bertoglio, 2005). Yapılan çalışmalarda da görüldüğü gibi anksiyolitik bileşikler açık kollarda harcanan zamanın yüzdesini ve/veya açık kollara giriş yüzdesini seçici olarak arttıracakları bildirilmiştir, anksiyojenik bileşikler ise harcanan zaman yüzdesini ve/veya açık kollara giriş yüzdesini seçici olarak azaltacakları bildirilmiştir (Andreatini ve Bacellar, 1999). Spontan lokomotor aktivitesinin ise, yükseltilmiş artı labirent testinin kollarındaki toplam giriş sayısı ile değerlendirileceği belirtilmiştir (Pellow vd., 1985).

2.4.3. Yükseltilmiş 0 testi (Elevated zero maze= EZM)

Bu test yönteminin yükseltilmiş artı labirent testinin modifiye şekli olduğu bildirilmektedir. Elevated plus maze testinin merkezinde harcanan zamanın yorumlanmasındaki herhangi bir belirsizliği ortadan kaldıran ve keşif davranışına izin veren, karşılıklı iki kapalı kadrın ve iki açık olan yükseltilmiş bir dairesel platformdan oluştuğu belirtilmiştir (Shepherd vd., 1994; Kulkarni vd., 2007).

2.4.4. Yükseltilmiş T testi (Elevated T maze=ETM)

Yükseltilmiş T-labirent testi düzeneği, zeminden 50 cm yükseltilmiş, eşit boyutta (50×12 cm) üç koldan oluştuğu bildirilmektedir. Bu kollardan biri 40 cm yüksekliğinde bir yan duvarlarla çevrelendiği ve karşılıklı iki açık kola dik olarak konumlandırıldığı bildirilmiştir. Test düzeneğinde kapalı kolun ucuna yerleştirildiğinde, sıçan, başını kapalı kolun duvarlarının ötesine uzatana kadar açık kolları göremez konumda olduğu belirtilmektedir (Graeff vd., 1998). Yükseltilmiş T-labirent testi hem koşullu hem de koşulsuz anksiyete oluşturmak için hayvan anksiyete modeli geliştirilmiş bir test olduğu bildirilmektedir (Jardim vd., 1999).

2.4.5. Aydınlık-karanlık kutu testi (Light-dark box test=LDB TEST)

Test düzeneğinin, aydınlık ve karanlık bölgeler olmak üzere iki kompartmandan oluştuğu bildirilmektedir Burada güvenilir bölgenin karanlık bölge olduğu, kemirgenlerin kaçındığı bölgenin ise aydınlık bölge olduğu deneysel çalışmalarda görülmüştür. Yapılan deneylerde test düzeneğinde fareler ayrı ayrı kapıya bakan karanlık bölgenin ortasına yerleştirilmiş ve aktivite 5 dakika süreyle kaydedilmiştir. Anksiyete modelleri çalışmalarında aydınlık bölgeye ilk geçiş zamanı (yani, sıçanın test düzeneğinde karanlık bölgeye ilk olarak yerleştirilmesinden tamamen aydınlık bölgeye geçmesine kadar geçen süre), aydınlık bölge de kalma zamanı ve aydınlık ve karanlık bölgelere toplam geçiş sayıları gözlemlenmiştir (Rodriguez-Landa vd., 2019; Mi vd. 2005; Takao ve Miyakawa, 2006). Deneyler de anksiyolitik parametre için aydınlık bölgeden karanlık bölmeye ilk geçişin gecikme süresi, iki bölge arasındaki geçiş sayısı, her bölgedeki hareket, karanlıkta (veya ışıktaki) geçirilen süre ve bazen şaşlanma sayısı ölçülmüştür. Genel olarak, karanlık bölgeye daha hızlı giren ve aydınlık bölgede daha az zaman harcayan farenin anksiyete bozukluğu benzeri davranış gösterdiği düşünülmektedir (HascoeT ve Bourin, 1998).

2.4.6. Delikli tahta testi (Hole-board test)

Hole-board (UGO Basile, İtalya), zeminde her biri 3 cm çapında 16 eşit aralıklı deliğe sahip gri Perspex panellerden (40 × 40 cm, 2.2 cm kalınlığında) oluştuğu bildirilmektedir. Hole-board test deneylerinde anksiyolitik benzeri etkinin değerlendirilebilmesi için kafa daldırma sayısının, keşfedilen delik sayısının ve ilk kafa daldırma süresinin kaydedileceği belirtilmektedir. Yapılan deneylerde hayvanlarda kafa daldırma sayısında artışın anksiyolitik benzeri etki gösterdiği gözlenmiştir. Bu kapsamda anksiyojenik benzeri etki gösteren ilaçların farelerin kafa daldırma sayısında bir azalışa neden olacağı bildirilmektedir (Takeda vd, 1998).

2.4.7. Emosyonel hipofaji (Hiponeofaji)

Hiponeofaji anksiyolitik benzeri etkinlik gösteren etkin maddelerin değerlendirilmesinde kullanılan bir test olarak kullanılmıştır (Dulawa ve Hen, 2005). Hiponeofajinin, anksiyete benzeri davranış gösteren hayvanlarda yemek yemeye başlamanın gecikmesi ile ölçülebileceği bildirilmektedir (Bannerman vd, 2002; Deacon ve Rawlins, 2005; Dulawa ve Hen, 2005; Finger vd., 2010). Hiponeofajinin değerlendirilmesinde açık bir alan veya yabancı bir kafes düzeneğinde beslenmenin gecikmesi veya/ve tüketilen miktarın ölçülmesini içerdiği bildirilmektedir. Yapılan deneylerde hayvanlar ya testten önce

gıdadan yoksun bırakıldığı ya da daha sonra test sırasında sunulan oldukça lezzetli bir gıda tüketmek üzere eğitildiği bildirilmektedir. Anksiyolitik ilaçların yemek yemeye başlamadaki gecikmeyi azalttığı, yemek tüketimini arttırdığı belirtilmektedir. Anksiyojenik ilaçların yemek yemeye başlamadaki gecikmeyi arttırdığı, yemek yeme tüketimini azalttığı bildirilmektedir (Dulawa ve Hen, 2005).

2.4.8. Sosyal etkileşim testi

Sosyal etkileşim testinin anksiyete bozukluğu tedavisinde kullanılacak etkin maddelerin değerlendirmesinde kullanılmak üzere 33 yıl önce geliştirildiği bildirilmektedir (File ve Hyde, 1978). Deney prosedüründe deney hayvanlarının serbestçe etkileşebileceği bir alanda sosyal etkileşimde buldukları süre, sosyal temas sıklığı ve ilk temasa kadar geçen sürenin kaydedileceği belirtilmektedir (Aynur ve Görmüş, 2018; Rex vd., 2004). Sosyal etkileşim testi hem anksiyolitik benzeri etkiyi hem de anksiyojenik benzeri etkiyi ölçmede kullanılabilen çalışmaları kanıtlanmıştır. Sosyal etkileşimdeki bir artış anksiyolitik benzeri etkinin göstergesindeyken, sosyal etkileşimdeki bir azalma anksiyojenik benzeri etkinin göstergesi olduğu bildirilmiştir (Kumar vd., 2013). Birbirlerine yabancı olan deney hayvanlarının çiftler halinde test düzeneğinde yapılan çalışmalarında açık bir alana yerleştirilerek arenanın parlak bir şekilde aydınlatılmasıyla hayvanların sosyal etkileşimlerinin azalacağı düşünülmektedir. Anksiyolitik benzeri etki gösteren etkin maddenin genellikle sosyal etkileşimlerde harcanan zamanı arttıracığı düşünülmüştür (Fuchs ve Flügge, 2022).

2.4.9. Merdiven testi (Staircase test)

Yapılan çalışmalarda testte beş eşit ölçüde basamaktan oluşan (2,5 cm-10 cm-7,5 cm) tahta merdiven kullanılmıştır (Magaji vd., 2017). Merdiven testinin, beş basamaklı kapalı bir merdivene bir farenin yerleştirilmesiyle oluşan bir düzenek olduğu belirtilmektedir. Deney prosedürünün, test düzeneğinde 3 dakikalık bir süre de çıkılan basamakların ve yükselmelerin gözlemlenmesinden oluştuğu bildirilmektedir (Simiand vd., 1984).

2.4.10. Koşullu anksiyete testi

Koşullu anksiyete testi, hayvanların nötral veya hoş olmayan uyaranlara karşı tepkilerinin değerlendirildiği bir test olarak bildirilmektedir. Açlık/susuzluk ve ayak şoku gibi ceza alma arasındaki çatışmanın, anksiyolitik benzeri etki gösteren ilaçlar ile giderildiği belirtilmektedir (Freudenberg vd., 2018).

2.4.11. Geller-Seifter testi

Geller-Seifter testinin anksiyete tedavisinde kullanılan ilaçların değerlendirilmesinde yaygın olarak kullanıldığı belirtilmektedir (Howard vd., 1990).

2.4.12. Vogel çalışma testi

Vogel çalışma testi anksiyolitik benzeri etki gösteren ilaçların etkilerinin araştırılmasında kullanılabileceği düşünülmektedir (Millan ve Brocco, 2003). Yapılan çalışmalarda vogel çalışma testinde erkek sıçanlar 48 saat boyunca sudan mahrum bırakıldığı belirtilmektedir. Deney kafesinde su bulabilmeleri için basitçe eğitildikleri bildirilmektedir. Hayvanların su içmesine izin verildiği ve hayvanların su içmek için şişenin ağzı ile her 21. temasında zemindeki düzenek ile hayvana 0.5 mA kadar hafif bir elektrik şoku verildiği belirtilmektedir. Deney hayvanı belirli bir ölçüm süresi sonrasında su içmesinin elektirik şokuyla cezalandırılacağını bildiği belirtilmektedir (Vogel vd., 1971; Cryan ve Sweeney, 2011; Campos vd., 2013).

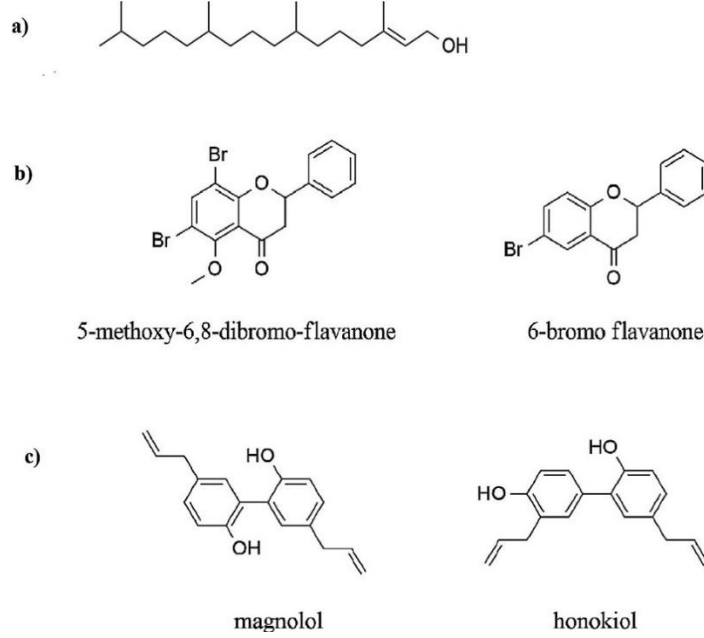
2.4.13. Spontan lokomotor aktivite testi

Hayvanların horizontal düzeyde yaptıkları hareket psikomotor aktivitenin ve anksiyetenin bozukluğunun bir göstergesi olduğu bildirilmektedir (Rojas-Carvajal vd., 2021). Spontan lokomotor aktivite testi spontan lokomotor aktiviteyi değerlendirmek için, pleksiglas, kafes şeklinde olan aktivite kafesi isimli cihazı kullanılır. Cihazın karşılıklı iki dikey kenarında bulunan parçalar kızıl ötesi ışınları üretmekte ve hayvan yatay ve dikey yönlerdeki hareketleri bu ışınları kesintiye uğratmakta ve bu şekilde fotosel yardımıyla kaydedildiği bildirilmektedir. Cihazın elektronik düzeneği ölçülen veriyi önceden belirlenmiş olan aralıklarla kaydetmekte ve yazdırmakta olduğu belirtilmektedir (Marazioti vd., 2009).

2.5. Anksiyete Tedavisinde Etkili Olduğu Düşünülen Bitkiler

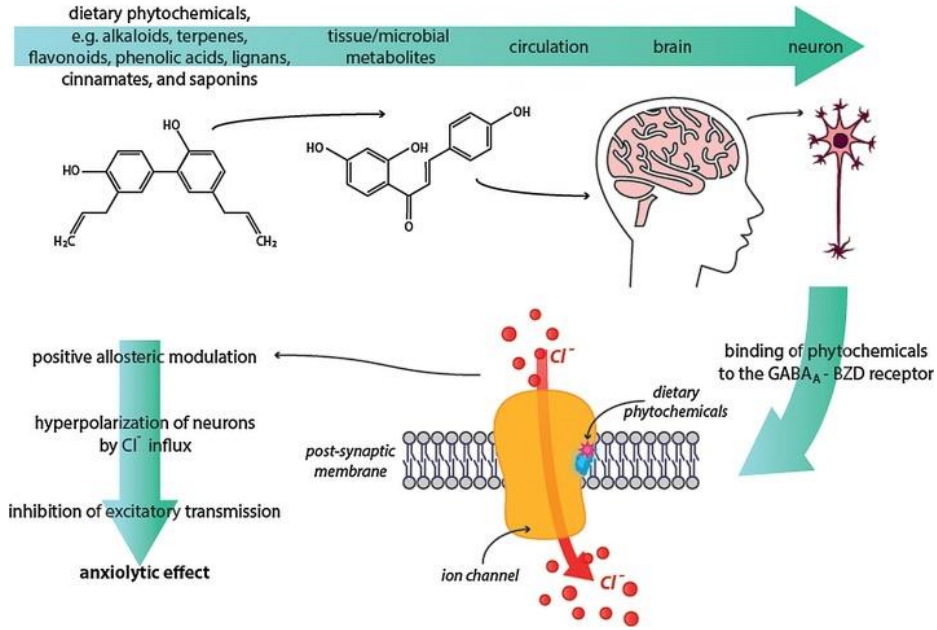
Çok sayıda deneysel çalışmanın sonuçlarında; alkaloidler, terpenler, flavonoidler, fenolik asitler, lignanlar gibi diyet fitokimyasallarının, sinnamatlar ve saponinler veya farklı fitokimyasalların karışımı ile çeşitli bitki özlerinin, çok çeşitli deneysel anksiyete modellerinde anksiyolitik benzeri etkilere sahip olduğu gözlenmiştir (Savage vd.,2018). Bunlar arasında *Piper methysticum*, *Centella asiatica*, *Ginkgo biloba*, *Matricaria chamomilla*, *Passiflora incarnata*, *Scutellaria lateriflora*, *Valeriana officinalis*, *Withania somnifera*, *Magnolia officinalis*, *Lavandula angustifolia*, *Melissa officinalis* 'den elde

edilen bileşiklerin ve formülasyonların hazırlanmasının ardından anksiyolitik benzeri etkiler rapor edilmiştir (Pittler vd., 2000; Kumar vd., 2019; Brüggemann vd., 2021; Amsterdam vd., 2020; Janda vd., 2020; Guo vd., 2021; Orhan, 2021; Fuladi vd., 2020; Borgonetti vd., 2021; Ghadim vd., 2020; Ghazizadeh vd., 2020).



Şekil 3. Anksiyolitik etkileri olan farklı bitkisel doğal bileşik sınıflarının kimyasal yapıları (Fedotova vd.,2017).

Bununla birlikte, GABA sisteminin modülasyonu, çeşitli fitokimyasalların önemli bir etki mekanizması olarak bildirilmektedir (Savage vd, 2018). Yapısal olarak farklı çok sayıda fitokimyasal sınıflarının, GABA_A reseptör kompleksinin benzodiazepin bağlanma bölgesi için yüksek afinite gösterdiği belirtilmiştir. Bu bileşiklerin, klorür anyonunun (Cl⁻) akışına izin vererek membran hiperpolarizasyonuna neden olduğu, bu şekilde uyarıcı iletimin inhibe olduğu ve anksiyete benzeri davranışların azaldığı bildirilmektedir (Fedotova vd., 2017).



Şekil 4. Fitokimyasalların GABA olarak bir pozitif allosterik modülasyonlarla γ -Benzodiazepin reseptör ligandları (Fedotova vd., 2017).

2.5.1. *Piper methysticum*

Piper methysticum' un voltaj kapılı sodyum iyon kanallarının bloke ettiği bildirilmiştir. Anksiyolitik etkisinin altında yatan mekanizmaların γ -aminobütirik asit (GABA) tip A reseptörlerine gelişmiş ligand bağlanmasını arttırması, noradrenalinin nöronal geri alımında azalması, monoamin oksidaz B'nin geri dönüşümlü inhibisyonu ve GABA_A reseptör fonksiyonunu antagonize eden eikosanoid tromboksan A₂ sentezinin baskılanmasının olabileceği düşünülmektedir. Yakın bir zamana kadar, *Piper methysticum* kullanımına bağlı oluşabilecek yan etkiler, bir deri lezyonu oluşumu dışında hafif veya ihmal edilebilir olarak kabul edilmiştir (Singh ve Singh, 2002). Yapılan bir çalışmaya göre anksiyolitik benzeri etkide kullanılabilceği sonucuna varılmıştır ve baş ağrısı dışında hiçbir yan etki gözlenmemiştir (Sarris vd., 2013).

2.5.2. *Centella asiatica*

Centella asiatica özütü olan ECa 233 elevated plus maze testinde hem kronik hem de akut stresli hayvanlarda anksiyolitik olarak etki gösterdiği bulunmuştur (Wanasuntronwong vd., 2012). Yapılan bir çalışma sonucunda ECa 233'ün anksiyolitik aktivitesinin AMPA reseptörleri aracılığıyla olabileceği düşünülmektedir (Wanasuntronwong vd., 2018). *Centella asiatica*' dan elde edilen triterpenik bir bileşik olan Asiaticosid'in, elevated plus maze, open-field area, spontan lokomotor aktivite gibi

testlerde anksiyolitik etkinliği değerlendirilmiştir. Yapılan alışma sonucunda anksiyolitik etki gözlenmiş olup lokomotor aktivite testinde sedatif özelliğinin olmadığı gözlenmiştir (Wijeweera vd., 2006). Yapılan başka bir çalışmada, yükseltilmiş artı labirent testinde, diazepam (1 mg/kg) ve (2 mg/kg) veya asiaticosid (5 mg/kg) veya (10 mg/kg), açık kollara giriş yüzdesini ve açık kollarda harcanan süreyi artırdığı gözlenmiştir. Aydınlık/karanlık kutu testinde, (1 mg/kg) diazepamda olduğu gibi, asiaticoside (10 mg/kg) ve (20 mg/kg), hayvanların toplam lokomotor aktivitesini değiştirmeden aydınlık alanda geçirilen süreyi ve aydınlık alandaki hareketi artırdığı gözlenmiştir. Delikli tahta testinde, (10 mg/kg)'daki asiaticoside, diazepamın yanı sıra kafa daldırma sayısını ve süresini önemli ölçüde artırdığı belirtilmiştir (0.3 mg/kg). Dolayısıyla bu bulgular, asiaticosidin anksiyolitik benzeri etkisi olduğunu göstermiştir (Chen vd., 2006). *Centalla asiatica*'nın başka bir bileşeni olan asiatik asit ile yapılan bir başka çalışmada, GABA_A zerindeki benzodiazepin bölgelerini modüle ederek anksiyolitik benzeri etkili olarak kullanılabilceği belirtilmiştir (Ceremuga vd., 2015).

2.5.3. *Ginkgo biloba*

Yapılan bir çalışmada, *Ginkgo biloba*'nın 4 terpenoid bileşeni (ginkgolide-A, ginkgolide-B, ginkgolide-C ve bilobalid) yükseltilmiş artı labirent testi kullanılarak yapılan bir çalışmada anksiyolitik benzeri etki gösterdiği ve bu etkiden ginkgolid-A bileşenin sorumlulu olduğu gösterilmiştir (Kuribara vd., 2003). Yapılan bir başka çalışmada *Ginkgo biloba*'nın hem MAO-A hem de MAO-B'yi önemli ölçüde inhibe ettiği bulunmuş ve anksiyolitik benzeri etkisinin olduğu gözlenmiştir (White vd., 1996).

2.5.4. *Matricaria chamomilla*

Yapılan bir çalışmada, *Matricaria chamomilla* hidroalkolik ekstresinin skopolamin kaynaklı anksiyete benzeri etki tedavisinde kullanılabilceği gözlenmiştir (Ionita vd., 2019).

2.5.5. *Passiflora incarnata*

Yapılan bir çalışmada, *Passiflora incarnata* (375 mg/kg) dozda diazepam (1.5 mg/kg) ile karşılaştırılabilir bir anksiyolitik etki gösterdiği ve U şeklinde bir doz-yanıt eğrisi sergilediği bildirilmiştir. Ayrıca, GABA_A / benzodiazepin reseptör antagonisti flumazenil ve 5-HT_{1A}-reseptör antagonisti WAY-100635 kullanılarak antagonizma çalışmaları yapılmıştır. Aktif doz flumazenil ile etkili bir şekilde antagonize edildiği bildirilmiştir,

ancak WAY-100635 tarafından antagonize edilemediği belirtilmiştir. Bu çalışma, HPLC ile karakterize edilen *Passiflora incarnata* ekstraktının *in vivo*, GABA aracılı anksiyolitik benzeri aktivitesinin olabileceğini göstermiştir (Grundmann vd., 2008). *Passiflora incarnata*'nın bir özütü olan chrysin deney hayvanları üzerinde GABA_A reseptörlerinin benzodiazepin reseptörleri modülasyonunu yaptığı bulunmuştur. Chrysin elevated plus maze testi ile GABA_A reseptörü ile etkileşim yoluyla anksiyolitik benzeri etki gösterdiği varsayılmıştır (Brown vd., 2007). Yapılan bir başka çalışmada, *Passiflora incarnata* ile hazırlanan etanolik özütün (375 mg/kg)'lık bir konsantrasyonda açık kol girişlerinin sayısında önemli bir artış olduğunu göstermiştir (Grundmann vd., 2009).

2.5.6. *Scutellaria lateriflora*

Scutellaria lateriflora özütünden elde edilen baicalein GABA_A reseptörünün benzodiazepin bölgesine bağlandığı bilindiğinden ve GABA ana inhibitör nörotransmitter olduğundan, bu bileşikler anksiyolitik benzeri etkili olabileceği bir çalışmada gözlenmiştir (Awad vd., 2003). Yapılan bir çalışmada baicaleinin (3.75 mg/kg) ve anksiyolitik-hipnotik bir alkaloid olan dl-tetrahidropalmitin (dl-THP; 0.25 mg/kg) ve diazepam (DZP; 0.5 mg/kg) ile birlikte uygulanması sinerjistik etki sonucunda anksiyolitik benzeri etki gözlendiği bildirilmektedir (Xu vd., 2006).

2.5.7. *Valeriana officinalis*

Yapılan bir çalışmada, *Valeriana officinalis* özütü veya valerenik aside maruz kalan deneklerin etanol kontrol grubuyla karşılaştırıldığında anksiyolitik benzeri etki gösterdiği bildirilmiştir (Murphy vd., 2010). Kediotu özü olan valepotriatların etkili bir anksiyolitik ajan olarak etkili olduğu yapılan bir çalışmada bulunmuştur (Solati ve Sanaguye Motlagh, 2008). Yapılan başka bir çalışma, kedi otunun metabotropik glutamat I ve II reseptörleri ile seçici etkileşim göstermesi sonucu anksiyolitik benzeri etkide rol oynadığını göstermiştir (Del Valle-Mojica ve Ortiz, 2012; Valle-Mojica vd, 2011). GABA reseptörlerinin modülasyonunun, valerenik asidin varlığına bağlı olarak bitkinin önde gelen mekanizması olduğu ortaya çıkmış olsa da valerenik asidin glutamerjik reseptörler ile etkileşimi birçok çalışmada ortaya konmuştur (Khom vd., 2007; Trauner vd., 2008; Felgentreff vd., 2012). Valerenik asitin yanı sıra izovalerik asit, didrovaltrat, borneol gibi bazı lignanların da bitkinin anksiyolitik benzeri etkide rol oynamasına katkıda bulunduğu öne sürülmüştür (Orhan, 2021).

2.5.8. *Magnolia officinalis*

Yapılan bir çalışma da *Magnolia officinalis*'in bir neolignan bileşiği olan 4-O-metilhonokiol'ün Cl⁻ kanallarının açılmasıyla GABAerjik iletimin aracılığı ile anksiyolitik etkisi olduğu görülmüştür (Han vd., 2011).

2.5.9. *Lavandula angustifolia*

Lavanta esansiyel yağı, stres ve anksiyeteyi azaltmak için geleneksel olarak Avrupa İlaç Ajansı tarafından bitkisel ilaç olarak kullanılabilmesi bildirilmektedir. Bir çalışmada lavanta esansiyel yağının ve ana bileşenlerinin, lavanta yağı için 0.04 µl/mL IC50 değeri ile doza bağlı bir şekilde glutamat NMDA-reseptörüne afinitesi gösterilmiştir (Lopez vd., 2017). Yapılan çalışma sonucunda lavantanın anksiyolitik ve antidepresan benzeri etkileri, NMDA-reseptörü üzerindeki bir antagonizmanın ve SERT'nin inhibisyonun etkili olabileceği düşünülmüştür (Lopez vd., 2017). Yapılan bir çalışma da yeni bir oral lavanta yağı kapsülü müstahzarı olan silexanın bir benzodiazepin olan lorazepam karşı anksiyolitik özelliği değerlendirilmiş ve sonuç olarak silexanın lorazepam kadar anksiyolitik etkili olduğu bulunmuştur. Sedatif yapma özelliği ve bağımlılık yapma potansiyeli gözlenmemiştir (Woelk ve Schläfke, 2010). Yapılan başka bir çalışma da yine silexanın herhangi bir istenmeyen sedatif etkiye veya diğer ilaca özgü etkilere neden olmadan anksiyolitik benzeri etkide hem etkili hem de güvenli olduğu gözlenmiştir (Kasper vd., 2010).

2.5.10. *Melissa officinalis*

Melisa officinalis'in özütünün gama-aminobütirik asit transaminaz (GABA-T) aktivitesini inhibe eden ve beyindeki GABA seviyelerini arttıran rosmarinik asit ve triterpenoidler oleanolik asit ve ursolik asit içerdiği bildirilmiştir (Awad vd., 2007).

2.5.11. *Rhodiola rosea*

Yapılan bir çalışmada *Rhodiola rosea* elevated plus maze testinde doza bağımlı anksiyolitik benzeri etki göstermiştir. Anksiyolitik etki mekanizmasının belli olmadığı bildirilmiştir (Cayer vd., 2013).

2.5.12. *Crocus sativus*

Yapılan bir çalışmada *Crocus sativus*'un anksiyolitik etki mekanizmasının belli olmadığı bildirilmiştir. *Crocus sativus* aydınlık-karanlık kutu testinde yapılan deneysel çalışma da

deney hayvanlarının motor aktivitesini etkilemeden anksiyolitik etkinlik gösterdiği bildirilmektedir (Pitsikas vd., 2008).

2.5.13. *Albizia julibrissin*

Albizia julibrissin çiçeklerinin quercitrin ve izoquercitrin olarak iki flavonol glikozit içerdiği ve geleneksel tıpta yatıştırıcı olarak kullanıldığı bildirilmiştir (Kang vd., 2000). *Albizia julibrissin* kök kabuğundan izole edilen bileşiklerin etki mekanizmasının 5-HT_{1A/1B} üzerinde olduğu bulunmuştur. Anksiyolitik etkisinde pindololün antagonist etki gösterdiği bildirilmiştir (Kim vd., 2004).

2.5.14. *Echium amoenum*

Echium amoenum çiçeklerinin etanolik ekstraktının anksiyolitik benzeri etki gösterdiği belirtilmiştir (Rabbani vd., 2004).

2.5.15. *Melittis melisophyllum*

Melittis melisophyllum. bitkisinden elde edilen bileşiklerin kantitatif analizinde ferulik asit içerdiği görülmüştür. Bu bitkinin çayının anksiyete ve uykusuzluk tedavisinde kullanılabileceği bildirilmektedir (Jarić vd., 2007; Szymborska-Sandhu vd., 2020).

2.5.16. *Biebersteinia multifida*

İran-Turan flora bölgesinin yerli bir şifalı bitkisi olan *Biebersteinia multifida*'nin (Geraniaceae) kökünden elde edilen geleneksel müstahzarların fobi tedavisinde kullanılabileceği bildirilmektedir. Kök ekstraktının umbelliferon, skopoletin ve ferulik asit içerdiği yapılan çalışma da bulunmuştur. Kök ekstrati ile yapılan çalışmalarda anksiyolitik etki gösterdiği bildirilmiştir (Monsef-Esfahani vd., 2013).

2.5.17. *Ferula assafoetida*

Ferula assafoetida bitkisinden elde edilen bileşiklerin kantitatif analizinde ferulik asit içerdiği ve bu bitkinin yapılan çalışmasında diazepam karşı alternatif bir anksiyolitik etki gösterdiği bulunmuştur (Alqasoumi, 2012; Sultana vd., 2015).

2.5.18. *Tribulus terrestris*

Bu bitkinin ferulik asit gibi fenolik bileşikleri içerdiğinden dolayı anksiyolitik etki gösterdiği düşünülmektedir (Ahmed vd., 2020).

2.5.19. *Oryza sativa*

Ferulik asitçe zengin olduğu bilinen bu bitki de diazepam ile karşılaştırılabilir düzeyde anksiyolitik etkili bulunmuştur (Kaur vd., 2016).

2.5.20. *Origanum majorana*

Ferulik asit içerdđi bilinen *Origanum majorana* halk arasında infüzyonunun antidepresan ve anksiyolitik özellik olarak kullanılmakta olduğu bildirilmektedir. Yapılan çalışmada anksiyolitik olarak kullanılabileceğini göstermiştir (Amaghnouje vd., 2020).

2.6. Fenolik Bileşikler

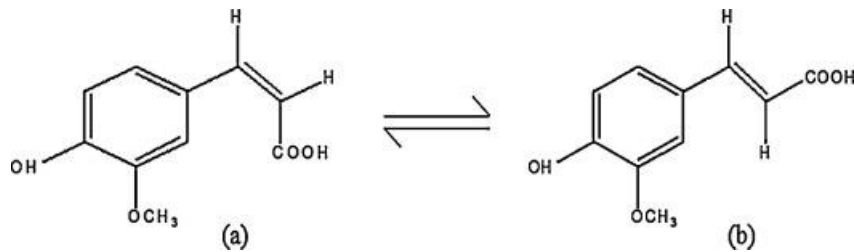
Son yıllarda birçok şifalı bitki ve bu bitkilerden elde edilen doğal bileşiklerin kullanımının arttığı bildirilmektedir. Tamamlayıcı ve alternatif tıpta ilaç olarak bu bitkilerin dikkat çektiği bildirilmektedir (Ahmed vd., 2005). Son 50 yılda yapılan farmakolojik çalışmalarda, yeni ilaç arayışının hedefi olarak serotonerjik, GABA erjik, nöropeptiderjik, glutamaterjik ve endokannabinoid sistemlere yoğun bir şekilde odaklanıldığı belirtilmektedir (Griebel ve Holmes, 2013). Ancak çoğu ilacın, pazara ulaşmadan klinik araştırma aşamasında çeşitli nedenlerle durdurulduğu bildirilmektedir. Gerçekten de hastalara daha iyi bir yaşam kalitesi sağlayan, yan etkisi az, anksiyolitik etkisi güçlü ilaçların geliştirilmesine ihtiyaç duyulduğu belirtilmektedir (Mandrioli ve Mercolini, 2015). Günümüzde anksiyete tedavisi için farmakoterapi ve psikoterapi olmak üzere iki temel tedavi yönteminin tartışıldığı bildirilmektedir. Farmakoterapötik klinik yaklaşımda, kimyasal sentez yoluyla elde edilmiş olan ve birçok yan etkileri bulunan ilaçlar anksiyolitik ilaç olarak kullanılmakta olduğu bildirilmektedir. Ancak, yapılan çalışmalarda kullanılan bu ilaçların yan etkileri hastaların yaşam kalitesini olumsuz yönde etkilediği bildirilmektedir ve bu nedenle araştırmacılar tarafından doğal kaynaklardan elde edilen ve daha az yan etkiye sahip, güvenli ilaçlar bulmaya yönelik çalışmalar yapıldığı bildirilmektedir. Çok sayıdaki deneysel çalışmalar, alkaloidler, terpenler, flavonoidler, fenolik asitler gibi fitokimyasalların ve bunların kombinasyonlarının veya çeşitli bitki ekstraktlarının anksiyete bozukluğu tedavisinde kullanılabilceğini göstermiştir (Fedotova vd., 2017).

Bilimsel bilgiler yeterli olmadığından Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ), bitki temelli ilaçların farmakolojik etkinliğinin araştırılması gerektiğine dikkat çekmiştir (Ayyanar vd., 2008). Fenolik bileşikler veya polifenoller, bitkiler âleminde en yaygın madde gruplarından birini oluşturdukları bildirilmektedir. Bütün bitki metabolizmalarında

sekonder metabolit olarak bulunan ve bitkileri bazı zararlılara karşı koruma da rolleri olan farklı nitelik ve miktarlarda 8000'den fazla fenolik bileşik tanımlandığı belirtilmektedir (Lima vd., 2014). Bu çalışmada, bunlardan biri olan ferulik asit, anksiyete bozukluğu tedavisindeki yerinin araştırılması için seçilmiştir.

2.6.1. Ferulik asit

Ferulik asit (4-hidroksi-3-metoksisinamik asit) *Ferula assafoetida*, *Oryza sativa* ve *Tribulus terrestris* gibi bitkilerden elde edildiği ve bu bitkilerin etkili bir bileşeni olduğu belirtilmiştir. Esas olarak mono ve oligosakaritler, poliaminler, lipitler ve polisakaritler ile konjuge halde bulunduğu belirtilmektedir. Ferulik asit, düşük toksisiteye sahip bir fenolik asit olarak çalışmalarda bulunmuştur; insan vücudunda emilebilir ve kolayca metabolize edilebilir olduğu yapılan çalışmalar sonucunda görülmüştür (Ou ve Kwok, 2004). Ferulik asitin, ticari olarak kolay bulunabilen doğal bir fitokimyasal olduğu bildirilmiştir. Maliyetinin az olması ve yan etkilerinin minimum seviyede olması, potansiyel bir terapötik ajan olarak çalışmalarda araştırmacılar tarafından kullanımının önem kazandığı bilinmektedir (Ghosh vd., 2017). Ferulik asitin antioksidan, antimikrobiyal, antidiyabetik, nöroprotektif antienflamatuar, anti-trombotik ve anti-kanser aktiviteleri dâhil olmak üzere birçok fizyolojik fonksiyona sahip bir polifenol olduğu bildirilmiştir. Ayrıca koroner hastalığa karşı koruduğu, kolesterolü düşürdüğü ve sperm canlılığını arttırdığı belirtilmektedir. Bu özellikleri ve düşük toksisitesi nedeniyle, ferulik asit artık gıda ve kozmetik endüstrilerinde yaygın olarak kullanımı olduğu bildirilmiştir (Ou ve Kwok, 2004, Chen vd., 2015, Ghosh vd., 2017). Ayrıca ferulik asitin anksiyolitik ve antidepresan etki gösterdiğine dair birçok çalışmada vardır (Chen vd., 2015; Zhang vd. 2011; Zeni vd., 2012; Sandeep vd., 2018; Kotwal vd., 2015).



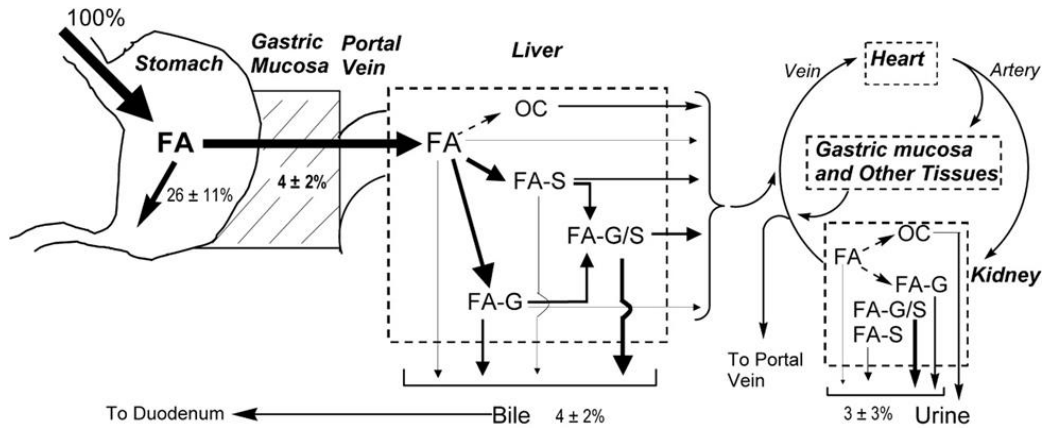
Şekil 5. Doğada bulunan ferulik asidin iki farklı izomerik formunun şematik gösterimi

(Kumar ve Pruthi, 2014).

(a) cis konformasyonu ve (b) trans konformasyonu.

Ferulik asitin beyin de hipokampüs ve frontal kortekste serotonin ve noradrenalin düzeylerini yükselttiği ancak dopamin düzeylerini yükseltmediği bildirilmiştir. MAO-A'nın serotonin, noradrenalin ve dopamin yıkımından sorumlu olduğu belirtilmiştir. Görülen bu değişiklikler aynı beyin bölgelerinde MAO-A aktivitelerinin inhibisyonuna neden olabileceği ve böylece bu nörotransmitterlerin düzeylerinde yükselme olabileceği düşünülmektedir (Chen vd., 2015). Yapılan bir çalışma da ferulik asitin NMDA reseptörleri üzerinden etki gösterdiği gözlenmiştir (Lorigooini, 2021).

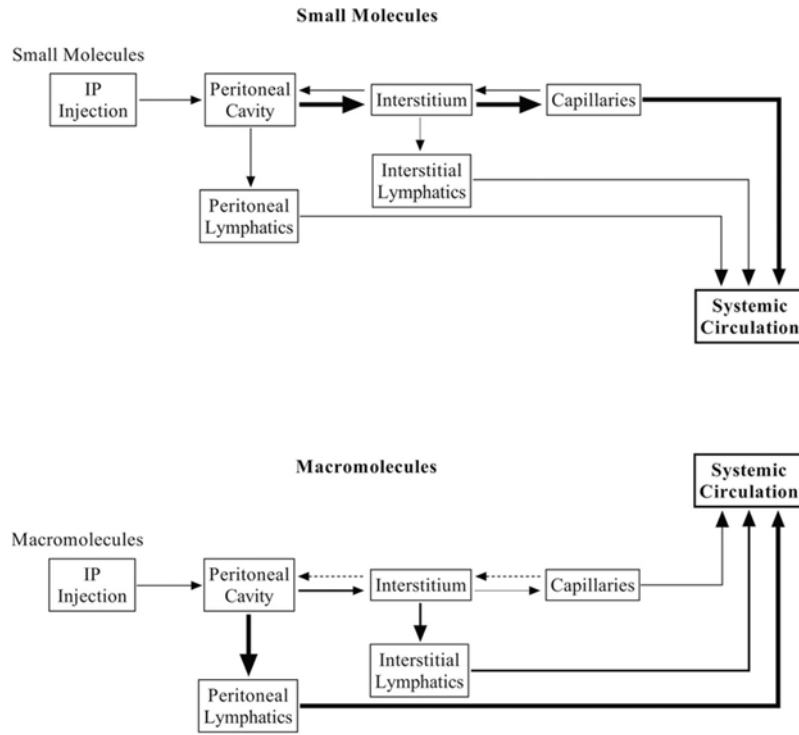
Ferulik asitin biyoyarlanımı incelendiğinde insanlarda biyoyaralanımının düşük olduğu görülmüştür (Govindaswamy, 2015). Ratlarda %9-20, insanlarda yaklaşık olarak %20 olduğu belirtilmektedir (Mancuso ve Santangelo, 2014). Ferulik asit oral yoldan verildiğinde, biyoyarlanımını sınırlayan belirgin bir ilk geçiş etkisine maruz kaldığı belirtilmektedir (Barone vd., 2009; Trombino vd., 2013). Oral olarak uygulanan ferulik asit sıçan midesinde gastrik mukozadan emildikten sonra portal vene oradan da karaciğere geçeceği bildirilmiştir. Karaciğerde glukuronid/sülfat ile konjuge edildiği belirtilmiştir. Daha sonra kalan FA ve konjuge FA sistemik dolaşıma gireceği ve periferik dokulara dağıtılırken bir kısmının safraya girerek enterohepatik dolaşıma girebileceği bildirilmiştir. Sistemik dolaşımdaki ve dokulardaki serbest FA ve konjugatlarının bir kısmı diğer bileşiklere metabolize edilirken, çoğu nihai olarak böbrek yoluyla esas olarak konjuge FA olarak atıldığı belirtilmiştir (Zhao vd., 2004).



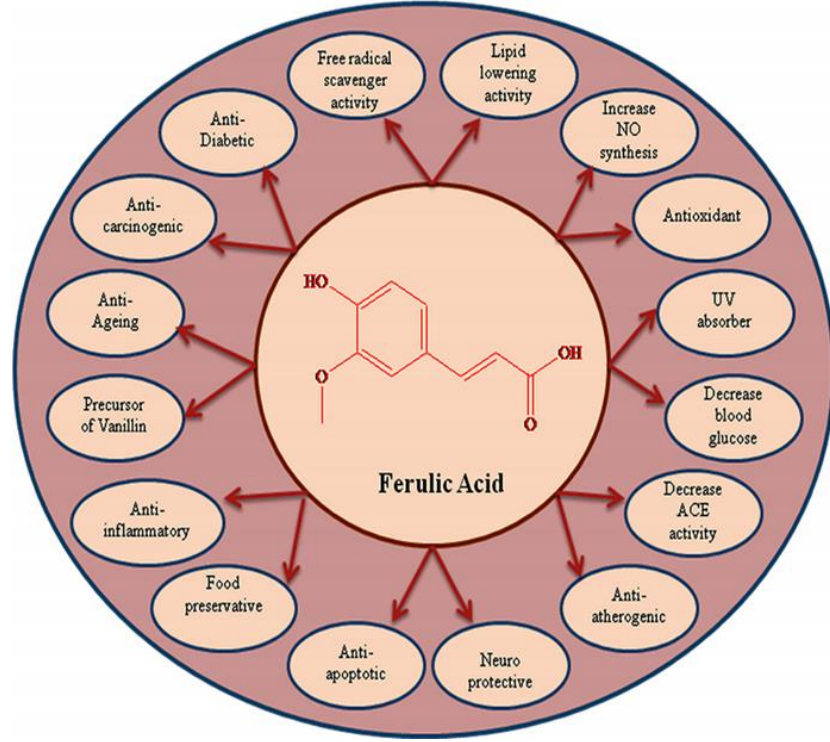
Şekil 6. Ferulik asitin biyoyarlanımı (Zhao vd., 2004).

Fenolik bileşiklerin ilaç olarak geliştirilebilmeleri için önümüzdeki en önemli engellerden bazılarının bu maddelerin zayıf çözünürlüklerinin olduğu ve emilimlerinin az olduğu buna bağlı olarak da biyoyarlanımlarının düşük olduğu bildirilmektedir

(Nunes vd, 2017). Ferulik asitin suda çözünürlüğünün zayıf olduğu, lipofilik bariyerlerden geçişinin zor olduğu, ilk geçiş etkisine maruz kaldığı ve karaciğerdeki hızlı konjugasyon süreci gibi etkiler sonucunda ferulik asitin biyoyararlanımının düşük olduğu belirtilmektedir (Saini vd., 2021). Tüm bu nedenlerden dolayı ferulik asit katı lipit nanopartikül taşıyıcı sistem haline getirilecektir. I.p. form iv formu uygulamanın zor olduğu küçük hayvanlar da uygulandığı belirtilmiştir. I.p. olarak uygulanan maddeler sistemik dolaşıma girmeden önce hepatik metabolizmaya uğradığı bildirilmiştir (Turner vd., 2011).



Şekil 7. Periton boşluğundan sistemik dolaşıma küçük ve makromoleküller için absorpsiyon yollarının şematik genel görünümü (Al Shoyaib vd., 2020).



Şekil 8. Ferulik asidin farklı kullanım alanları (Kumar ve Pruthi, 2014).

Bu sorunların üstesinden gelmek için umut verici bir strateji olarak, araştırmacılar uygun ilaç taşıyıcı sistemlerin geliştirilmesine yönelmiştir. Bu amaçla inklüzyon kompleksleri, lipozomlar, nanopartiküller veya miseller gibi gelişmiş ilaç taşıyıcı sistemleri çalışmalarda kullanılmıştır. Bu sistemlerden en çok kullanılanlardan biri olan katı lipit nanopartikül taşıyıcı sistemin günümüzde özel ilgi görmekte olduğu bildirilmektedir (Mehnert ve Mäder, 2012).

Ferulik asitin anksiyolitik etkisi ile birkaç deneysel çalışma olsa da bu proje kapsamında ferulik asitin yüklü ilaç taşıyıcı sisteme (Katı lipit nanopartikül) yüklenerek akut ve subkronik uygulamada biyoyararlanımının artırılması ve bu doğrultuda anksiyolitik etkisindeki değişimin değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

2.7. Katı Lipit Nanopartiküller

2.7.1. Tanımı ve genel özellikleri

Katı lipit nanopartiküller (KLN'ler), 1991 yılında mevcut koloidal sistemlere alternatif bir taşıyıcı sistem olarak ortaya atılan, yağ/su emülsiyonundaki sıvı yağın katı lipitle değiştirilmesiyle oda ısısında oluşan katı nanopartiküller olarak bildirilmektedir (Demirel ve Yazan, 2000; Müller vd., 2000). KLN taşıyıcı sistemler, parenteral, oral, oküler ve

topikal olarak uygulanabilen, partikül boyutu 50-1000 nm arasında olan, otoklavda sterilize edilebilen, kontrollü ve sürekli salım sağlayan, fiziksel stabilitesi yüksek olan taşıyıcılar olarak bildirilmektedir (Mishra vd., 2018). KLN taşıyıcı sistemler, oda ve vücut sıcaklığında katı halde bulunan lipitler ile hazırlanan ve emülgatörler ile stabilize edilen, yüksek spesifik alana sahip, nano aralıkta küçük çaplı küresel lipit parçacıklarından oluştuğu ve olumlu zeta potansiyeline sahip nanometre boyutundaki partiküller olarak dikkat çekmiştir (Akanda vd., 2023, Müller ve Keck, 2004; Wissing vd., 2004). Bu taşıyıcı sistemin lipitlerden veya yağ asitleri, steroid, mum ve trigliseritler, asil-gliserol ya da bunların kombinasyonlarından oluştuğu bildirilmektedir. Stabilizasyon sağlamak için lesitini, safra tuzları (sodyum taurokolat gibi), etilen oksit/propilen oksit kopolimerleri gibi iyonik olmayan emülgatörler, sorbitan esterler, yağ asidi gibi emülgatörlerin yaygın olarak kullanıldığı bildirilmektedir. KLN taşıyıcı sistemlerin lipozomların, emülsiyonların ve polimerik nanopartiküllerin üstün özelliklerini taşıdığı bildirilmektedir (Akanda vd., 2023).

Bu sistemlerin üstünlükleri arasında;

- ✓ Kolloidal büyüklükte olmaları,
- ✓ Biyolojik olarak geçimli olmaları,
- ✓ Hidrofilik ve lipofilik ilaçların yüklenebilmesini,
- ✓ Üretim için gerekli aletlerin basit olması,
- ✓ Taşıyıcının biyotoksik olmaması,
- ✓ Genellikle organik çözücü kullanılmaması,
- ✓ Geniş ölçekli üretimde ve sterilizasyonda problem oluşmaması,
- ✓ Kolay hazırlanabilmesi,
- ✓ Tedavi için daha düşük dozların gerekmesi,
- ✓ Düşük maliyetli formülasyon ajanlarına sahip olması,
- ✓ Sterilize edilebilir ve dondurarak kurutulabilir olmaları gibi sonuçlar birçok yapılan deney sonucunda görülmüştür (Mehnert ve Mäder, 2012; .Singh, 2019; Akbari vd., 2022; Viegas vd., 2022; Kalkumbe vd., 2023).

Dezavantajları arasında ise,

- ✓ Hazırlamada kullanılan sıcak homojenizasyon yönteminde kullanılan yüksek sıcaklığın her etkin madde için uygun olmayışı,
- ✓ Öngörülemeyen jelleşme olayı,

- ✓ Yüksek basınca bağılı olarak ilaç bozulmalarının gözlenmesi,
- ✓ Parçacık büyümesi,
- ✓ Yüksek konsantrasyonda yüzey etkin madde ve yardımcı yüzey etkin madde kullanımı belirtilmektedir (Akanda vd., 2023; Kalkumbe vd., 2023; Yadav vd., 2013; Mehnert ve Mäder,2012; Karami vd.,2016; Toksoy ve Tırnaksız, 2021).

2.7.2. Katı lipit nanopartiküllerin hazırlanma yöntemleri

KLN'lerin hazırlanmasında lipit, emülgatör (yüzey etkin madde), su/çözücü kullanıldığı bildirilmektedir. Lipit olarak trigliserit, yağ asitleri (stearik asit, palmitik asit), kolesterol gibi steroidler ve setil palmitat gibi bileşiklerin kullanıldığı belirtilmektedir. Emülgatör kullanımının partikülün topaklaşmasını önlediği gözlenmiştir (Manjunath vd., 2005).

2.7.2.1. Yüksek basınçlı homojenizasyon

KLN'leri hazırlamak için ilk kez kullanılan ve en güvenilir bir yöntem olarak bildirilmektedir (Kalkumbe vd., 2023). İlaç endüstrisinde özellikle damlacıkların ve dispersiyonların boyutunun küçültülmesi, karıştırılması ve stabilizasyonun da kullanıldığı belirtilmektedir (Yadav ve Kale, 2020). Parenteral uygulama yapmak için kullanılan bir yöntem olduğu bildirilmiştir. Yüksek basınçlı homojenizasyon yöntemi polimerik nanopartiküllerin yanı sıra katı lipit nanopartikülleri, nanoyapılı lipit taşıyıcıları, nanokristaller gibi farklı veziküler ve veziküler olmayan lipit bazlı nanosistemlerin hazırlanması çok yönlü ve büyük ölçekli üretim için kullanılan bir yöntem olarak tanımlanmıştır. Sıcak ve soğuk homojenizasyon olmak üzere ikiye ayrıldığı belirtilmektedir. Lipitin her iki süreçte de eritildiği bilinmektedir. Aktif bileşiğin yüksek basınçlı homojenizasyonda çözündürerek ve dağıtılarak işlem yapıldığı bildirilmektedir. Dar bir aralıktan 100-2000 bar arası yüksek basınçlı sıvının geçirildiği belirtilmektedir (Dai vd., 2010; Mehnert ve Mäder, 2012; Vinchhi vd., 2021;).

2.7.2.1.1. Sıcak homojenizasyon

Lipidin erime noktasının üzerindeki bir sıcaklıkta gerçekleştirildiği bildirilmektedir (Dolatabadi vd., 2015). Oluşan eriyikte etkin maddenin çözündürüldüğü fazın yağ fazı olduğu bildirilmiştir. Yüzey etkin maddenin sulu çözeltisi su fazı olarak adlandırıldığı bildirilmektedir. İki faz birbirine karıştırılarak yağ/su(y/s) tipi emülsiyon oluştuğu belirtilmektedir. Oluşan emülsiyon formu yüksek basınçta dar bir alandan geçirilerek istenilen partikül boyutu elde etmek için tekrarlandığı bildirilmiştir. Oluşan numune daha

sonra oda sıcaklığına ya da daha düşük sıcaklıklara soğutulması ile katı partiküller oluştuğu bildirilmektedir (Toksoy ve Tırnaksız, 2021; Mehnert ve Mäder, 2012).

2.7.2.1.2. Soğuk homojenizasyon

Sıcak homojenizasyon tekniğine benzer olduğu belirtilmiştir. Ancak y/s tipi emülsiyonun hızlıca soğutulmasıyla elde edildiği açıklanmıştır. Ayrıca sıcak homojenizasyonda görülen; sıcaklığa bağlı ilaç bozulması, homojenizasyon sırasında ilacın sulu faza dağılımı, nanoemülsiyonun kristalizasyon aşamasının karmaşıklığı, çeşitli modifikasyonlara ve/veya aşırı soğutulmuş emülsiyonlara yol açması gibi sorunların bu yöntemde görülmediği belirtilmiştir. Oluşan emülsiyon soğutulduktan sonra uygun bir öğütücü ile toz haline getirildiği ve böylelikle partikül boyutunun küçültüldüğü bildirilmiştir (Karami vd., 2016; Toksoy ve Tırnaksız, 2021).

2.7.2.2. Emülsifikasyon-çözücü uçurma yöntemi

Lipidin organik çözücüde çözüdürüleceği ve yüzey etkin maddenin sulu çözeltisi ile karıştırıldığı gözlenmiştir. Katı lipit nanopartikül taşıyıcı sisteminin organik fazın buharlaştırılmasıyla elde edildiği bildirilmiştir (Pooja vd., 2016). Soğuk ve sıcak homojenizasyon yöntemine göre avantajının, ısıdan etkilenen maddelerin stabilitesini koruduğu belirtilmiştir. Dezavantajları arasında organik çözücülerin kullanılması sayılmıştır (Mehnert ve Mäder, 2012).

2.7.2.3. Mikroemülsiyon yöntemi

Katı yağ, yüzey etkin madde ve su/çözücü karışımı belli bir sıcaklığa kadar ısıtılarak sıcak mikroemülsiyon elde edildiği bildirilmektedir. Elde edilen mikroemülsiyonlar soğumaya bırakılır ve yağ damlacıklarının katılaşması ile katı lipit nanopartiküllerin oluştuğu bildirilmektedir (Shah vd., 2016). Kullanılan bu yöntemin avantajları arasında; özel ekipman gerektirmemesi, üretim için enerji gerektirmemesi ve lipit nanopartiküllerinin ölçek büyütme üretiminin mümkün olması sayılmıştır. Partikül süspansiyonun su ile seyreltilmesi için fazla suyun dondurularak ve kurutularak giderilebileceği bildirilmiştir ve bu yöntemin dezavantajları arasında sayılmıştır (Akanda vd., 2023).

2.7.2.4. Çift emülsifikasyon yöntemi

Bu yöntemin polimerik mikroküreler elde etmek için kullanıldığı bildirilmektedir. Ancak bu yöntem için bazı dezavantajlar bildirilmiştir (Mashhadian vd., 2022).

- ✓ Mikro kürelerin boyut dağılımı geniştir.

- ✓ Son mikrokürelerin özelliklerini tahmin etmek zordur.

Hazırlanmasında, etkin maddenin ve yüzey etkin maddenin su fazında çözündürüldüğü ve katı yağ içeren organik faza eklendiği bildirilmektedir. Bu şekilde su/yağ(s/y) tipi bir emülsiyon elde edildiği ve oluşan emülsiyon yapının da başka bir sulu faza eklenerek s/y/s(su/yağ/su) tipi emülsiyon oluşturulduğu belirtilmiştir. Organik fazın buharlaştırılması ile de katı lipit elde edildiği belirtilmiştir (Rosca vd., 2004; Zhang vd., 2021). Bu yöntem ile elde edilen iç sulu faz içeriğine ve emülsiyon damlacığına göre iç mikro damlacığın boyutuna göre sonuç, bal peteği, kapsül ve düz yapıya sahip mikropartiküllerin karışımı olacağı öngörülmüştür. Çözücünün ortadan kaldırılması ve büzülmesi sırasında içteki mikrodamlacıklar çöken polimerin basıncı altında yavaş yavaş birleştiği ve iç damlacıkların yüzeyindeki katmanın yırtılması nedeniyle sulu fazın kısmen dışarı atılmasına neden olarak doğal kararsızlıklar gözlenebileceği bildirilmektedir (Rosca vd., 2004).

2.7.2.5. Çözücü emülsifikasyon-difüzyon yöntemi

Bu yöntem biyolojik olarak parçalanabilen mikron altı boyutta parçacıkların hazırlanmasında en sık kullanılan yöntem olarak belirtilmektedir (Mora-Huertas vd., 2011). Mikron boyutunun altında yüksek kesmeli homojenizasyon yöntemi ile sağlandığı belirtilmektedir. Farklı emülgatör ve farklı lipit yüklerinin kullanılması katı lipit nanopartikül boyutunu etkilediği bildirilmektedir. 50-100 nm boyutunda ortalama parçacık boyutu elde edildiği bilinmektedir. Avantajları arasında yüksek sıcaklıktan kaçınılması bildirilmektedir. Kolloidal partiküllerin birleşmesini sağlamak ve zeta potansiyelin ayarlamak için lipit 50 °C 'de bir su banyosunda organik fazda çözüldüğü ve asidik faz olarak kullanılacağı belirtilmektedir. Santrifüjleme yöntemi ile kolay bir şekilde kolloidal partiküller ayrılabilirliği belirtilmektedir (Akanda vd., 2023; Trotta vd., 2003).

2.7.2.6. Çözücü enjeksiyon yöntemi

Su ile karışabilen bir çözücüde yağ fazı karıştırılarak katı lipitin erime derecesi üzerinde ısıtıldığı bildirilmektedir. Bir iğne yardımıyla oluşan emülsiyonun su fazına damla damla eklendiği bildirilmektedir. Lipit damlalar katılaştığı ve nano boyutta tanecikler elde edildiği bildirilmektedir (Kaushik vd., 2012).

2.7.2.7. Yüksek hızla karıştırma (Ultrasonikasyon) yöntemi

Bu yöntem ile katı lipit nanopartikül, yüksek hızda karıştırılması ile elde edilebileceği bildirilmektedir. Lipit fazının eritilmesi ile yüzey aktif maddenin sıcak suda dağılması ile oluşan karışımın yüksek hızda karıştırmanın uygulandığı ve su içinde yağ emülsiyonu üretmek için kullanılan bir yöntem olarak bildirilmektedir (Akanda vd., 2023).

2.7.2.8. Membran kontaktörü

Ölçeklendirilmesi kolay bir katı lipit nanopartikül hazırlama yöntemi olarak bildirilmektedir. İlaç içeren bir lipit faz ile yüzey aktif içeren sulu bir fazdan oluştuğu belirtilmektedir. Lipit fazı erime noktası üzerinde eritilerek basınç altında gözenekli bir zardan geçirildiği bildirilmektedir. Bu işlem sonucunda oluşan preparatın oda sıcaklığında soğutulmasıyla nano boyutlu tanecikler oluştuğu gözlenmiştir. Parçacık boyutunun değiştirilmesi farklı gözenek boyutuna sahip membranların kullanarak oluşturulabileceği belirtilmiştir (Khairnar vd., 2022; Svilenov ve Tzachev, 2014; Charcosset vd., 2005).

2.7.3. KLN üzerinde karakterizasyon çalışmaları

İncelenen kaynaklara göre KLN'lerde yapılacak karakterizasyon çalışmaları olarak şunlar belirtilmektedir:

- ✓ Etkin madde yükleme kapasitesi
- ✓ Partikül boyutu ve dağılımı
- ✓ Partikül morfolojisinin incelenmesi
- ✓ Zeta potansiyel ölçümü
- ✓ Fizikokimyasal analizler (FTIR, NMR, DSC, XRD)
- ✓ Etkin madde salımı (Kipriye vd., 2017)

2.7.3.1. Etkin madde yükleme kapasitesi

Nanopartiküllerin membran filtreden süzülmesinden sonra süpernatant sıvıdan titrasyon yöntemi veya spektroskopik yöntem kullanılarak serbest ilaçların toplam ağırlığı ölçülmesine dayandığı bildirilmektedir. Yükleme kapasitesini ve ilacın lipit içerisine dâhil edilmesini etkileyen faktörler şu şekilde belirtilmektedir.

- ✓ Erimiş lipitte ilacın çözünürlüğü,
- ✓ Katı lipid matrisin kimyasal ve fiziksel yapısı,
- ✓ Lipit materyalin polimorfikliği,

- ✓ Jelatin fenomeni,
- ✓ Aşırı soğutulmuş eriyiklerin varlığı.

Yüksek yükleme kapasitesine ulaşmak için ilacın lipid eriyiğinde yeterince yüksek çözünürlüğe sahip olması (yani eriyik soğuduğunda azaldığı için gerekenden daha yüksek olması) gerektiği bildirilmektedir. Çalışmalarda lipid eriyiğinde ilacın çözünürlüğünü arttırmak için bazen çözüdürücüler kullanıldığı gözlenmiştir. Ek olarak lipid matrisinde mono ve digliseritlerin varlığı ilacın çözünürlüğünü arttırdığı bildirilmiştir (Parh ve Suresh, 2010).

2.7.3.2. Parçacık boyutu ve dağılımı

Parçacık boyutunun ölçümlerinde, foton korelasyon spektroskopisi (PCS) ve lazer kırınımı (LD) kullanılan yaygın yöntemler olarak bildirilmektedir. Coulter Counter yönteminin, küçük nanopartiküllerin değerlendirilmesinde zorluklar yaşandığı için ve kolloidal dispersiyonları kararsızlaştırabilecek elektrolitlere ihtiyaç duyulması nedeniyle KLN partikül boyutunu ölçmek için nadiren kullanıldığı bildirilmektedir. PCS (dinamik ışık saçılımı olarak da bilinir), parçacık hareketinin neden olduğu saçılan ışığın yoğunluğundaki dalgalanmayı ölçtüğü bildirilmektedir. Bu yöntem ile birkaç nanometreden yaklaşık 3 mikrona kadar bir boyut aralığındaki partiküllerin ölçümünün yapıldığı belirtilmektedir. Lazer kırınımı (LD) yönteminde kırınım açısının parçacık boyutuna bağlı olduğu belirtilmektedir. Küçük parçacıkların büyük parçacıklara göre yüksek açılarda daha yoğun saçılmaları neden olduğu gözlenmiştir. LD yönteminin avantajı nanometre boyutundan milimetre boyutuna kadar geniş bir boyut aralığında partiküllerin ölçümünün yapıldığı bildirilmektedir. Ayrıca PIDS teknolojisinin (Polarizasyon Yoğunluğu Diferansiyel Saçılımı) geliştirilmesi, LD'nin daha küçük parçacıklara duyarlılığını büyük ölçüde arttırdığı gözlenmiştir. Araştırmacılar tarafından PCS ve LD yönteminin aynı anda kullanılması tavsiye edilmektedir. Doğrudan parçacık boyutu ölçülmeyp parçacık boyutu ışık saçımı etkileri ile hesaplandığı bildirilmektedir (Silva vd., 2012).

2.7.3.3. Partikül morfolojisinin incelenmesi

Partiküllerin yüzey morfolojisi ve parçacık boyutunun incelenmesi taramalı elektron mikroskobu (SEM), transmisyon elektron mikroskobu (TEM) veya atomik kuvvet mikroskobu (AFM), tarama gibi mikroskobik teknikler kullanılarak gerçekleştirildiği bildirilmektedir (Shirodkar vd., 2019).

2.7.3.4. Zeta potansiyel ölçümü

Zeta potansiyeli ne kadar yüksek olursa damlacıklar arasında elektrostatik itmenin de o kadar fazla olacağı bulunmuştur (Gu vd., 2022). Genel olarak, elektrik itme nedeniyle yüklü parçacıklar (yüksek zeta potansiyeli) için parçacık toplanmasının meydana gelme olasılığının daha düşük olduğu bildirilmiştir (Mehnert ve Mäder, 2012).

2.7.3.5. Fizikokimyasal analiz

Nanopartiküllerin hazırlanmasındaki en önemli amacın aktif farmasötik taşıyıcının etken maddeye dahil edilmesi olarak bildirilmiş ve bu amaçla ilaç tuzağının karakterizasyonu amacıyla Fourier kızılötesi spektroskopi analizi (IRTracer-100 FTIR spektrometresi, Shimadzu) yapıldığı belirtilmektedir (Nikandish vd., 2016). Bunun haricinde proton nükleer manyetik rezonans spektroskopisi (¹H NMR) (JEOL NMR-400 MHz) kullanılarak karakterize edildiği bildirilmektedir (Ak vd., 2021; Kumar vd., 2020).

2.7.3.6. Etkin madde salımı

KLN'lerden etkin madde salınımı modifiye edilmiş Franz tipi difüzyon hücresi, doğrudan dağılım yöntemi (onaylanmış bir UV-görünür yöntem) ve Higuchi salım modeli gibi yöntemler kullanıldığı bildirilmiştir (Kraisit vd., 2021; Gumireddy vd., 2019; Bibi vd., 2023). Yapılan bir çalışmada, ilaç salım mekanizmasını tahmin etmek için DD çözücü yazılımı kullanılarak sıfır derece, birinci derece, Higuchi salım modeli, Korsmeyer-Peppas ve Hixon-Crowell modeli gibi kinetik modellere tabi tutulduğu belirtilmiştir (Bibi vd., 2023). Yapılan bir çalışmada in vitro etkin madde salınımını değerlendirmek için diyaliz membran yöntemini kullandığını belirtmiştir (Soltani ve Pakravan, 2023).

KLN taşıyıcı sistemin, fizyolojik lipitlerden oluştuğu için polimerik nanopartiküllerde gözlenen akut ve kronik toksisite riskini azalttığı, metabolizasyon ve vücuttan atılımları için organizmada uygun mekanizmaların olduğu belirtilmektedir. KLN'lerin üretiminde lipitler ve yüzey etkin maddeler, tablet, pellet ve kapsül gibi geleneksel ilaç şekillerinde kullanıldığı bildirilmektedir ve KLN taşıyıcı sistemin ilaçların toksisitesini azaltarak güvenli bir sistem olarak kabul edildiği belirtilmiştir (Cavalli. vd., 1998).

3. MATERYAL VE METOD

3.1. Kullanılan Kimyasallar

Kimyasal Madde

Ferulik asit

Diazepam

Tween 80

Compritol® ATO 888

Dimetilsülfoksit (DMSO)

Dynasan® 114

Metanol

Mutlak Alkol

Tween® 80

Firma Adı, Menşei

Sigma ,USA

Diazem®, Deva, Türkiye

Merck, Almanya

Gattefosse, Fransa

Merck, Almanya

Condea, Almanya

Merck, Almanya

Merck, Almanya

Merck, Almanya

3.2. Kullanılan Cihazlar

Cihaz Adı

Yükseltilmiş artı labirent cihazı

Açık alan cihazı

Delikli tahta cihazı

Aydınlık-karanlık kutu

Spontan Lokomotor Aktivite kafesi

Buzdolabı

Distile su cihazı

Hassas terazi

Manyetik karıştırıcı

Mikrosantrifüj

Parçacık boyutu cihazı

Firma Adı, Model, Menşei

Ugo Basile, 46650, Varese, İtalya

Ugo Basile, 6650, Varese, İtalya

Ugo Basile, 46653, Varese, İtalya

Ugo Basile, 47443, Varese, İtalya

Ugo Basile 47420, Varese, İtalya

Arçelik, Türkiye

MilliQ Millipore, Fransa

Mettler AM 100, Amerika

Jeitech MS-53M, Kore

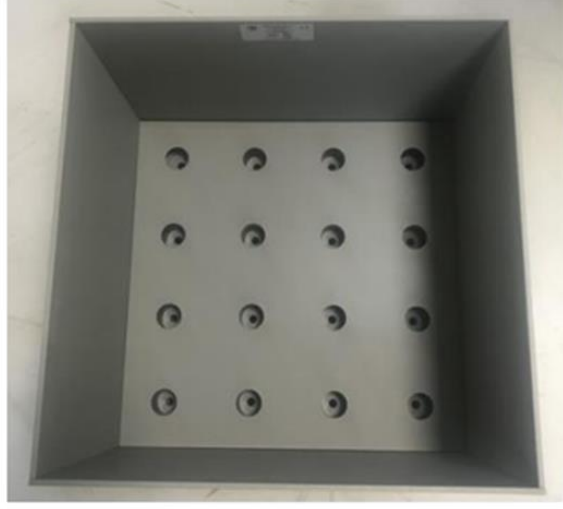
Centrifuge,547R, Almanya

Zetasizer Nano-Series, İngiltere

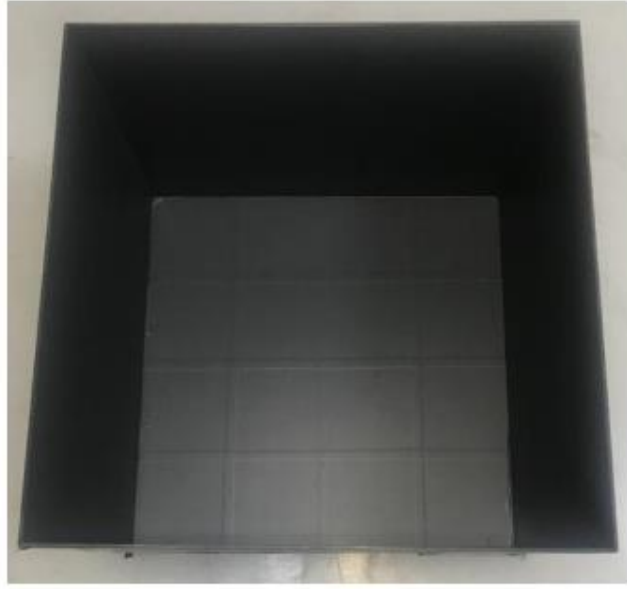
Prob sonikatör	Sonics, Amerika
Ultrasonik banyo	Elma T470/H, Singen, Almanya
Vorteks karıştırıcı	Jeitech VM96B, Kore
YBSK kolonu	LiChrospher® 100, Almanya
Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi	Shimadzu 20-A, Japonya
Zeta potansiyel analiz cihazı	Zetasizer Nano Series, İngiltere
Hassas Terazi	Ohaus, E12140, İsviçre
Spontan lokomotor aktivite kafesi	Ugo Basile, 7436, Varese, İtalya



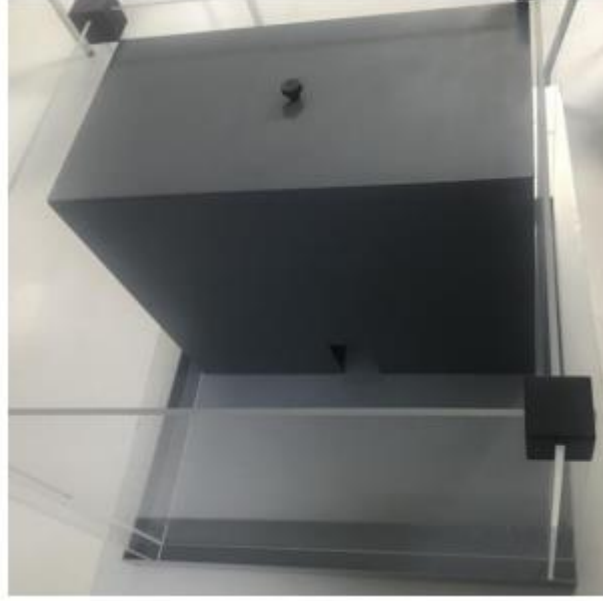
Şekil 9. Yükseltilmiş artı labirent (*Elevated plus maze*) testi



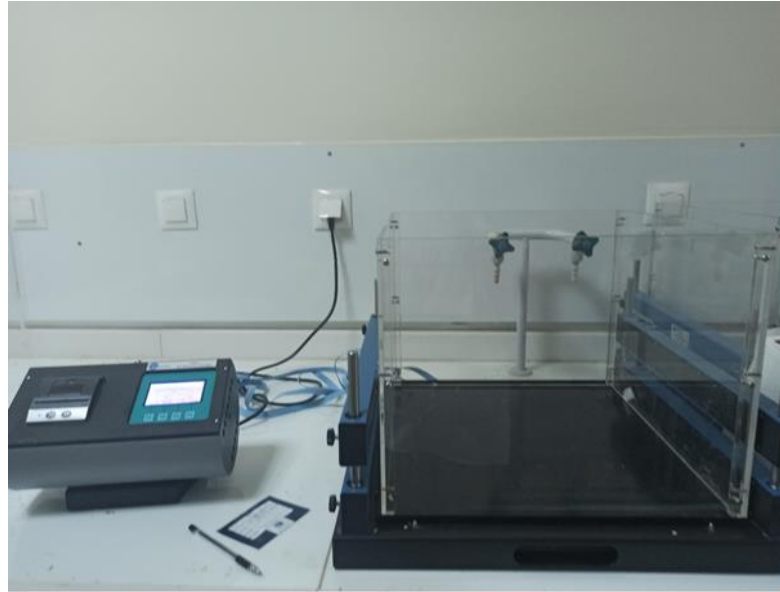
Şekil 10. *Delikli tahta (Hole-board) testi*



Şekil 11. *Açık alan (Open-field area) testi*



Şekil 12. *Aydınlık-karanlık kutu (Light-Dark Box) testi*



Şekil 13. *Spontan lokomotor aktivite testi*

3.3. KLN Sistem Formülasyonlarının Hazırlanması ve Karakterizasyonu

KLN sistem formülasyonu için sıcakta hazırlama ve ultrasonikasyon ile homojenizasyon tekniği kullanıldı. KLN hazırlamada kullanılacak olan katı lipit, erime derecesinin yaklaşık 5-10 °C üzerine ısıtıldı. Etkin madde bu eriyikte çözündürüldü. Yüzey etkin madde (YEM) içeren sulu faz da aynı sıcaklığa getirildi. Elde edilen karışımlar sonikatörde bir araya getirilerek homojenize edildi. Formülasyon kontrollü olarak oda sıcaklığına soğutuldu. Lipidin kristalleşerek KLN'ler oluşturuldu. Elde edilen KLN'lerin

partikül boyutları karşılaştırılıp en uygun formülasyon seçildi. Formülasyon çalışmalarında, Dynasan ® 114 ve Compritol ® ATO 888 kullanıldı. YEM olarak Tween® 80 tercih edildi. Etkin maddeli formülasyonlar dışında aynı yöntemle plasebo formülasyonlar da hazırlandı.

3.3.1. Ferulik Asit Miktar Tayini Yöntemi

İn vitro çalışmalarda etkin maddenin miktar tayini Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi (YBSK) yöntemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Literatürde yer alan yöntem modifiye edilerek uygulanmıştır (Trombino vd., 2013). YBSK'nin çalışma koşulları Tablo 3.3.1 'de sunulmuştur.

Tablo 3.3.1. Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi çalışma koşulları

Kolon	250×4.6 mm LiChrospher® 100 RP-18 oktadesil silan
Fırın Sıcaklığı	30°C
Hareketli Faz	Asetonitril: Su (20:80) + %0.5 glasiyal asetik asit
Dedektör	Floresan Dedektör
Çalışılan Dalga Boyu	320 nm
Akış Hızı	0.8 mL·dk-1
Enjeksiyon Hacmi	20 mL

Analitik yöntem validasyonunun amacı kullanılacak yöntemin uygunluğunu kanıtlamaktır. Miktar tayini validasyonunda doğrusalık, kesinlik ve doğruluk parametreleri esas alınmıştır. Tez çalışmamızda, Uluslararası Harmonizasyon Kongresi'nin Analitik İşlem Validasyon Yöntemi' kullanılmıştır (ICH, 2014).

3.3.2. KLN karakterizasyonuna ait çalışmalar

3.3.2.1. Parçacık boyutu ve dağılımı analizi

Hazırlanan KLN formülasyonunun parçacık boyutu ile dağılımı NaCl ile 50 Ms iletkenliğe ayarlanan distile suda disperse edilerek ölçülmüştür. Parçacık boyutu ve dağılımı Zetasizer Nano ZS (Malvern, İngiltere) cihazı kullanılarak belirlenmiştir (Zielińska vd., 2019).

3.3.2.2. Zeta potansiyel

Hazırlanan formülasyonunun zeta potansiyel ölçümü Zetasizer Nano ZS (Malvern, İngiltere) cihazı kullanılarak yapılmıştır. Ölçüm, zeta hücresinde, 25°C oda sıcaklığında ve distile su ile seyreltilerek gerçekleştirilmiştir. Distile suyun iletkenliğinin neden olabileceği ufak değişimin ölçüm sonucunu etkilememesi amacıyla distile suyun iletkenliği ölçümden önce NaCl ile 50 µs'e ayarlanmıştır (Büyükköroğlu, 2016; Elmaskaya, 2020).

3.3.2.3. Formülasyonda etkin madde miktar tayini

Dynasan® 114 katı lipiti ile hazırlanan KLN formülasyonunda yüzeyde kalan etkin madde miktar tayini için etkin maddenin çözündüğü ancak lipitin çözünmediği çözücü olan hareketli faz kullanılmıştır. Tez çalışmamızda tam olarak tartılmış Dynasan® 114-FA formülasyonu 5 mL'lik tüpe alınmış ve üzerine 4 mL hareketli faz eklenmiştir.

Liyofilize Formülasyon ultrasonik banyoda lipitin erime derecesinin 10°C üzerindeki sıcaklıkta (70-80°C) 5 dk tutulduktan sonra 15 dk 13.000 rpm'de santrifüj edilerek saydam kısım alınarak ve selüloz asetat filtreden süzülüp analiz edilmiştir. Süpernatanda bulunan serbest etkin madde miktarı, ilgili dalga boyunda YBSK kullanılarak analiz edilmiştir.

Enkapsülasyon etkinliği hesabı aşağıda verilen eşitlik ile gerçekleştirilmiştir.

$$\% \text{Enkapsülasyon etkinliği} = \left[\frac{\text{(Formülasyondaki etkin madde derişimi)} - \text{(Süpernatandaki etkin madde derişimi)}}{\text{(Formülasyondaki etkin madde derişimi)}} \right] \times 100 \dots \dots \dots (3.1)$$

3.4. Deney Hayvanları

Deneylerimizde Anadolu Üniversitesi Deney Hayvanları Araştırma ve Uygulama Birimi'nden alınmış olan yaklaşık 25-30 g ağırlığında Balb-C(Erkek) fareler kullanılmıştır. Fareler, 12 saat gece/gündüz aydınlatmalı, 18-25°C'de, iyi havalandırılmış odalarda barındırılmıştır. Beslenmeleri verilen standart yem peletleri ve çeşme suyu

verilerek sağlanmıştır. Kendi aralarında eşit sayılarda gruplandırılmış, beslenmeleri amacıyla standart yem paletleri verilerek istedikleri kadar yem ve su tüketmelerine izin verilmiştir. Tez çalışmamız Anadolu Üniversitesi Farmakoloji Ana Bilim Dalı laboratuvarında sıcaklık ve nem sabit bir ortamda her gün 09.00-16.00 saatleri arasında yapılmıştır. Tez çalışmanın etik kurul onayı 17.03.2021 tarih 2021-11 karar numarası ile Anadolu Üniversitesi Hayvan Deneyle Yere Etik Kurulu'ndan alınmıştır.

3.5. Deney Gruplarının Oluşturulması ve İlaç Uygulamaları

Deneylerimizde test maddeleri akut ve subkronik olarak incelendi. Bu amaçla ferulik asit ve KLN-ferulik asit önce akut uygulanarak madde uygulamasında 30 dk sonra test edilmiş ardından subkronik uygulanarak 1 hafta süre ile enjeksiyonlar yapılmış ve 1 haftanın sonunda enjeksiyondan 30 dk. sonra yine deneyler tekrar edildi.

Deney grupları Tablo 3.5.'de verildiği şekilde oluşturuldu (n= 8). Kontrol grubuna çözücü olarak kullanılan %8'lik Tween 80, intraperitoneal (i.p.) yoldan 0.1 ml hacimde uygulandı. Pozitif kontrol olarak kullanılan diazepam (1 mg/kg) dozunda i.p. olarak verildi. Anksiyete deneyleri için oluşturulan gruplara sırasıyla (25 mg/kg), (50 mg/kg) ve (100 mg/kg) dozlarında saf ferulik asit (i.p.) uygulandı. İlaç uygulamalarının ardından 30 dakika sonra deney düzeneklerinde hayvanların verdiği tepkiler ölçüldü. Daha sonra ferulik asitin KLN formülasyonunda aynı dozlarda deney gruplarına uygulandı ve test edildi. Ayrıca, [Diazepam(0,5 mg/kg)+saf ferulik asit(25 mg/kg)] ve [Diazepam(0.5 mg/kg)+KLN-ferulik asit(25 mg/kg)] kombinasyonunda deney gruplarına (i.p.) uygulanarak test edildi. Tüm bu işlemler subkronik uygulamada da tekrar edildi.

Tablo 3.5. *Deney ve kontrol grupları*

Deney ve kontrol grupları
1. Kontrol (Tween 80)
2. Diazepam (1 mg/kg)
3. Ferulik asit (25 mg/kg)
4. Ferulik asit (50 mg/kg)
5. Ferulik asit (100 mg/kg)
6. KLN-Ferulik asit (25 mg/kg)
7. KLN-Ferulik asit (50 mg/kg)
8. KLN-Ferulik asit (100 mg/kg)
9. Diazepam (0.5 mg/kg) +FA (25 mg/kg)
10. Diazepam (0.5 mg/kg) +KLN-FA (25 mg/kg)

3.6. Anksiyete Modelleri

3.6.1. Açık alan testi (Open-field area test)

Test sırasında hayvan merkeze bırakıldı. Açık alandaki hareketleri 5 dakika süresince gözlemlendi. Ayrıca test uygulanırken hayvanın davranışlarını gözleme esnasında herhangi bir parametrenin gözden kaçabilme ihtimaline karşın deneyler manuel ölçümler ile eş zamanlı olarak kamera ile de kayıt altına alındı. Bu süre içerisinde hayvanın merkezde ve periferde geçilen kare sayıları ile bu kareleri geçme sürelerine bakıldı. Çalışma süresince her bir hayvandan sonra, düzenekteki idrar ve dışkı kalıntıları %70'lik etanol ile temizlendi (Liu vd., 2019).

3.6.2. Delikli tahta testi (Hole-board test)

Fareler teker teker hole-board test düzeneği üzerine kondu ve kafa daldırma sayıları ve keşfedilen delik sayısı 5 dk. süre boyunca kaydedildi. Ayrıca ilk kafa daldırma süreleri de kaydedildi. Her ölçüm arasında hole-board yüzeyi %70'lik etanol ile temizlendi (Han vd., 2009).

3.6.3. Yükseltilmiş artı labirent testi (Elevated plus maze test)

Test sırasında hayvan düzeneğin merkezine bırakıldı. 5 dakika süresi boyunca hayvanın hareketleri kaydedildi. Çalışma süresince her bir denekten sonra, düzenekteki idrar ve dışkı kalıntıları %70'lik etanol ile temizlendi.

3.6.4. Spontan lokomotor aktivite testi

Spontan lokomotor aktiviteyi değerlendirmek için, pleksiglas, kafes şeklinde olan aktivite kafesi isimli cihazı kullanıldı. Cihazın karşılıklı iki dikey kenarında bulunan parçalar kızıl ötesi ışınları üretmekte ve hayvan yatay ve dikey yönlerdeki hareketleri bu ışınları kesintiye uğratmakta ve bu şekilde fotosel yardımıyla kaydedildi. Cihazın elektronik düzeneği ölçülen veriyi önceden belirlenmiş olan aralıklarla kaydedildi ve yazdırıldı (Marazioti vd., 2009). İlaçların uygulanmasından sonra anksiyete deney modellerinden sonra 15'er dk. süre boyunca hayvanların lokomotor aktiviteleri ölçüldü.

3.6.5. Aydınlık-karanlık kutu testi (Light-dark box test)

Test düzeneği, aydınlık ve karanlık bölgeler olmak üzere iki kompartmandan oluşmaktadır. Fareler ayrı ayrı kapıya bakan karanlık bölmenin ortasına yerleştirilecek ve aktivite 5 dakika süreyle kaydedildi. Aydınlık bölmeye ilk geçiş zamanı (yani, sıçanın karanlık bölmeye ilk olarak yerleştirilmesinden tamamen aydınlık bölmesine geçmesine kadar geçen süre), aydınlık bölme de kalma zamanı ve aydınlık ve karanlık bölmelere

toplam geçiş sayıları gözlemlendi (Rodríguez-Landa vd., 2019; Mi vd., 2005). Düzenekteki idrar ve dışkı kalıntıları %70'lik etanol ile temizlendi. Ayrıca test uygulanırken hayvanın keşif ve anksiyete bozukluğunu işaret eden davranışları gözleme esnasında herhangi bir parametrenin gözden kaçabilme ihtimaline karşın deneyler kamera ile de kayıt altına alındı.

3.7. İstatistiksel Analiz

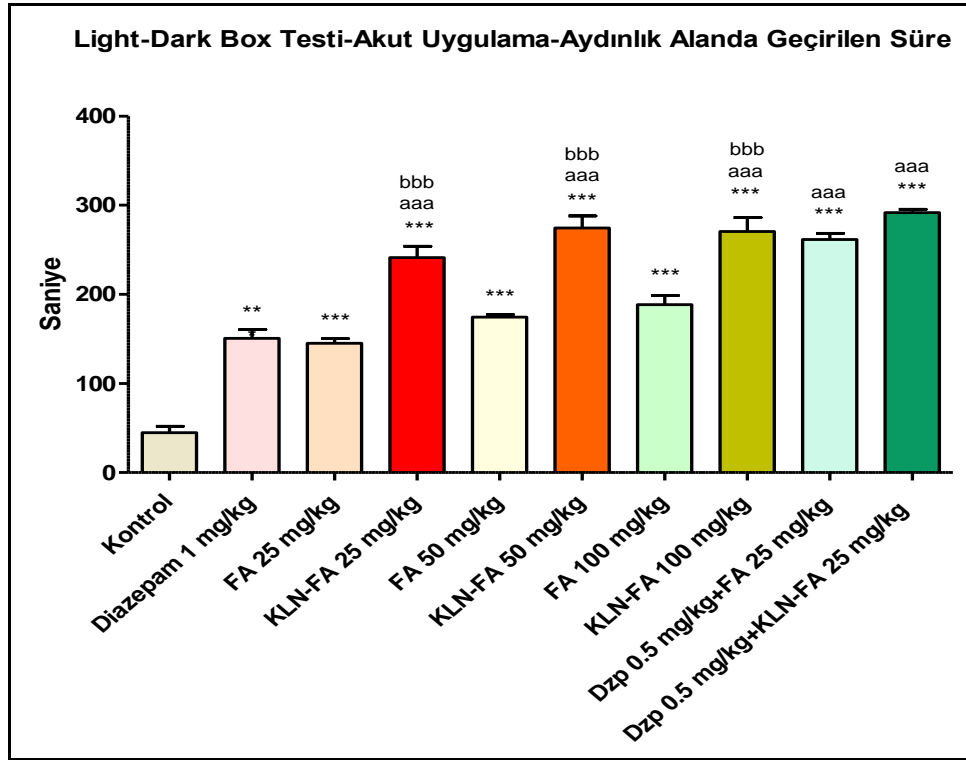
Tez alışmamızda verilen tüm değerler, deney sonucunda elde edilen verilerin istatistiksel ortalaması olarak verildi (ortalama \pm standart hata [SEM]). Hayvanlarda anksiyolitik benzeri etkinin ve lokomotor aktivitenin değerlendirilmesi için tek-yönlü varyans analizi (ANOVA) ve ardından Tukey HSD oklu karşılaştırma testi kullanıldı. Tüm istatistiksel analiz sonuçları GraphPad Prism ver. 5.0 paket programı kullanılarak hesaplandı. İstatistiksel anlamlılık düzeyi başlangıcı olarak $p < 0.05$ kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. Akut Uygulama Sonuçları

4.1.1. Aydınlik-karanlık kutu (Light-dark box) testi sonuçları

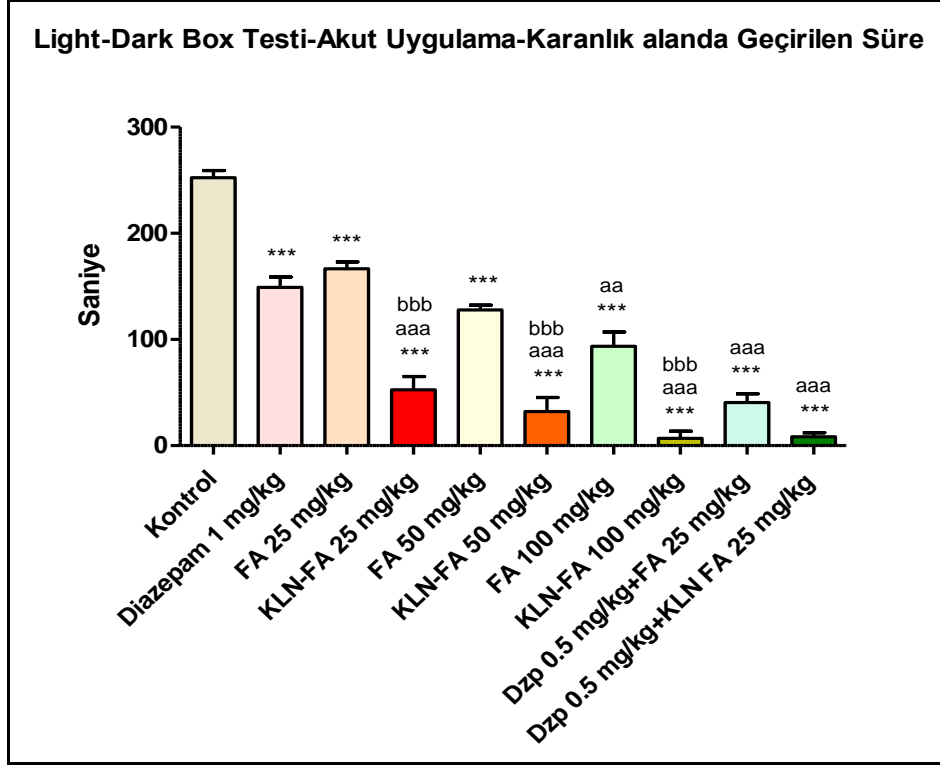
Bu test düzeneği, aydınlık ve karanlık bölgeler olmak üzere iki kompartmandan oluşmaktadır. Hayvanların aydınlık ve karanlık bölgelerde geçirmiş olduğu süreler ölçülmüştür. Şekil 14’de deney hayvanlarının aydınlık alanda geçirdikleri sürelere göre elde edilen veriler görülmektedir. Tüm deney grupları kontrole göre anlamlı düzeyde anksiyolitik benzeri etkili bulunmuştur ($^{***}p < 0.001$). Saf ferulik asit ve KLN-ferulik asit uygulanan tüm dozlarda (25 mg/kg),(50 mg/kg),(100 mg/kg) birbirleriyle karşılaştırıldığında KLN formülasyonlu grupların etkiyi anlamlı derecede arttırdığı görülmektedir (tüm dozlarda KLN-ferulik asitin anlamlılığı; $^{bbb}p < 0.001$). Diazepam göre karşılaştırıldığında KLN-ferulik asit ve kombinasyonlu tüm dozlarda anlamlı düzeyde anksiyolitik benzeri etki vardır ($^{aaa}p < 0.001$).



Şekil 14. Akut Aydınlik-Karanlık Kutu (Light-Dark Box) Testinde aydınlık alanda geçirilen süre verileri.

$^{***}p < 0.001$; Kontrol grubuna göre anlamlı farklılık (n: 8); $^{bbb}p < 0.001$, Saf FA grubunun KLN-FA grubuna göre anlamlı farklılık (n: 8); $^{aaa}p < 0.001$, Diazepam grubuna göre anlamlı farklılık (n: 8).

Tek-yönlü ANOVA ve ardından Tukey HSD çoklu karşılaştırma testi uygulanmıştır.



Şekil 15. Akut Aydınlik-Karanlık Kutu (Light-Dark Box) Testinde karanlık alanda geçirilen süre verileri.

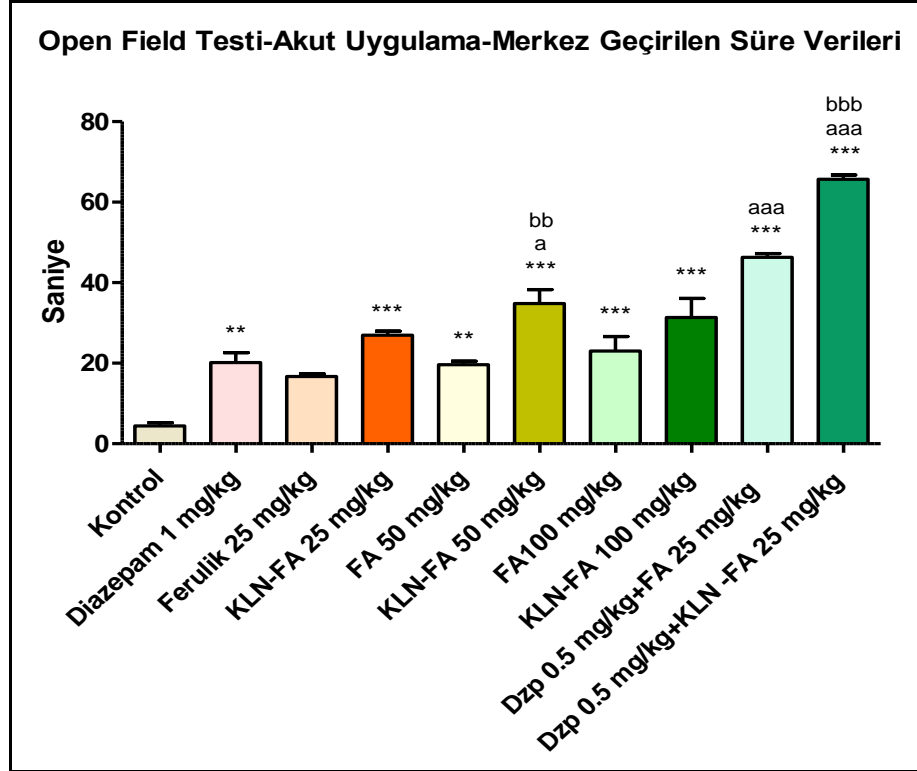
*** $p < 0.001$; Kontrol grubuna göre anlamlı farklılık (n: 8); ^{bbb} $p < 0.001$; Saf FA grubunun KLN-FA grubuna göre anlamlı farklılık (n: 8); ^{aaa} $p < 0.001$, ^{aa} $p < 0.01$; Diazepam grubuna göre anlamlı farklılık(n: 8). Tek-yönlü ANOVA ve ardından Tukey HSD çoklu karşılaştırma testi uygulanmıştır.

Aynı şekilde bu test düzeneğinde karanlık alanda geçirilen süreler şekil 15’de görülmektedir. Tüm gruplar kontrole göre anlamlıdır ve tüm dozlarda KLN-ferulik asit saf ferulik asite göre anksiyolitik benzeri etkide anlamlı bir artış sağlamıştır (** $p < 0.001$, ^{bbb} $p < 0.001$). KLN-ferulik asit formülasyonu kullanılan tüm dozlarında diazepam ile karşılaştırıldığında da anlamlı bir etki göstermektedir (^{aaa} $p < 0.001$, ^{aa} $p < 0.05$).

4.1.2. Açık alan (Open-field area) testi sonuçları

Bu test düzeneği 16 kare perifer, 9 kare merkez olmak üzere toplam 25 kareden oluşur. Hayvanların merkez bölgedeki geçtikleri kare sayısı ile bu bölge de geçirilen süreler ölçülmüştür. Şekil 16 ‘de deney hayvanlarının merkez bölgedeki geçirdikleri süreler gösterilmiştir. Kontrole göre ferulik asit 25 mg hariç hepsi anlamlı düzeyde anksiyolitik benzeri etkide etkili çıkmıştır (** $p < 0.001$, $p < 0.01$). Saf FA ve KLN-FA karşılaştırıldığında KLN-FA (50 mg/kg) ve [Diazepam (0.5 mg/kg)+KLN-FA(25 mg/kg)] dozlarında anlamlı düzeyde anksiyolitik benzeri etki bulunmuştur (^{bbb} $p < 0.001$; ^b $p < 0.05$). KLN-FA (25 mg/kg) ve (100 mg/kg) da anlamlı düzeyde anksiyolitik benzeri

etki bulunmamıştır. Ancak anksiyolitik benzeri etkide göreceli düzeyde bir artış vardır. Diazepam'a göre karşılaştırıldığında KLN-FA(50 mg/kg), [Diazepam(0,5 mg/kg)+FA(25 mg/kg)] ve [Diazepam(0.5 mg/kg)+KLN-FA(25 mg/kg)] dozlarında anlamlı olarak anksiyolitik benzeri etki bulunmuştur (^{aaa} $p<0.001$; ^{aa} $p<0.05$). Diğer dozlarında anlamlı düzeyde anksiyolitik benzeri etki bulunamamıştır. Ancak diğer dozlarında anksiyolitik benzeri etki de göreceli bir artış vardır.

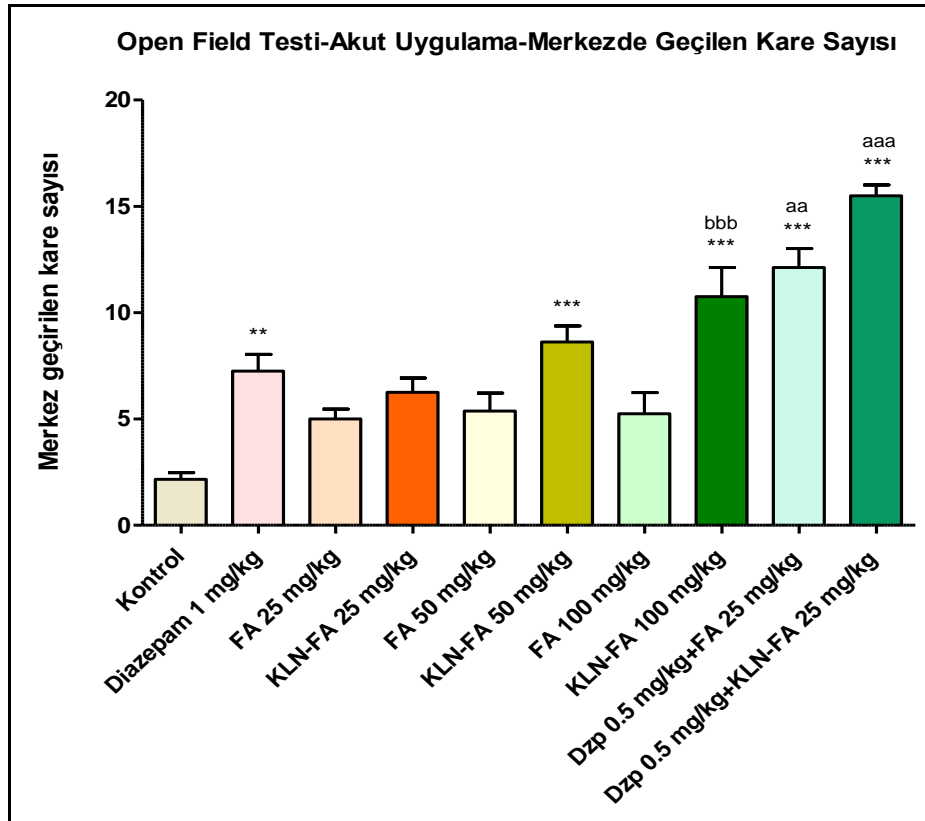


Şekil 16. Akut Açık Alan (Open-Field Area) Testinde merkezde geçirilen süre verileri.

*** $p<0.001$, ** $p<0.01$; Kontrol grubuna göre anlamlı farklılık (n: 8); ^{bbb} $p<0.001$, ^{bb} $p<0.01$; Saf FA grubunun KLN-FA grubuna göre anlamlı farklılık (n: 8); ^{aaa} $p<0.001$, ^a $p<0.05$; Diazepam grubuna göre anlamlı farklılık (n: 8). Tek-yönlü ANOVA ve ardından Tukey HSD çoklu karşılaştırma testi uygulanmıştır.

Açık alan testinde merkezde geçilen kare sayısı şekil 17'de görülmektedir. Merkez de geçilen kare sayısı değerlendirildiğinde kontrole göre diazepam(1 mg/kg), KLN-FA(50 mg/kg) ve (100 mg/kg) ve kombinasyonlu dozlarda anlamlı olarak anksiyolitik benzeri etki bulunmuştur (^{***} $p<0.001$; ^{**} $p<0.01$). Saf FA, KLN-FA ile karşılaştırıldığında sadece (100 mg/kg) dozunda anlamlı olarak anksiyolitik benzeri etki görülmüştür (^{bbb} $p<0.001$). Ferulik asitin diğer dozlarında saf FA ile KLN-FA arasında anlamlı düzeyde anksiyolitik benzeri etki görülmemiştir. Ancak anksiyolitik benzeri etki

de göreceli bir artış vardır. Anksiyolitik benzeri etki diazepamı göre karşılaştırıldığında [Diazepam(0,5 mg/kg)+FA(25 mg/kg)] ve [Diazepam(0.5 mg/kg)+KLN-FA(25 mg/kg)] dozlarında anlamlı olarak etki bulunmuştur (^{aaa} $p<0.001$,^{aa} $p<0.01$). Ancak diğer dozlarında anlamlı anksiyolitik benzeri etki bulunamamıştır. Yalnızca KLN-FA (50 mg/kg) ve (100 mg/kg) dozlarında göreceli bir artış vardır.



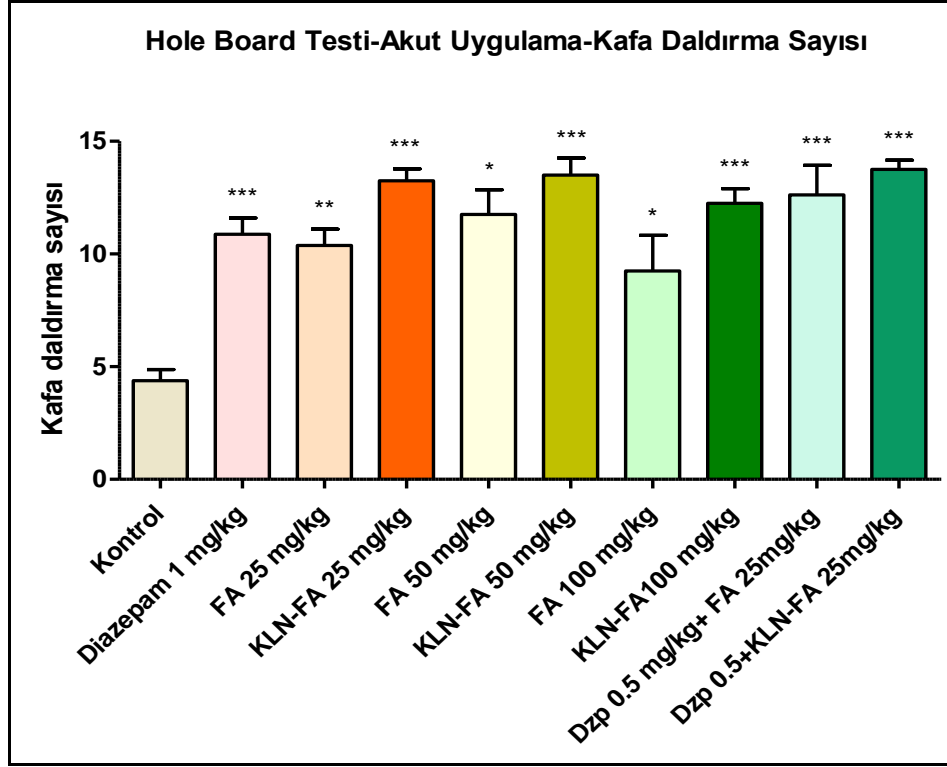
Şekil 17. Akut Açık Alan (Open-Field) Testinde merkezde geçilen kare sayısı verileri.

^{***} $p<0.001$, ^{**} $p<0.01$; Kontrol grubuna göre anlamlı farklılık (n: 8); ^{bbb} $p<0.001$; Saf FA grubunun KLN-FA grubuna göre anlamlı farklılık (n: 8); ^{aaa} $p<0.001$, ^{aa} $p<0.01$; Diazepam grubuna göre anlamlı farklılık (n: 8). Tek-yönlü ANOVA ve ardından Tukey HSD çoklu karşılaştırma testi uygulanmıştır.

4.1.3. Delikli tahta (Hole-board) testi sonuçları

Bu test düzeneğinde kafa daldırma sayısına ve keşfedilen delik sayısına bakılmıştır. Delikli tahta testinde kafa daldırma sayısı Şekil 18' de gösterilmektedir. Kafa daldırma sayısına bakıldığında tüm dozlar kontrole göre anksiyolitik benzeri etki de anlamlı bulunmuştur (^{***} $p<0.001$; ^{**} $p<0.01$; ^{*} $p<0.05$). Saf FA ve KLN-FA arasında bakıldığında anksiyolitik benzeri etki de anlamlı bir fark görülememiştir. Ancak göreceli olarak anksiyolitik benzeri etki de göreceli bir artış vardır. Diazepamı göre bakıldığında yine

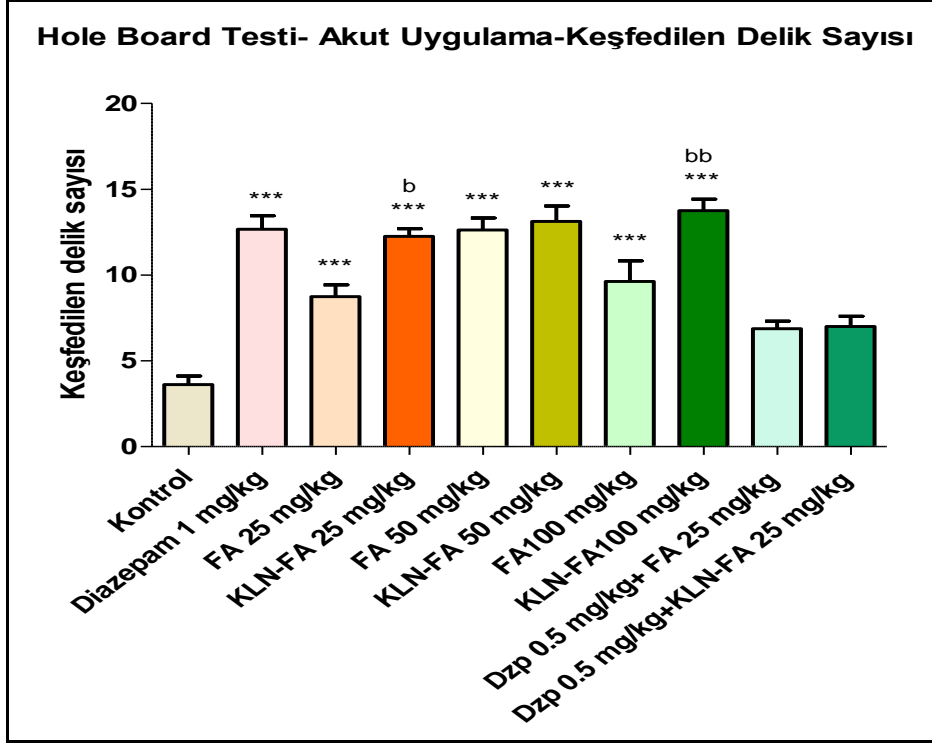
anksiyolitik benzeri etki de anlamlı bir fark görülememiştir. Ancak FA(50 mg/kg), KLN-FA(25 mg/kg),(50 mg/kg),(100 mg/kg) ve kombinasyon dozları göreceli anlamlı çıkmıştır. FA(25 mg/kg),(100 mg/kg) da anlamlı ve göreceli olarak anksiyolitik benzeri etki de artış görülmemiştir.



Şekil 18. Akut Delikli Tahta (Hole-Board) Testinde kafa daldırma sayısı verileri.

*** $p<0.001$, ** $p<0.01$, * $p<0.05$; Kontrol grubuna göre anlamlı farklılık (n: 8); Tek-yönlü ANOVA ve ardından Tukey HSD çoklu karşılaştırma testi uygulanmıştır.

Delikli tahta testinde keşfedilen delik sayısı şekil 19’ de gösterilmektedir. Keşfedilen delik sayısına bakıldığında kombinasyonlu dozlar hariç hepsi kontrole göre anksiyolitik benzeri etki de anlamlı çıkmıştır (** $p<0.001$). Saf ferulik asit ve KLN-ferulik asit arasında anksiyolitik benzeri etkiye bakıldığında KLN-ferulik asit (25 mg/kg) ve (100 mg/kg) dozlarında anlamlı olduğu görülmüştür (^{bb} $p<0.01$, ^b $p<0.05$). Ancak (50 mg/kg) ve kombinasyonlu dozlarda göreceli olarak anksiyolitik benzeri etkide artış vardır. Dizapeme göre anksiyolitik benzeri etki bakıldığında hiçbir dozda anlamlı bir artış yoktur. Göreceli olarak KLN-FA(50 mg/kg) ve (100 mg/kg) dozlarında anksiyolitik benzeri etki de artış vardır. Diğer dozlarda göreceli olarak da bir artış görülememiştir.

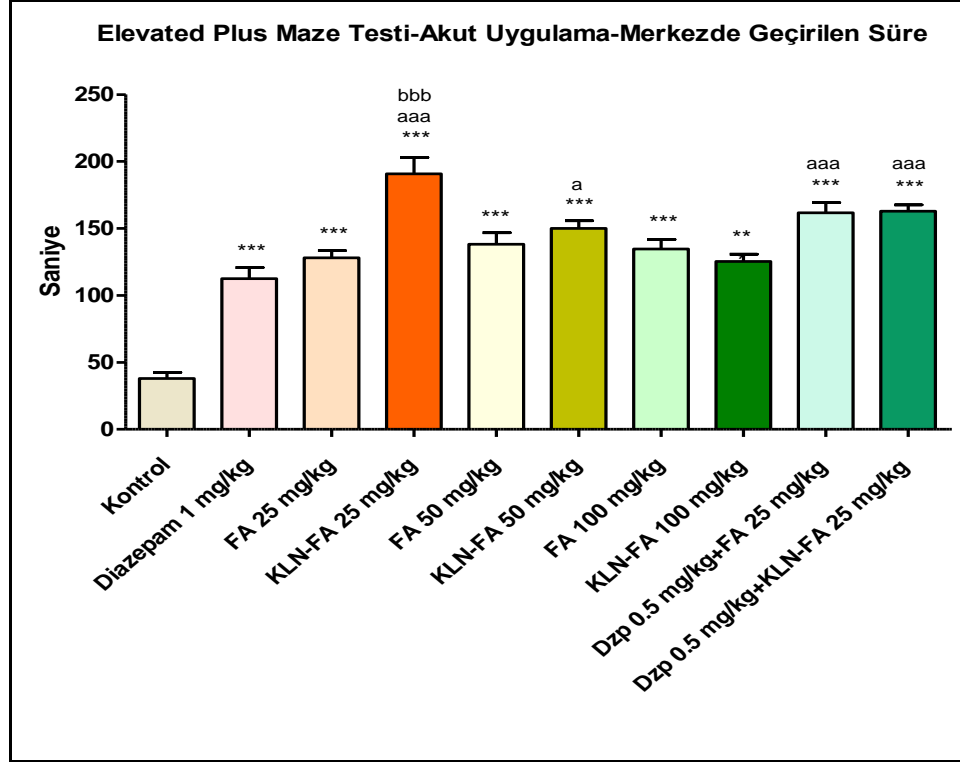


Şekil 19. Akut Delikli Tahta (Hole-Board) Testinde keşfedilen delik sayısı verileri.

*** $p < 0.001$; Kontrol grubuna göre anlamlı farklılık (n: 8); b $p < 0.05$, bb $p < 0.01$; Saf ferulik asit grubunun KLN-FA grubuna göre anlamlı farklılık (n: 8); Tek-yönlü ANOVA ve ardından Tukey HSD çoklu karşılaştırma testi uygulanmıştır.

4.1.4. Yükseltilmiş artı labirent (Elevated plus maze) testi sonuçları

Bu test düzeneğinde şekil 20' de gösterilen merkezde geçirilen süreye bakılmıştır. Tüm dozlar kontrole göre anksiyolitik benzeri etkide olarak anlamlı bulunmuştur (** $p < 0.001$). Saf FA ve KLN-FA arasında anksiyolitik benzeri etkiye bakıldığında KLN-FA(25 mg/kg) dozunda anlamlı olduğu görülmüştür (bbb $p < 0.001$). Ancak (50 mg/kg) ve kombinasyonlu dozlarda göreceli olarak anksiyolitik benzeri etki de artış vardır. (100 mg/kg) dozunda göreceli olarak da bir artış görülmemiştir. Dizapeme göre anksiyolitik benzeri etki incelendiğinde KLN-FA (100 mg/kg) hariç diğer KLN-FA dozlarında ve [Diazepam(0.5 mg/kg)+KLN-FA(25 mg/kg)] kombinasyon dozunda anlamlı olarak bir artış söz konusudur (aaa $p < 0.001$, a $p < 0.05$). Göreceli olarak KLN-FA (100 mg/kg) ve diğer dozlarında anksiyolitik benzeri etki de artış vardır.

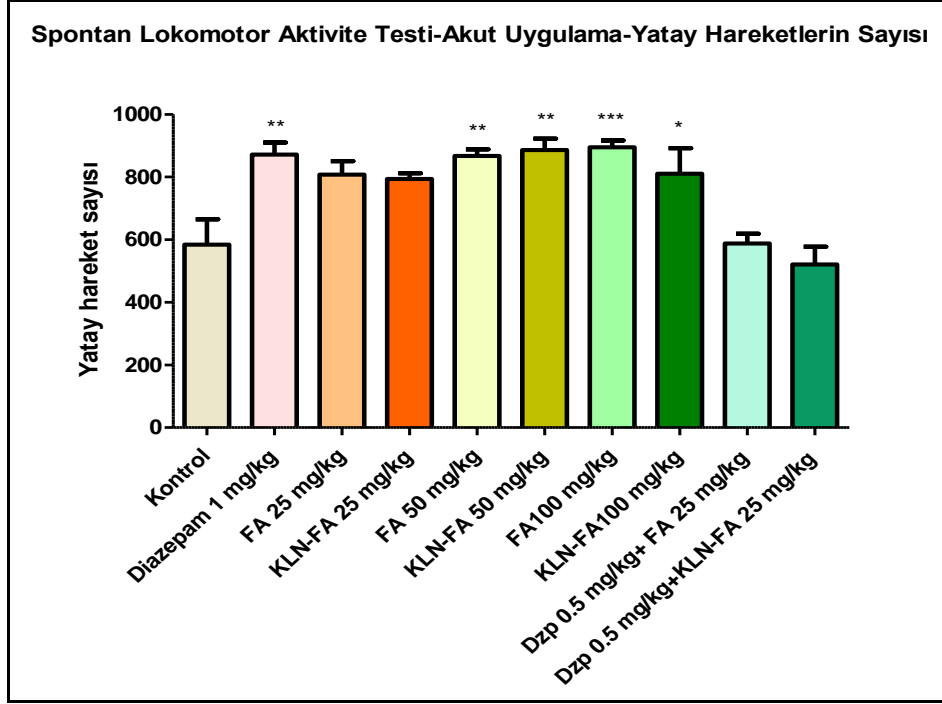


Şekil 20. Akut Yükseltmiş Artı Labirent (Elevated Plus Maze) Testinde merkezde geçirilen süre verileri.

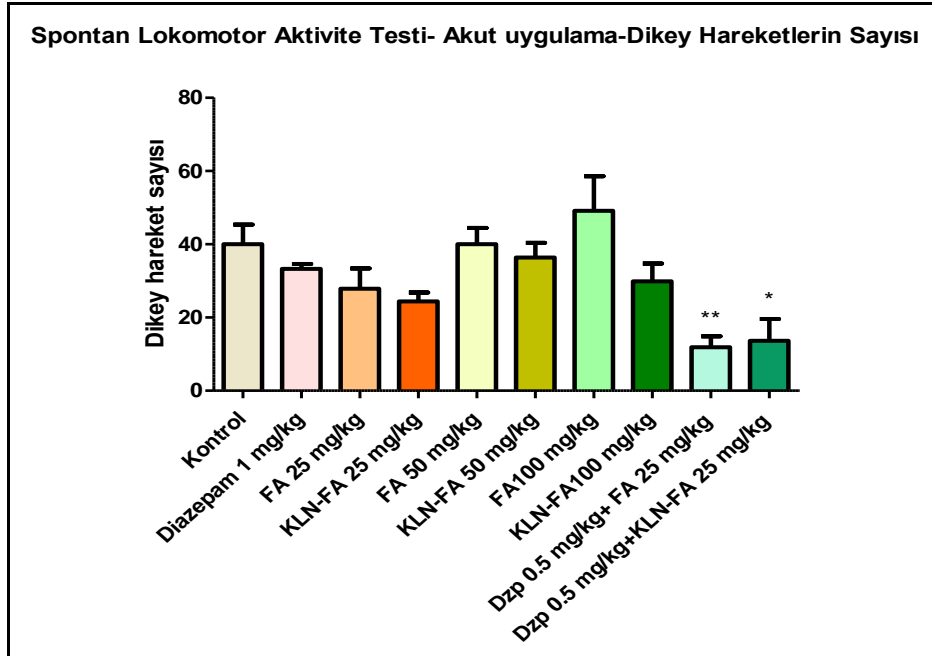
*** $p < 0.001$; Kontrol grubuna göre anlamlı farklılık (n: 8); ^{bbb} $p < 0.001$; Saf FA grubunun KLN-FA grubuna göre anlamlı farklılık (n: 8); ^{aaa} $p < 0.001$, ^a $p < 0.05$; Diazepam grubuna göre anlamlı farklılık (n: 8). Tek-yönlü ANOVA ve ardından Tukey HSD çoklu karşılaştırma testi uygulanmıştır.

4.1.5. Spontan lokomotor aktivite testi sonuçları

Şekil 21 ve 22’de tüm dozların akut uygulamalarının spontan lokomotor aktivite testi deneylerinde yatay ve dikey hareketlerinin sayısı görülmektedir. Akut uygulamada yatay hareketlerinin sayısı kontrole göre incelendiğinde FA(25 mg/kg), KLN-FA(25 mg/kg) ve kombinasyonlu dozlar dışında tüm dozlarda anlamlı bir artış söz konusudur(* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$). FA(25 mg/kg) ve KLN-FA(25 mg/kg) dozlarında ise göreceli olarak anlamlı bir artış gözlenmiş olup [DZP(0.5 mg/kg)+ FA(25 mg/kg)] dozunda değişme olmamıştır. Yatay hareketlerde artış solması bize lokomotor aktivitede artış olduğunu düşünmektedir. Sedasyon gelişmemiştir. [DZP(0.5 mg/kg)+KLN-FA(25 mg/kg)] dozunda ise düşme gözlenmiştir. Dikey hareketlerin sayısı incelendiğinde, kombinasyonlu dozlarda anlamlı olarak kontrole göre düşüşler gözlenmiştir(* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$). Kontrole göre dikey hareketlerdeki düşüşler keşif davranışının azaldığı anlamına gelmektedir.



Şekil 21. Akut Spontan Lokomotor Aktivite Testinde yatay hareketlerin sayı verileri. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$; Kontrol grubuna göre anlamlı farklılık (n: 8); Tek-yönlü ANOVA ve ardından Tukey HSD çoklu karşılaştırma testi uygulanmıştır.

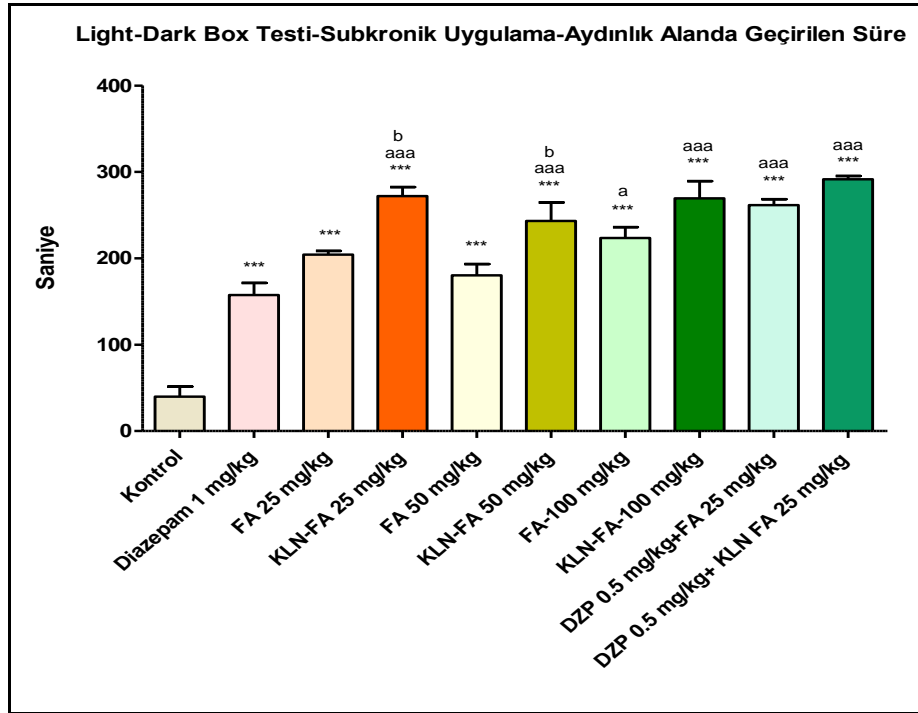


Şekil 22. Akut Spontan Lokomotor Aktivite Testinde dikey hareketlerin sayı verileri. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$; Kontrol grubuna göre anlamlı farklılık (n: 8); Tek-yönlü ANOVA ve ardından Tukey HSD çoklu karşılaştırma testi uygulanmıştır.

4.2. Subkronik Uygulama Sonuçları

4.2.1. Aydınlık-karanlık kutu (Light-dark box) testi sonuçları

Bir hafta süresince saf FA ve KLN-FA uygulaması sonucu aydınlık alanda geçirilen süre test düzeneğinde elde edilen veriler şekil 23’de karşılaştırılmıştır. Bu sonuçlara göre tüm test maddeleri kontrol grubuna göre anlamlı anksiyolitik benzeri etki göstermiştir ($^{***}p<0.001$). Saf FA ve KLN-FA grupları karşılaştırıldığında ise (25 mg/kg) ve (50 mg/kg) dozlarda KLN formülasyonu anlamlı fark göstermiştir ($^b p<0.05$). (100 mg/kg) dozda ise KLN-FA istatistiksel olarak anlamlı etki göstermezken göreceli olarak anksiyolitik benzeri etkiyi artırmıştır. Tüm dozlardaki KLN formülasyonları diazepam ile karşılaştırıldığında anksiyolitik benzeri etki anlamlı olarak artış sağlamıştır ($^{aaa}p<0.001$). Kombinasyon gruplarının açık alanda kalma sürelerine bakıldığında ise kontrole ve diazepama göre anlamlı fark görülmektedir ($^{***}p<0.001$; $^{aaa}p<0.001$).

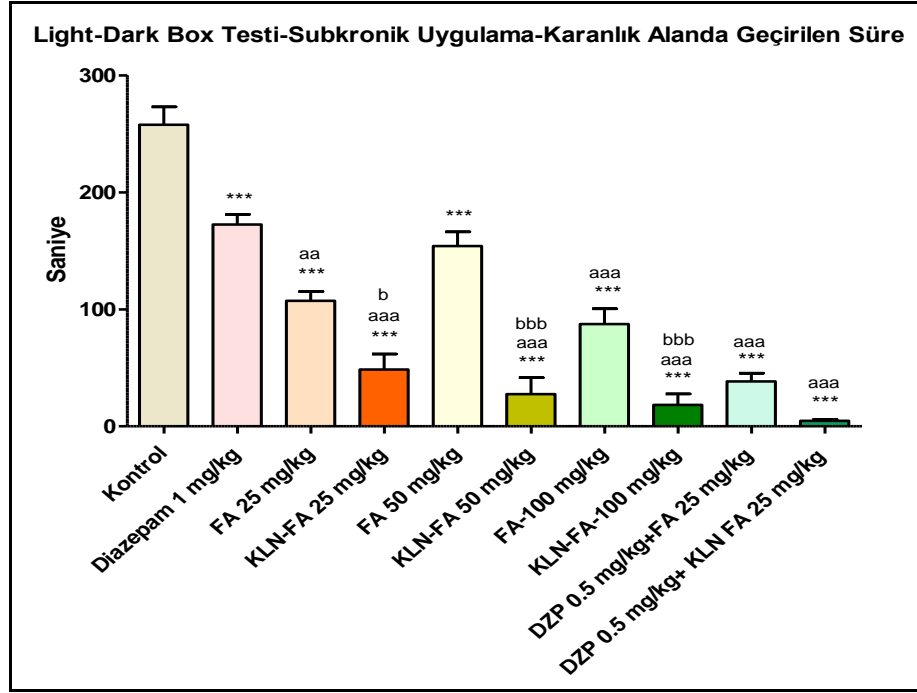


Şekil 23. Subkronik Aydınlik-Karanlık Kutu (Light-Dark Box) Testinde aydınlık alanda geçirilen süre verileri.

$^{***}p<0.001$; Kontrol grubuna göre anlamlı farklılık (n: 8); $^b p<0.05$; Saf FA grubunun KLN-FA grubuna göre anlamlı farklılık (n: 8); $^{aaa}p<0.001$, $^a p<0.05$; Diazepam grubuna göre anlamlı farklılık (n: 8). Tek-yönlü ANOVA ve ardından Tukey HSD çoklu karşılaştırma testi uygulanmıştır.

Bu test düzeneğinde şekil 24’de gösterilen karanlık alanda geçirilen süre değerlendirilmiştir. Aydınlik-karanlık kutu testinde karanlık alanda geçirilen süre

değerlendirildiğinde hem saf FA hem de KLN-FA grupları kontrole göre anlamlı etki göstermiştir. Bunun yanı sıra KLN-FA ile saf FA karşılaştırıldığında yine tüm dozlarda anlamlı etki görülmektedir (^b $p<0.05$;^{bbb} $p<0.001$). Diazepam(1 mg/kg) ile karşılaştırıldığında tüm KLN formülasyonları ve kombinasyonlu dozlarda anlamlı etki görülmüştür (^{aaa} $p<0.001$, ^{aa} $p<0.01$).



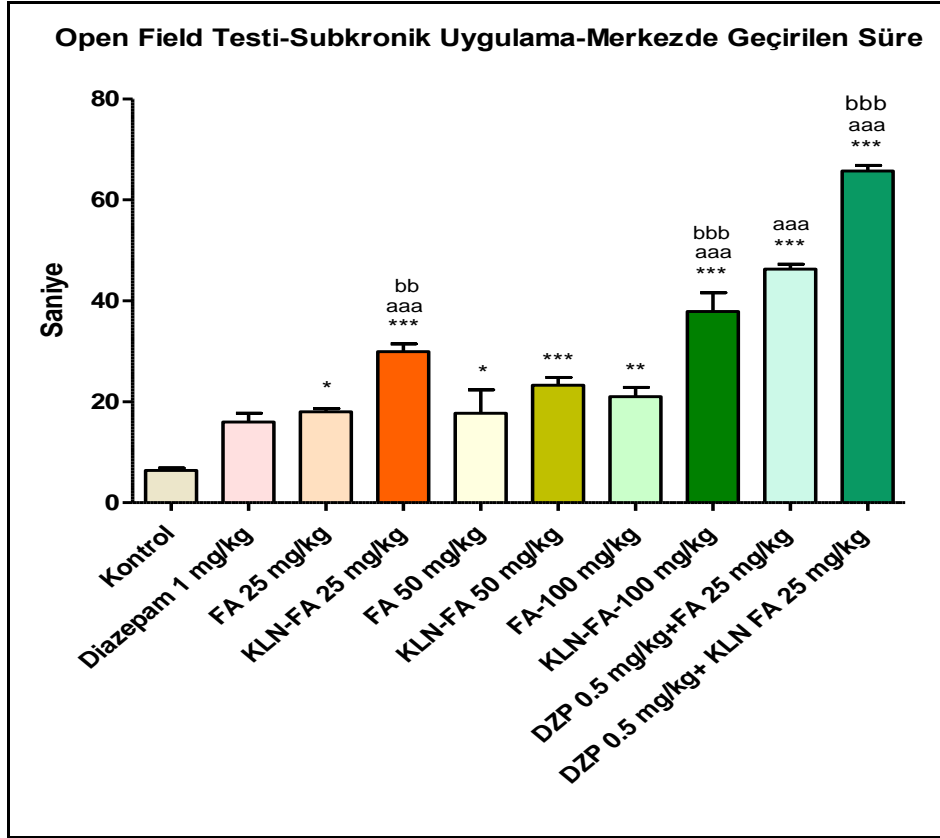
Şekil 24. Subkronik Aydınlık-Karanlık Kutu (Light-Dark Box) Testinde karanlık alanda geçirilen süre verileri.

*** $p<0.001$; Kontrol grubuna göre anlamlı farklılık (n: 8); ^{bbb} $p<0.001$, ^b $p<0.05$; Saf FA grubunun KLN-FA grubuna göre anlamlı farklılık (n: 8); ^{aaa} $p<0.001$, ^{aa} $p<0.01$; Diazepam grubuna göre anlamlı farklılık (n: 8). Tek-yönlü ANOVA ve ardından Tukey HSD çoklu karşılaştırma testi uygulanmıştır.

4.2.2. Açık alan (Open-field area) testi sonuçları

Anksiyolitik benzeri etkiyi değerlendirme de kullanılan diğer bir model açık alan testidir. Bu testte merkezde geçilen kare sayısı ile merkezde geçirilen süre değerlendirmeye alınmıştır. 1 hafta süresince uygulanan saf ferulik asit- KLN ferulik asit uygulamasında, Şekil 25’de gösterilen merkezde geçirilen sürede anksiyolitik benzeri etki incelendiğinde diazepam hariç tüm dozlar anlamlı olarak etkili çıkmıştır (^{***} $p<0.001$, ^{**} $p<0.01$, ^{*} $p<0.05$). Diazepam anksiyolitik etki olarak göreceli kontrole göre artış göstermiştir. Saf ferulik asit ile KLN-ferulik asit kendi aralarında incelendiğinde (50 mg/kg) dozu hariç tüm dozlarda anksiyolitik benzeri etki de anlamlı bir artış vardır (^{bbb} $p<0.001$, ^{bb} $p<0.01$). KLN- ferulik

asit (50 mg/kg) dozunda saf ferulik asite göre göreceli bir artış vardır. Diazepamı göre bakıldığında KLN-FA(50 mg/kg) dozu hariç tüm KLN-FA dozlarında anksiyolitik benzeri etki bakımından anlamlı bir artış vardır (^{aaa} $p<0.001$,^{aa} $p<0.01$). KLN-FA(50 mg/kg) dozunda ve diğer dozlarda anksiyolitik benzeri etki bakımından göreceli bir artış vardır.

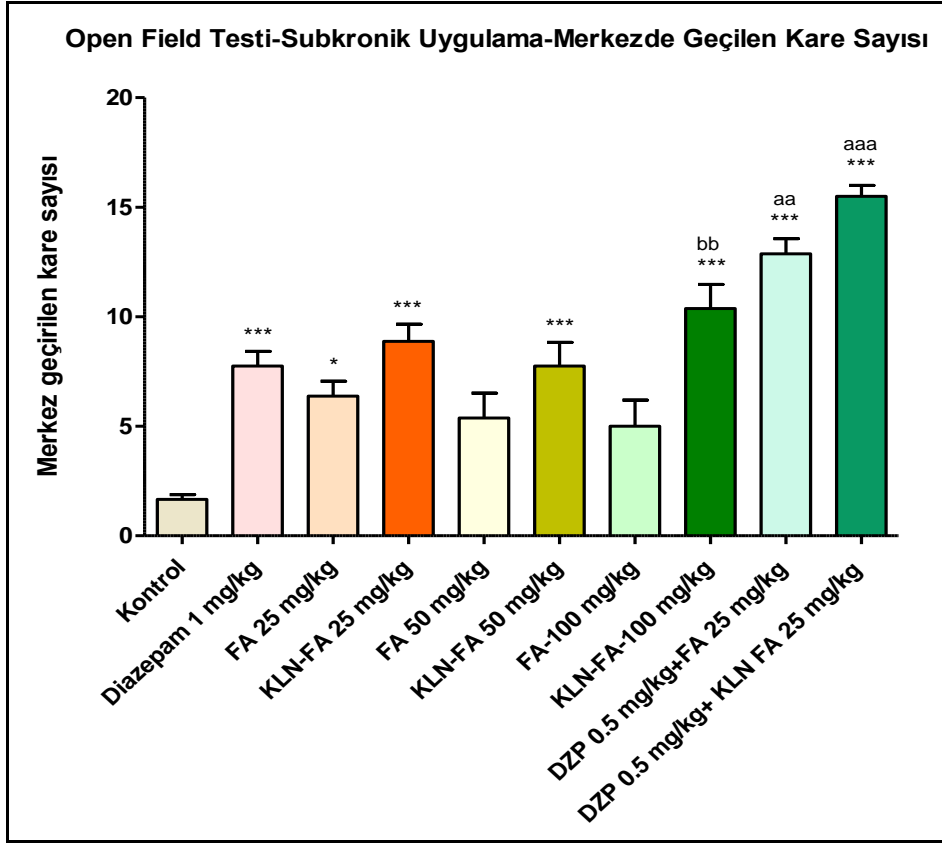


Şekil 25. Subkronik Açık Alan (Open-Field) Testinde merkezde geçirilen süre verileri.

*** $p<0.001$, ** $p<0.01$, * $p<0.05$; Kontrol grubuna göre anlamlı farklılık (n: 8); ^{bbb} $p<0.001$, ^{bb} $p<0.01$; Saf FA grubunun KLN-FA grubuna göre anlamlı farklılık (n: 8); ^{aaa} $p<0.001$; Diazepam grubuna göre anlamlı farklılık (n: 8). Tek-yönlü ANOVA ve ardından Tukey HSD çoklu karşılaştırma testi uygulanmıştır.

Şekil 26' de gösterilen merkezde geçilen süre sayısı incelendiğinde kontrole göre saf FA (50 mg/kg) ve (100 mg/kg) hariç diğer tüm dozlarda anksiyolitik benzeri etki bakımından anlamlı olarak etkili çıkmıştır (^{***} $p<0.001$, * $p<0.05$). KLN-FA ve saf FA arasında incelendiğinde KLN-FA(100 mg/kg) dozunda anlamlı düzeyde anksiyolitik benzeri etkili çıkmıştır (^{bb} $p<0.01$). Diğer dozlarda göreceli olarak anksiyolitik benzeri etkide artış vardır. Diazepam ile karşılaştırıldığında kombinasyonlu dozlarda anlamlı bir

artış vardır (^{aaa} $p < 0.001$, ^{aa} $p < 0.01$). Diğer dozlarda anksiyolitik benzeri etki de KLN-FA(25 mg/kg), (50 mg/kg) ve (100 mg/kg) dozlarında göreceli bir artış bulunmaktadır.

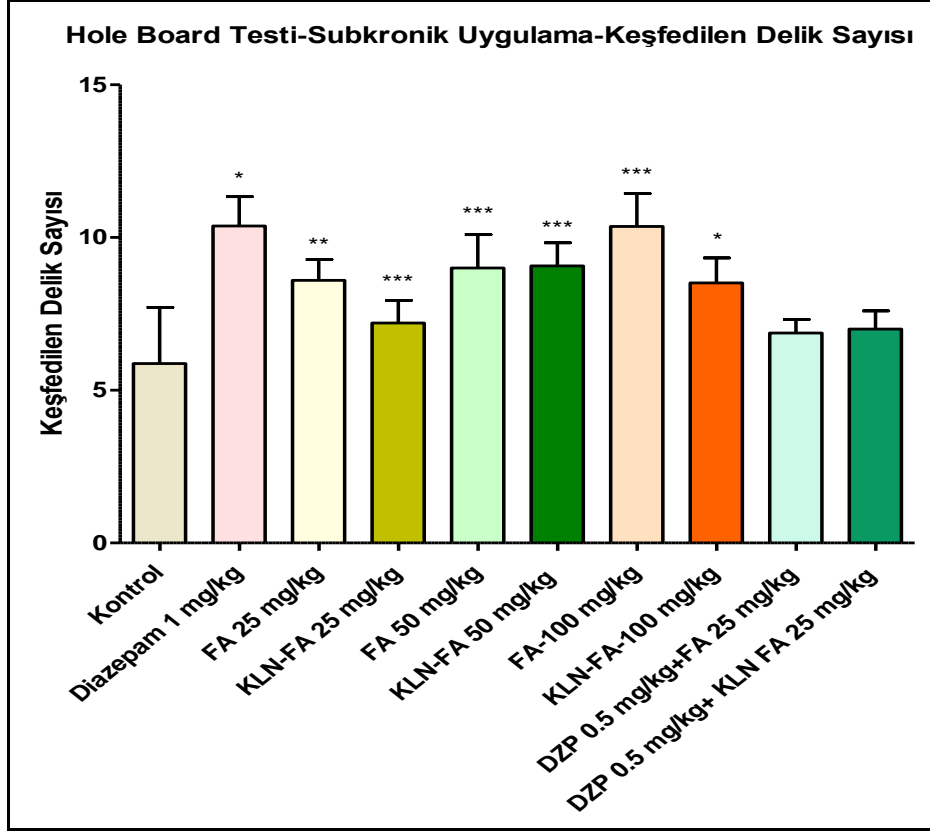


Şekil 26. Subkronik Açık Alan (Open-Field) Testinde merkezde geçirilen kare sayısı verileri.

*** $p < 0.001$, * $p < 0.05$; Kontrol grubuna göre anlamlı farklılık (n: 8); ^{bb} $p < 0.01$; Saf FA grubunun KLN-FA grubuna göre anlamlı farklılık (n: 8); ^{aaa} $p < 0.001$, ^{aa} $p < 0.01$; Diazepam grubuna göre anlamlı farklılık (n: 8). Tek-yönlü ANOVA ve ardından Tukey HSD çoklu karşılaştırma testi uygulanmıştır.

4.2.3. Delikli tahta (Hole-Board) testi sonuçları

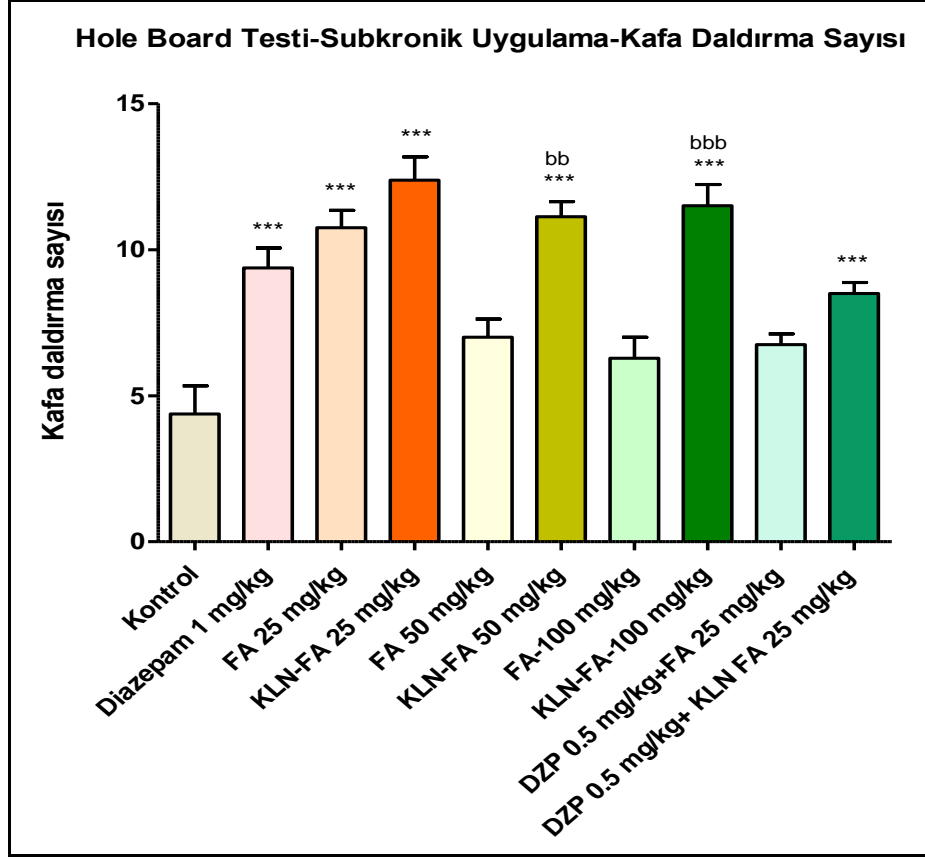
Delikli tahta testinde şekil 27' de gösterilen keşfedilen delik sayısı incelenmiştir. Kontrole göre incelendiğinde kombinasyonlu dozlar hariç diğer tüm dozlarda anksiyolitik benzeri etki de anlamlı artış vardır (^{***} $p < 0.001$, ^{**} $p < 0.01$, ^{*} $p < 0.05$). Kombinasyonlu dozlarda kontrole göre anksiyolitik benzeri etki de göreceli bir artış vardır. Diazepama göre kıyaslandığında KLN-FA(50 mg/kg)-(100 mg/kg), saf FA(25 mg/kg),(50 mg/kg),(100 mg/kg) dozunda anksiyolitik benzeri etki de göreceli bir artış olup hiçbir dozda anlamlı bir artış yoktur. Saf ferulik asit ve KLN-Ferulik asit karşılaştırıldığında (50 mg/kg) ve (100 mg/kg) dozu ile kombinasyon dozunda [DZP(0,5 mg/kg) +KLN-FA(25 mg/kg)] anksiyolitik benzeri etki de göreceli artış vardır. Anlamlı bir artış görülememiştir.



Şekil 27. Subkronik Delikli Tahta (Hole-Board) Testinde keşfedilen delik sayısı verileri.

*** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$; Kontrol grubuna göre anlamlı farklılık (n: 8). Tek-yönlü ANOVA ve ardından Tukey HSD çoklu karşılaştırma testi uygulanmıştır.

Delikli tahta testinde Şekil 28’de gösterilen kafa daldırma sayısı kontrole göre incelendiğinde Diazepam(1 mg/kg), KLN-FA(25 mg/kg), FA(25 mg/kg),(50 mg/kg),(100 mg/kg) ve [DZP(0,5 mg/kg)+KLN-FA(25 mg/kg)] dozlarında anksiyolitik benzeri etki de anlamlı bir artış söz konusudur (** $p < 0.001$). Diğer dozlarda göreceli bir artış söz konusudur. Saf ferulik asit KLN-Ferulik asit ile anksiyolitik benzeri etki bakımından karşılaştırıldığında (50 mg/kg) ve (100 mg/kg) dozunda anlamlı anksiyolitik benzeri etkili bulunmuştur (^{bbb} $p < 0.001$, ^{bb} $p < 0.01$). (25 mg/kg) ve kombinasyonlu dozda anksiyolitik benzeri etki de göreceli bir artış söz konusudur. Dizepama göre karşılaştırıldığında anksiyolitik benzeri etki bakımından anlamlı olan hiçbir doz bulunamamıştır. Ferulik asit (25 mg/kg) ve KLN-FA(25 mg/kg),(50 mg/kg),(100 mg/kg) dozunda göreceli olarak anksiyolitik benzeri etkili bulunmuştur.

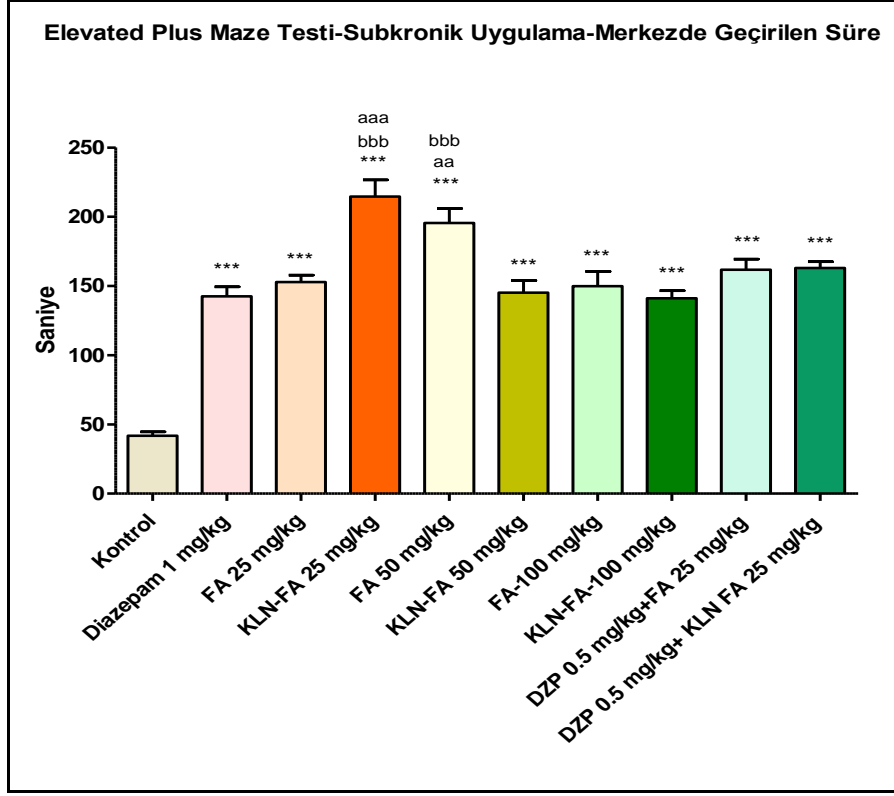


Şekil 28. Subkronik Delikli Tahta (Hole-Board) Testinde kafa daldırma sayısı verileri.

*** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$; Kontrol grubuna göre anlamlı farklılık ($n = 8$); ^{bb} $p < 0.01$, ^{bbb} $p < 0.001$; Saf FA grubunun KLN-FA grubuna göre anlamlı farklılık ($n = 8$). Tek-yönlü ANOVA ve ardından Tukey HSD çoklu karşılaştırma testi uygulanmıştır.

4.2.4. Yükseltilmiş artı labirent (Elevated plus maze) testi sonuçları

Yükseltilmiş artı labirent testinde merkez geçen süre verileri şekil 29'de gösterilmiştir. Kontrole göre incelendiğinde tüm dozlarda anksiyolitik benzeri etkide anlamlı bulunmuştur (** $p < 0.001$). Saf FA ile KLN-FA anksiyolitik benzeri etki bakımından incelendiğinde KLN-FA(25 mg/kg) ve FA(50 mg/kg) dozlarında anlamlı olarak anksiyolitik benzeri etkili bulunmuştur (^{bbb} $p < 0.001$). Diazepamı göre anksiyolitik benzeri etki bakımından incelendiğinde KLN-FA(25 mg/kg) ve FA(50 mg/kg) dozlarında anksiyolitik etki bakımından anlamlı bulunmuştur (^{aaa} $p < 0.001$, ^{aa} $p < 0.01$). Diğer tüm dozlarda göreceli bir artış söz konusudur.

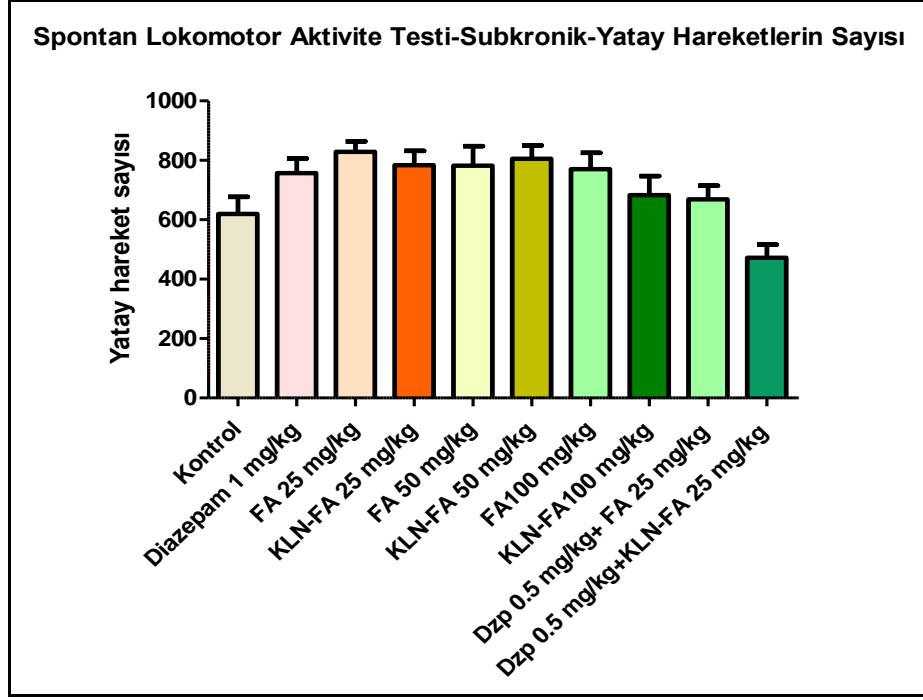


Şekil 29. Subkronik Yükseltmiş Artı Labirent (Elevated Plus Maze) Testinde merkezde geçirilen süre verileri.

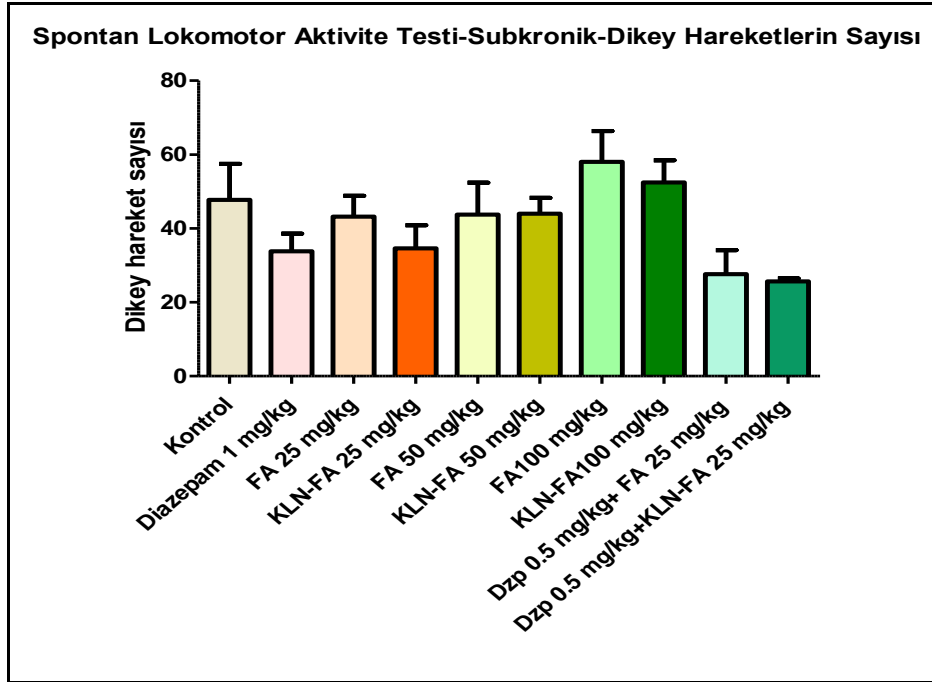
*** $p < 0.001$, Kontrol grubuna göre anlamlı farklılık (n: 8); ^{bbb} $p < 0.001$; Saf FA grubunun KLN-FA grubuna göre anlamlı farklılık (n: 8); ^{aaa} $p < 0.001$, ^{aa} $p < 0.01$; Diazepam grubuna göre anlamlı farklılık (n: 8). Tek-yönlü ANOVA ve ardından Tukey HSD çoklu karşılaştırma testi uygulanmıştır.

4.2.5. Spontan lokomotor aktivite test sonuçları

Şekil 30 ve 31’de tüm dozların subkronik uygulamalarının aktivite kafesi deneylerinde yatay ve dikey hareketlerin sayısının lokomotor aktivite üzerine etkisi görülmektedir. Spontan lokomotor aktivite testinde yatay hareketlerin sayısına bakıldığında kontrole göre hiçbir dozda anlamlı etki görülmemiştir ancak kombinasyonlu dozlar hariç tüm dozlarda göreceli artış vardır. Kontrole göre lokomotor aktivite de artışlar gözlenmiştir; sedasyon görülmemiştir. Yatay hareketlerin sayısı artmıştır. [DZP(0.5 mg/kg)+ FA(25 mg/kg)] dozunda hiçbir değişiklik olmamıştır. [DZP(0.5 mg/kg)+ KLN-FA(25 mg/kg)] dozunda azalmıştır. Dikey hareketlerin sayısı incelendiğinde kontrole ve diazepamı göre hiçbir dozda anlamlı olarak bir fark görülmemiştir. DZP(1 mg/kg), FA(50 mg/kg) ve KLN-FA(50 mg/kg) ve kombinasyonlu dozlarda göreceli bir azalma görülmüştür. Keşif davranışı azalmıştır.



Şekil 30. Subkronik Spontan Lokomotor Aktivite Testinde yatay hareketlerin sayı verileri. (n: 8) Tek-yönlü ANOVA ve ardından Tukey HSD çoklu karşılaştırma testi uygulanmıştır.



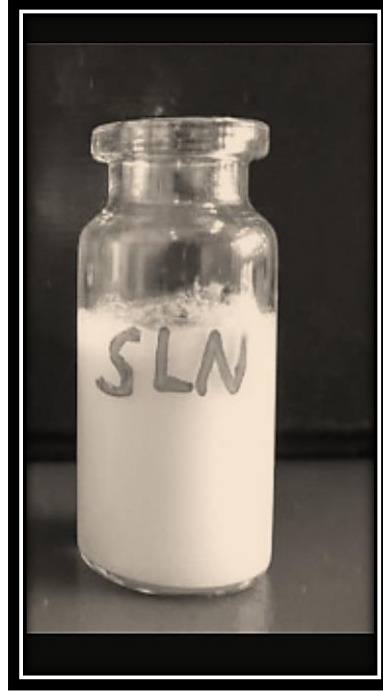
Şekil 31. Subkronik Spontan Lokomotor Aktivite Testinde dikey hareketlerin sayı verileri. (n: 8) Tek-yönlü ANOVA ve ardından Tukey HSD çoklu karşılaştırma testi uygulanmıştır.

4.3. KLN Formülasyonlarının Hazırlanması ve Karakterizasyonu

KLN taşıyıcı sistem formülasyonu bölüm 3.3 'de bahsedildiği şekilde hazırlanmıştır. Compriyol ile hazırlanan Formülasyonlarda kremalaşma tespit edildiği için optimum formülasyon katı lipidi olarak Dynasan ile çalışmalara devam edilmiştir. Optimum formülasyon içeriği Tablo 4.3 de verilmektedir.

Tablo 4.3. Optimum formülasyon içeriği (MC1: KLN-FA)

KOD	Dynasan® 114	Ferulik Asit	Tween®	Distile Su
PLASEBO	% 5	-	% 4	% 91
MC1	% 5	% 0.5	% 4	% 90.5



Şekil 32. MC-1 formülasyonu liyofilizasyon öncesi

4.3.1. Ferulik asit miktar tayini

Etkin maddenin miktar tayini bölüm 3.3.1. de anlatıldığı şekilde yapılmıştır. Analitik yöntemin güvenilirliği kısmi validasyonla gösterilmiştir. Buna göre etkin maddeye ait pik 12. Dakikada gözlenmiştir. Tüm kalibrasyon eğriler (n=6) geniş aralıkta iyi bir

doğrusal regresyon göstermiştir ($r^2 > 0,9992$). Kalibrasyon eğrisi kullanılan çözücüde doğrusal elde edilmiştir.

4.3.2. Parçacık boyutu ve dağılımı analizi

Hazırlanan KLN formülasyonlarının karakterizasyon çalışmaları bölüm 3.3.2.1’de anlatıldığı şekilde yapılmıştır. Sonuçlar Tablo 4.3.2. de verilmiştir. Karakterizasyon çalışmaları taze hazırlanmış örneklerde ve $25^0 \text{ C} \pm \%60$ rölatif nem de saklanan örneklerde 3 ay stabilite çalışması sonucunda sunulmuştur. 4^0 C ve 40^0 C de saklanan örneklerde stabilite problemi gözlenmiştir.

Tablo 4.3.2. *Optimum formülasyona ait karakterizasyon çalışmaları ve 3 aylık stabilite sonuçları*

Zaman	Formülasyon	Etkin madde	Partikül boyutu (nm)	Polidispesite indeksi (PDI)	Etkin madde Yükleme Kapasitesi
0. Zaman	MC-1	Ferulik asit	503 ± 8.1	0.121 ± 0.042	91.4 ± 0.11
1. Ay	MC-1	Ferulik asit	504 ± 1.1	0.132 ± 0.033	91.7 ± 0.13
2. Ay	MC-1	Ferulik asit	505 ± 2.3	0.129 ± 0.021	90.2 ± 0.17

5. TARTIŞMA

Anksiyete insanlar arasında yaygın görülen ve her yaştan insanı etkileyebilen psikolojik bir rahatsızlık olarak karşımıza çıkmaktadır. Anksiyete tedavisinde sentetik anksiyolitik ilaçların ve birçok bitkisel ilaçların (*Biebersteinia multifida*, *Melittis melisophyllum*, *Ferula assafoetida*, *Oryza sativa*, *Tribulus terrestris*, *Origanum majorana*, *Passiflora incarnata*, *Melissa officinalis* vb.) kullanıldığı bildirilmektedir. Ferulik asit (4-hidroksi-3-metoksisinnamik asit), buğday kepeğinde 5 g/kg, şeker pancarı küspesinde 9 g/kg ve mısır çekirdeğinde 50 g/kg arasında değişen, bitkilerde en bol bulunan fenolik asitlerden biri olarak belirtilmektedir (Ou ve Kwok, 2004). *Melittis melisophyllum*'un ferulik asit içerdiği ve bu bitkiden hazırlanan çayın anksiyete ve huzursuzluk tedavisinde kullanılmakta olduğu bilinmektedir. Ferulik asit içerdiği bilinen Geraniaceae familyasından *Biebersteinia multifida*'nın kök ekstratının diazepam ile karşılaştırılabilir düzeyde anksiyolitik benzeri etki gösterdiği belirtilmektedir. *Ferula assafoetida*, *Oryza sativa* ve *Tribulus terrestris* bitkilerinin anksiyolitik benzeri etki gösterdiği ve bu etkinin ferulik asit içeriklerinden kaynaklandığı bulunmuştur. *Origanum majorana* bitkisinin ferulik asit içerdiği bilinmektedir, halk arasında kullanıldığı bildirilmiştir ve buna bağlı olarak yapılan çalışmalarla anksiyolitik olarak kullanılabilceği kanıtlanmıştır. Daha önce ferulik asit ile yapılmış çalışmalarda da ferulik asitin anksiyolitik benzeri etkili olduğu bulunmuştur. Ancak ferulik asitin biyoyararlanımının ratlarda ve insanlarda düşük olduğu vurgulanmaktadır. Bu durum ferulik asitin kullanımını ve yeni bir ilaç olarak geliştirilmesini kısıtlamaktadır (Monsef-Esfahani vd., 2013; Jarić vd., 2007; Szyborska-Sandhu vd., 2020; Alqasoumi, 2012; Sultana vd., 2015; Kaur vd., 2016; Ahmed vd., 2020; Amaghnoje vd., 2020; Mancuso ve Santangelo, 2014; Grundmann vd., 2008; Awad vd., 2007).

Günümüzde ilaçların biyoyararlanımını ve etkisini artırmak; hedef dokulara daha kolay ulaşmasını sağlamak amacıyla katı lipit nanopartikül sistemler araştırmalarda sıklıkla kullanılmaktadır. Suda yetersiz çözünen etkin maddeler parenteral yol ile verilebilmek için mikron boyutun altındaki büyüklükte taşıyıcı sistemler kullanılarak çalışmalar yapılmaktadır (Demirel ve Yazan, 2000; Patra vd., 2018). Katı lipit nanopartiküllerin kimyasal bozunmaya karşı içerdikleri bileşikler koruduğu ve kan düzeylerinde ani yükselmeleri önleyerek, ilaç uygulamasından sonra etkin maddenin yan etkilerinde azalmaya yardımcı olduğu görülmüştür (Runge ve Müller, 1998). Ayrıca

uzatılmış salınımlı sistemlere yüklenmeleri halinde etkin maddenin etkisinin uzun sürelerle devam etmesi de sağlanmaktadır.

Suda çözünmesi zor olan etkin madde ile yüklenmiş katı lipit nanopartiküllerin iv/im yolla verilmesinin biyoyaralanımlarını arttırabileceği düşünülmektedir (Demirel ve Yazan, 2000). Bu çalışmada; saf ferulik asit ve ferulik asit içeren katı lipit formülasyonların anksiyolitik etkisi akut ve subkronik olarak uygulandıktan sonra farklı deneysel anksiyete modelleri kullanılarak incelenmiştir. Anksiyete testlerinde lokomotor aktivitede herhangi bir değişikliği olmaksızın, test edilen tüm dozlarda saf FA anksiyolitik benzeri etki gösterirken KLN-FA'in bu etkiyi artırdığı belirlenmiştir. Akut ve subkronik uygulamada saf FA verileri ile KLN- FA verileri karşılaştırıldığında tolerans gelişmediği gözlenmiştir.

KLN-FA formülasyonu sıcakta hazırlama ve ultrasonikasyon ile homojenizasyon yöntemi ile başarılı bir şekilde gerçekleştirildiği gözlenmiştir (Tablo 4.3). Formülasyonun ortalama parçacık boyutu 503 ± 8.1 ile 505 ± 2.3 nm arasında değişmektedir. Düşük polidispersite indeksleri (0.121 ± 0.042 ile 0.132 ± 0.033 arasındaki) dar parçacık boyutu dağılımını göstermektedir (Tablo 4.3.2). Polidispersite indekslerinin (PDI) 0,2 'den küçük olması homojen bir partikül boyutu sunduğunu; PDI değerinin 0,3'den büyük olmasının heterojen bir partikül boyutu sunduğunu belirtilmiştir (Alberto vd., 2022; Zhang vd., 2012). Etkin madde yükleme kapasitesinin matris materyalindeki ilaç çözünürlüğüne bağlı olduğu belirtilmektedir (Sayiner ve Çomoğlu, 2016). Nanotaşıyıcıların etkin madde bağlama kapasiteleri yüksek ilaç taşıyıcı sistemler olarak bildirilmektedir ve bu sayede etkin maddenin hücre içi dağılımının arttığı belirtilmektedir (Tüylek, 2019; Marangoz, 2022). Bu sonuçlar bize etkin maddenin başarılı bir şekilde yüklendiğini ve stabilize çalışmaları sonucunda kararlı ve homojen bir formülasyon olarak kullanılabileceğini göstermiştir.

Aydınlık-karanlık kutu testi kemirgenlerin aydınlatılmış alanlardan kaçınmalarına, karanlık alanları tercih etmelerine ve yeni ortam, ışık gibi stres kaynağı uygulanması sonucu oluşan keşif davranışlarına dayandığı belirtilmektedir (Hascoet ve Bourin, 2009). Anksiyetenin artması ile kemirgenler aydınlık bölgeden karanlık bölgeye kaçarlar. Anksiyolitik ajanların kemirgenlerin aydınlık bölgede geçirdikleri ve keşif yaptıkları süreyi arttırması beklenmektedir (Prut ve Belzung, 2003; Çalışkan vd., 2017). Akut ve subkronik uygulama da aydınlık-karanlık kutu testinde aydınlık alanda geçirilen

süre ve karanlık alanda geçirilen süre değerlendirilmiştir. Buna göre akut uygulamada saf FA ve KLN-FA formülasyonu tüm dozlarda kontrole göre anksiyolitik benzeri etkili bulunmuştur. Birbirleriyle karşılaştırıldıklarında KLN taşıyıcı sisteminin FA asitin anksiyolitik benzeri etkisini anlamlı olarak tüm dozlarda artırdığı belirlenmiştir. Diazepam(1 mg/kg) ile karşılaştırıldığında da KLN-FA tüm dozlarda anlamlı düzeyde anksiyolitik benzeri etkili bulunmuştur (Şekil 14,15). Subkronik uygulama yapılan deney sonuçlarında anksiyolitik benzeri etkinin akut uygulamaya göre göreceli olarak arttığı ve kontrole göre anlamlı olduğu görülmektedir. KLN-FA dozları diazepam ile karşılaştırıldığında tüm dozlarında anlamlı olarak anksiyolitik benzeri etkiyi artırdığı belirlenmiştir. Saf FA ile karşılaştırıldığında ise sadece (25 mg/kg) ve (50 mg/kg) dozlarda anlamlı anksiyolitik benzeri etki görülmektedir (Şekil 23,24). Bu test sonuçları bize ferulik asitin kontrole göre anlamlı anksiyolitik benzeri etkisi olduğunu ve KLN-formülasyonunun anksiyolitik benzeri etki artışına katkı sağladığını göstermektedir.

Deneysel anksiyete çalışmalarında en çok kullanılan açık alan testinde merkezde geçirilen süre ve merkezde geçilen kare sayısı değerlendirilmiştir. KLN-FA dozları akut uygulamada-merkezde geçilen süre için karşılaştırıldığında; tüm uygulanan KLN-FA dozları ve kombinasyonlu dozlarda kontrole göre anlamlı bir anksiyolitik benzeri etki vardır. Sadece KLN-FA(50 mg/kg) saf FA dozuna göre anlamlı anksiyolitik benzeri etki göstermiştir. Diazepam ile karşılaştırıldığında KLN-FA (50 mg/kg) dozunda ve kombinasyonlu dozlarda anksiyolitik benzeri etkide anlamlı bir artış varken, KLN-FA(25 mg/kg) ve (100 mg/kg) dozlarında göreceli bir artış görülmektedir(Şekil 16). Subkronik uygulamada da tüm KLN-FA dozları kontrole göre anlamlıdır ve saf FA göre etkide anlamlı bir artış vardır ((25 mg/kg) ve (100 mg/kg) KLN-FA) (Şekil 25).

Açık alan testinde merkezde geçilen kare sayısına bakıldığında ise akut olarak verildiğinde saf FA dozlarında anksiyolitik benzeri etkide anlamlı etki görülmezken KLN-FA (50 mg/kg) ve FA(100 mg/kg) dozlarında anksiyolitik benzeri etki de kontrole göre anlamlı bir artış vardır. Saf FA dozları anksiyolitik benzeri etkide anlamlı bir artış sağlamamıştır. Saf FA ve KLN-FA karşılaştırıldığında ise KLN-FA(100 mg/kg) dozunda anlamlı bir artış vardır. Subkronik uygulamada ise tüm KLN dozları anlamlı anksiyolitik benzeri etki göstermiştir (Şekil 17). Saf FA ve KLN-FA arasındaki değerlendirmede sadece (100 mg/kg) dozda anksiyolitik benzeri etki vardır (Şekil 26). Bu testle lokomotor aktivite, anksiyete ve keşif davranışı değerlendirilebilmektedir. Açık alan testinde

kemirgenlerin ait oldukları gruplarından ve alışık oldukları ortamdaki alınıp yeni bir alana bırakılmaları anksiyeteye ve korkuya yol açtığı bildirilmektedir. Deneye kemirgenlerin merkeze bırakılması ile anksiyetesi olan hayvanların merkez bölgede geçirdikleri sürede ve merkezde geçilen kare sayısında azalma olacağı bildirilmiştir. Bu nedenle bu test çoklu anksiyete mekanizmasını içermektedir ve bu da bu testin değerlendirilmesinde diğer testlere göre farklılıklar olmasına ve zorlaşmasına neden olmaktadır (Carter ve Shieh,2015; Çalışkan vd., 2017).

Hayvanlarda duygusallık, kaygı ve/veya strese verilen tepkileri değerlendirmek için kullanılan delikli tahta testi, farelerin duygusal durumundaki değişiklikler, keşif etkinliğindeki değişiklikler, toplam lokomotor etkinlik, kafa daldırma sayıları-süreleri ve ilk kafa daldırma süresi vb. parametreler açısından değerlendirilir (Takeda vd., 1998). Akut ve subkronik olarak delikli tahta testinde kafa daldırma sayısına bakıldığında tüm dozlarda hem saf FA hem KLN-FA'de kontrole göre anksiyolitik benzeri etki anlamlı olarak artırmıştır. KLN-FA(25 mg/kg) ve (100 mg/kg) dozlarında FA'in anksiyolitik benzeri etkisinde anlamlı bir artışa neden olmuştur. Subkronik uygulamada ise tüm KLN formülasyonu tüm dozlarda anksiyolitik benzeri etki artışını sağlamıştır (Şekil 18,28). Keşfedilen delik sayısı değerlendirildiğinde yine tüm dozlar kontrole göre anksiyolitik benzeri etkili bulunmuştur. Saf FA ve KLN-FA arasında anksiyolitik etkiye bakıldığında anlamlı bir fark görülmemekle birlikte KLN formülasyonunun anksiyoliti benzeri etkiyi kısmen artırdığı belirlenmiştir (Şekil 19,27). Anksiyete deneylerinde kafa daldırma sayısının ve süresinin artması anksiyolitik benzeri etkiyi, tersine azaltması ise anksiyojenik benzeri etkiyi ortaya çıkarır (Takeda vd.,1998).

Akut olarak yükseltilmiş artı labirent testinde merkezde geçirilen süre değerlendirilmiştir. Tüm dozlar kontrole göre anksiyolitik benzeri anlamlı bulunmuştur. Saf FA ve KLN-FA arasında anksiyolitik benzeri etkiye bakıldığında KLN-FA (25 mg/kg) dozunda anlamlı olduğu görülmüştür. Ancak (50 mg/kg) ve kombinasyonlu dozlarda göreceli olarak anksiyolitik benzeri etkide artış vardır. Diazepamı göre anksiyolitik olarak incelendiğinde ise KLN-FA (100 mg/kg) hariç diğer KLN-FA dozlarında ve diazepam(0.5 mg/kg)+KLN-FA(25 mg/kg) kombinasyon dozunda anlamlı olarak bir artış söz konusudur (Şekil 20). Subkronik olarak incelendiğinde kontrole göre tüm dozlarda anlamlı anksiyolitik benzeri etkili bulunmuştur. Saf FA ile KLN-FA anksiyolitik benzeri etki bakımından karşılaştırıldığında KLN-FA(25 mg/kg) ve FA(50

mg/kg) dozlarında anlamlı olarak anksiyolitik benzeri etkili bulunmuştur. Diazepam göre anksiyolitik benzeri etki karşılaştırıldığında KLN-FA(25 mg/kg) ve FA(50 mg/kg) dozlarında anlamlı bulunmuştur. Diğer tüm dozlarda anksiyolitik benzeri etkide göreceli bir artış söz konusudur (Şekil 29). Anksiyolitik benzeri etki gösteren ilaçlar merkezde geçen süreyi ve merkez girme sayısını arttırırken, anksiyojenik benzeri etki gösteren ilaçlar tam tersi etki yapacağı düşünülmüştür (Aykaç vd., 2015). EPM testinde başka parametrelere bakılmıştır ancak tutarlı sonuçlar elde edilememiştir. Özellikle serotonin modüle edici bileşiklerin yükseltilmiş artı labirent testinde tutarsız sonuçlara neden olduğu bildirilmiştir (Belzung ve Griebel, 2001; Pınar Çetiner, 2017).

Sıçanların yeni bir ortama bırakılınca ortamı koklaması, yatay ve dikey hareketliliği hayvanın keşif isteğinden kaynaklanan spontan lokomotor davranışları olarak bildirilmektedir (Çalışır, 2019). Locomotor aktivite testi ölçümlerinde kullanılan aktivite kafesi testi farelerin yatay ve dikey hareketlerinin ölçüldüğü ve farelerin sedasyon ve psikostimülan aktivitelerinin değerlendirildiği bir test olarak belirtilmiştir. Locomotor aktivitedeki azalmanın sedasyona veya ilaca bağlı motor koordinasyonun bozulmasına neden olduğu bildirilmektedir (Williams ve Porsolt, 2007). Yatay hareketler lokomotor aktivitenin, dikey hareketler keşif davranışının bir ölçüsü olarak kullanılmaktadır (Palenicek vd., 2005; Uvnäs-Moberg vd., 1996). Akut uygulamada yatay hareketlerin sayısına incelendiğinde diazepam(1 mg/kg), FA(50 mg/kg), KLN-FA(50 mg/kg) ve FA(100 mg/kg) dozlarında kontrole göre anlamlı bir artış gözlenmiştir (Şekil 21). Yatay hareketlerin sayısının artmış olması bize lokomotor aktivitenin arttığını ve ferulik asitin sedatif etkisinin olmadığını göstermektedir. Kombinasyonlu dozlar hariç diğer dozlarda kontrole göre ve diazepam göre göreceli bir artış vardır. Kombinasyonlu dozlarda azalma görülmektedir. Akut uygulamada dikey hareketlerin sayısı incelendiğinde kombinasyonlu dozlarda anlamlı derecede azalma gözlenmiştir (Şekil 22). Subkronik uygulamada yatay hareketlerin sayısı incelendiğinde lokomotor aktivitede hiçbir dozda anlamlı hiçbir fark gözlenmemiştir (Şekil 30). Dikey hareketlerin sayısı incelendiğinde keşif davranışında yine hiçbir dozda anlamlı bir fark gözlenmemiştir (Şekil 31).

Uygulandığında benzer etkiler oluşturan ilaçların kombinasyon halinde uygulandığında sinerjistik etki ile tedavi de artış gözlenebileceği düşünülmektedir. Sinerjistik etkileşimde dozların daha düşük kullanılabilmesi ve bu durumda yan etkilerinin önemli ölçüde azaltılabileceği belirtilmektedir (Tallarida, 2011). Yapılan

çalışma sonucunda delikli tahta testi haricinde uygulanan tüm anksiyete deney modellerinde [Diazepam(0.5 mg/kg)+FA(25 mg/kg)] ve [Diazepam(0.5 mg/kg)+KLN-FA(25 mg/kg)] kombinasyonlu dozlar kontrole ve diazepamına göre anlamlı anksiyolitik benzeri etki göstermiştir. Spontan lokomotor aktivite testinde ise akut dikey hareket sayısı anlamlı olarak azaltmıştır ve keşif davranışında azalma gözlenmiştir. Son yapılan çalışmada DZP ve FA'in GABA_A reseptörü α_2 ve α_3 alt birimlerine bağlanarak aynı yolak üzerinden etkisinin olduğu gösterilmiştir(Bhuia vd., 2023). Spontan lokomotor aktivite testinde akut uygulama sonucunda maddelerin kombinasyon şeklinde uygulanan dozlarında dikey ve yatay hareketlerin sayısında azalma gözlenmesi, etkisinin aynı yolak üzerinden olabileceğini düşündürmüştür.

6. ÖNERİLER

Anksiyete tedavisinde şu an da kullanılan ilaçların çoğu ciddi birçok yan etkiye sahip olduğu bildirilmektedir. Bu yüzden araştırmacıların; daha az toksik ve anksiyolitik etkisi daha yüksek ekonomik olan yeni bileşikler bulmaya yöneldiği belirtilmektedir. Bitkisel ilaçların sentetik ilaçlara göre yan etkilerinin daha düşük olması ve biyoyararlanımının daha iyi olması sebebiyle hastalar ve hekimler arasında da kullanımı yaygınlaştığı gözlenmektedir. Ancak bitkisel ilaçların, klinik uygulamasının ve çözünürlüğünün yetersiz olması dolayısıyla kullanımının sınırlı olduğu yönünde görüşler mevcuttur. Suda çözünürlüğü zayıf olan ilaçların gastrointestinal sistemde çözünürlüğünün zayıf olacağı ve bu nedenle biyoyararlanımlarının düşük olacağı düşünülmektedir.

Bitkisel ilaçların katı lipit nanopartikül taşıyıcı sistem formunda kullanılması ile çözünürlüğünü arttırdığı ve parçacık boyutunu azaltıp spesifik yüzey alanını artırarak biyoyararlanımı arttırdığı görülmektedir. Ayrıca gastrointestinal sistemde bulunan enzimatik olaylar ve gastrointestinal epitel yapısı birçok ilacın oral yolla verilmesini engellediğini yönünde görüşler mevcuttur. Yapılan birçok deneysel çalışmada katı lipit nanopartiküllerin toksisiteyi azalttığı da görülmüştür. Suda yetersiz çözünen etkin maddelerin parenteral uygulanabilmesi için mikron boyutun altındaki taşıyıcı sistemler üzerine yoğunlaşmıştır.

Bu çalışma da suda çözünürlüğü ve biyoyararlanımı düşük olan ferulik asit katı lipit nanopartikül haline getirilmiştir. Bulgular FA ve KLN-FA akut ve subkronik uygulaması anksiyolitik benzeri etki göstermiştir. Ayrıca KLN-FA diazepam(1 mg/kg)'a göre akut ve subkronik uygulama da daha fazla anksiyolitik benzeri etki göstermiştir. Ayrıca KLN-FA'in FA'e göre kıyasla anksiyete tedavisinde subkronik uygulanmasının daha yüksek anksiyolitik benzeri etki gösterdiği ve subkronik uygulama sonucunda tolerans gelişmediği gözlenmiştir. Bu bulgular incelendiğinde, KLN-FA formülasyonunun saf FA ve diazepam(1 mg/kg) ile karşılaştırıldığında anksiyolitik benzeri etki yönünden daha etkili olduğunu ve akut ve subkronik olarak i.p. yoldan uygulanabileceği yönünde sonuçlar sunmuştur.

KLN-FA formunun; ekonomik olması, mikron boyutuna indirgenerek i.p. yoldan verilerek suda çözünürlüğünün artırılması, belirli dokulara hedefleme yapılması ve etkin maddenin salınımının kontrollü olması hem ülke ekonomisinde hem de klinik kullanımda

sağlayabileceği faydalar düşünüldüğünde, ferulik asitin güvenilir bir anksiyolitik benzeri etkili bir ajan olarak güvenliğinin ve etkinliğinin belirlenebilmesi için insan deneklerin kullanıldığı daha fazla araştırma ve klinik çalışmaya ihtiyaç olduğu kanısındayız.

Bu tez çalışması anksiyete benzeri davranışların tedavisinde saf FA ve KLN-FA'in akut ve subkronik uygulanmasında anksiyolitik benzeri etki göstererek yeni tedavi yaklaşımlarına katkı sağlayacak klinik çalışma öncesi güvenli ve etkili sonuçlar sunduğunu düşünmekteyiz.

KAYNAKÇA

- Abela, AR., Browne, CJ., Sargin, D., Prevot, TD., Ji, X. D., Li, Z., & Fletcher, P. J. (2020). Median raphe serotonin neurons promote anxiety-like behavior via inputs to the dorsal hippocampus. *Neuropharmacology*, 168, 107985.
- Agatonovic-Kustrin, S., Kustrin, E., Gegechkori, V., & Morton, D. W. (2020). Anxiolytic Terpenoids and Aromatherapy for Anxiety and Depression. *In Reviews on New Drug Targets in Age-Related Disorders* (pp. 283-296). Springer, Cham.
- Ahmed, S., Anuntiyo, J., Malemud, C. J., & Haqqi, T. M. (2005). Biological basis for the use of botanicals in osteoarthritis and rheumatoid arthritis: a review. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2(3), 301-308.
- Ahmed, S., Asadullah, M., Wahid, S., Sarfaraz, S., & Hassan, F. (2020). Anxiolytic Effect of Tribulus Terrestris in an Open Field Test at Different Doses.
- Ak, G., Ünal, A., Karakayalı, T., Özel, B., Günel, N. S., & Şanlıer, Ş. H. (2021). Brain-targeted, drug-loaded solid lipid nanoparticles against glioblastoma cells in culture. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 206, 111946.
- Akanda, M., Mithu, M. S. H., & Douroumis, D. (2023). Solid lipid nanoparticles: an effective lipid-based technology for cancer treatment. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 104709.
- Akbari, J., Saeedi, M., Ahmadi, F., Hashemi, S. M. H., Babaei, A., Yaddollahi, S., ... & Nokhodchi, A. (2022). Solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers: A review of the methods of manufacture and routes of administration. *Pharmaceutical Development and Technology*, 27(5), 525-544.
- Al Shoyaib, A., Archie, S. R., & Karamyan, V. T. (2020). Intraperitoneal route of drug administration: should it be used in experimental animal studies?. *Pharmaceutical Research*, 37, 1-17.
- Alqasoumi, S. (2012). Anxiolytic effect of Ferula assafoetida L. in rodents. *Journal of Pharmacognosy and Phytotherapy*, 4(6), 86-90.

- Amaghnouje, A., Mechchate, H., Es-safi, I., Alotaibi, A. A., Noman, O. M., Nasr, F. A., & Bousta, D. (2020). Anxiolytic, antidepressant-like properties and impact on the memory of the hydro-ethanolic extract of *Origanum majorana* L. on mice. *Applied sciences*, 10(23), 8420.
- Amsterdam, J. D., Li, Q. S., Xie, S. X., & Mao, J. J. (2020). Putative antidepressant effect of chamomile (*Matricaria chamomilla* L.) oral extract in subjects with comorbid generalized anxiety disorder and depression. *The Journal of Alternative and Complementary Medicine*, 26(9), 815-821.
- Andreatini R, Bacellar LFS. 1999. The relationship between anxiety and depression in animal models: a study using the forced swimming test and elevated plus-maze. *Braz J Med Biol Res*. 32(9):1121-1126.
- Archer, J. (1973). Tests for emotionality in rats and mice: a review. *Animal behaviour*, 21(2), 205-235.
- Arcos-Martínez, A. I., Muñoz-Muñiz, O. D., Domínguez-Ortiz, M. Á., Saavedra-Vélez, M. V., Vázquez-Hernández, M., & Alcantara-Lopez, M. G. (2016). Anxiolytic-like effect of ethanolic extract of *Argemone mexicana* and its alkaloids in Wistar rats. *Avicenna journal of phytomedicine*, 6(4), 476.
- Aykaç, A., Süer, K., & Taşkiran, C. (2015). Anksiyete araştırmalarında kullanılan sıçan davranış modelleri. *Marmara Medical Journal*, 28(1), 1-7.
- Awad, R., Arnason, J. T., Trudeau, V., Bergeron, C., Budzinski, J. W., Foster, B. C., & Merali, Z. (2003). Phytochemical and biological analysis of skullcap (*Scutellaria lateriflora* L.): a medicinal plant with anxiolytic properties. *Phytomedicine*, 10(8), 640-649.
- Awad, R., Levac, D., Cybulska, P., Merali, Z., Trudeau, V. L., & Arnason, J. T. (2007). Effects of traditionally used anxiolytic botanicals on enzymes of the γ -aminobutyric acid (GABA) system. *Canadian journal of physiology and pharmacology*, 85(9), 933-942.
- Aynur, K. O. Ç., & Görmüş, Z. I. S. (2018). Deney hayvanlarında anksiyete çalışmaları. *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi*, 11(2), 51-57.1.

- Ayyanar, M., Sankarasivaraman, K., & Ignacimuthu, S. (2008). Traditional herbal medicines used for the treatment of diabetes among two major tribal groups in South Tamil Nadu, India. *Ethnobotanical leaflets*, 2008(1), 32.
- Baldwin D, Rudge S (1995) The role of serotonin in depression and anxiety. *Int Clin Psychopharmacol*, 9(Suppl 4):41-45.
- Baldwin, D. S., Ajel, K., Masdrakis, V. G., Nowak, M., & Rafiq, R. (2013). Pregabalin for the treatment of generalized anxiety disorder: an update. *Neuropsychiatric disease and treatment*.
- Baldwin, D. S., Ajel, K., Masdrakis, V. G., Nowak, M., & Rafiq, R. (2013). Pregabalin for the treatment of generalized anxiety disorder: an update. *Neuropsychiatric disease and treatment*, 883-892.
- Balthazar, L., Lages, Y. V. M., Romano, V. C., Landeira-Fernandez, J., & Krahe, T. E. (2021). The Association Between The Renin-Angiotensin System And The Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis In Anxiety Disorders: *A Systematic Review Of Animal Studies*. *Psychoneuroendocrinology*, 105354.
- Bandelow, B. (2020). Current and Novel Psychopharmacological Drugs for Anxiety Disorders. *In Anxiety Disorders* (pp. 347-365). Springer, Singapore.
- Bandelow, B., Michaelis, S., & Wedekind, D. (2017). Treatment of anxiety disorders. *Dialogues in clinical neuroscience*, 19(2), 93.
- Bandelow, B., Michaelis, S., & Wedekind, D. (2022). Treatment of anxiety disorders. *Dialogues in clinical neuroscience*.
- Bannerman, D. M., Deacon, R. M. J., Offen, S., Friswell, J., Grubb, M., & Rawlins, J. N. P. (2002). Double dissociation of function within the hippocampus: spatial memory and hyponeophagia. *Behavioral neuroscience*, 116(5), 884.
- Barone, E., Calabrese, V., & Mancuso, C. (2009). Ferulic acid and its therapeutic potential as a hormetin for age-related diseases. *Biogerontology*, 10, 97-108.
- Belzung, C., & Griebel, G. (2001). Measuring normal and pathological anxiety-like behaviour in mice: a review. *Behavioural brain research*, 125(1-2), 141-149.

- Bergink, V., Van Megen, H. J., & Westenberg, H. G. (2004). Glutamate and anxiety. *European Neuropsychopharmacology*, 14(3), 175-183.
- Bernal-Morales, B., & Romero-Avenidaño, E. (2019). Chrysin (5, 7-dihydroxyflavone) exerts anxiolytic-like effects through
- Berridge, C. W., & Waterhouse, B. D. (2003). The locus coeruleus–noradrenergic system: modulation of behavioral state and state-dependent cognitive processes. *Brain Research Reviews*, 42(1), 33-84.
- Bhuia, M. S., Rokonzman, M., Hossain, M. I., Ansari, S. A., Ansari, I. A., Islam, T., ... & Islam, M. T. (2023). Anxiolytic-like effects by trans-Ferulic acid possibly occur through GABAergic Interaction Pathways. *Pharmaceuticals*, 16(9), 1271.
- Bibi, T., Bano, S., ud Din, F., Ali, H., & Khan, S. (2023). Preparation, characterization, and pharmacological application of oral Honokiol-loaded solid lipid nanoparticles for diabetic neuropathy. *International Journal of Pharmaceutics*, 645, 123399.
- Borgonetti, V., Governa, P., Manetti, F., Miraldi, E., Biagi, M., & Galeotti, N. (2021). A honokiol-enriched *Magnolia officinalis* Rehder & EH Wilson. bark extract possesses anxiolytic-like activity with neuroprotective effect through the modulation of CB1 receptor. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*.
- Brahmbhatt, A., Richardson, L., & Prajapati, S. (2021). Identifying and managing anxiety disorders in primary care. *The Journal for Nurse Practitioners*, 17(1), 18-25.
- Brown, E., Hurd, N. S., McCall, S., & Ceremuga, T. E. (2007). Evaluation of the anxiolytic effects of chrysin, a *Passiflora incarnata* extract, in the laboratory rat. *AANA Journal*, 75(5).
- Brüggemann, P., Sória, M. G., Brandes-Schramm, J., & Mazurek, B. (2021). The influence of depression, anxiety and cognition on the treatment effects of ginkgo biloba extract egb 761® in patients with tinnitus and dementia: a mediation analysis. *Journal of Clinical Medicine*, 10(14), 3151.
- Bummer, P. M. (2004). Physical chemical considerations of lipid-based oral drug delivery—solid lipid nanoparticles. *Critical Reviews™ in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 21(1).

- Büyükköroğlu, G. (2016). Development of solid lipid nanoparticles as gene delivery system. *Turk J Pharm Sci*, 13(2), 169-181.
- Campos, A. C., Fogaça, M. V., Aguiar, D. C., & Guimaraes, F. S. (2013). Animal models of anxiety disorders and stress. *Brazilian Journal of Psychiatry*, 35, S101-S111.
- Carobrez, A. P., & Bertoglio, L. J. (2005). Ethological and temporal analyses of anxiety-like behavior: the elevated plus-maze model 20 years on. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 29(8), 1193-1205.
- Carter, M., & Shieh, J. C. (2015). *Guide to research techniques in neuroscience*. Academic Press.
- Cavalli, R., Caputo, O., Marengo, E., Pattarino, F., & Gasco, M. R. (1998). The effect of the components of microemulsions on both size and crystalline structure of solid lipid nanoparticles (SLN) containing a series of model molecules. *Die Pharmazie*, 53(6), 392-396.
- Cayer, C., Ahmed, F., Filion, V., Saleem, A., Cuerrier, A., Allard, M., & Arnason, J. T. (2013). Characterization of anxiolytic activity of Nunavik *Rhodiola rosea*. *Planta medica*, 79(15), 1385-1391.
- Ceremuga, T. E., Valdivieso, D., Kenner, C., Lucia, A., Lathrop, K., Stailey, O., & Johnson, A. D. (2015). Evaluation of the anxiolytic and antidepressant effects of asiatic acid, a compound from Gotu kola or *Centella asiatica*, in the male Sprague Dawley rat. *AANA journal*, 83(2).
- Cervenka, S., Hedman, E., Ikoma, Y., Djurfeldt, D. R., Rück, C., Halldin, C., & Lindefors, N. (2012). Changes in dopamine D2-receptor binding are associated to symptom reduction after psychotherapy in social anxiety disorder. *Translational Psychiatry*, 2(5), e120-e120.
- Chand S.P., Marwaha R. (2021). Anxiety. *StatPearls [Internet]*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470361/>
- Charcosset, C., El-Harati, A., & Fessi, H. (2005). Preparation of solid lipid nanoparticles using a membrane contactor. *Journal of controlled release*, 108(1), 112-120.

- Chen, J., Lin, D., Zhang, C., Li, G., Zhang, N., Ruan, L., & Pang, C. (2015). Antidepressant-like effects of ferulic acid: involvement of serotonergic and norepinephrine systems. *Metabolic brain disease*, 30(1), 129-136.
- Chen, S. W., Wang, W. J., Li, W. J., Wang, R., Li, Y. L., Huang, Y. N., & Liang, X. (2006). Anxiolytic-like effect of asiaticoside in mice. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 85(2), 339-344.
- Cloos, J. M., & Ferreira, V. (2009). Current use of benzodiazepines in anxiety disorders. *Current Opinion In Psychiatry*, 22(1), 90-95.
- Crits-Christoph, P., Gibbons, M. B. C., Narducci, J., Schamberger, M., & Gallop, R. (2005). Interpersonal Problems and the Outcome of Interpersonally Oriented Psychodynamic Treatment of GAD. *Psychotherapy: Theory, Research, Practice, Training*, 42(2), 211.
- Cryan, J. F., & Sweeney, F. F. (2011). The age of anxiety: role of animal models of anxiolytic action in drug discovery. *British journal of pharmacology*, 164(4), 1129-1161.
- Çalışır M., (2019) , Sıçanlarda Bir Batında Doğan Yavru Sayısının Ve Kafeslemenin Fiziksel Ve Mental Gelişim Üzerine Etkilerinin İncelenmesi. Tez kodu: TEZ KODU: DEU.HSI.-PhD- 2012970047
- Çalışkan, H., Cihan, K. H., Osmanov, Z., KILINÇ, S., Öztürk, M. C., KILIÇDAĞI, M., ... & Zaloğlu, N. (2017). Aydınlik Karanlık Kutusu Testi'nin Biyolojik ve Biyolojik Olmayan Faktörler Açısından İncelenmesi. *Ankara Sağlık Hizmetleri Dergisi*, 16(2), 33-42.
- Çalışkan, H., Fırat, A. K. A. T., & Zaloğlu, N. (2017). Şartsız Hayvan Anksiyete Testleri. *Ankara Sağlık Hizmetleri Dergisi*, 16(1), 35-40.
- Dahlin, M., Andersson, G., Magnusson, K., Johansson, T., Sjögren, J., Håkansson, A., & Carlbring, P. (2016). Internet-delivered acceptance-based behaviour therapy for generalized anxiety disorder: A randomized controlled trial. *Behaviour Research and Therapy*, 77, 86-95.

- Dai, W., Zhang, D., Duan, C., Jia, L., Wang, Y., Feng, F., & Zhang, Q. (2010). Preparation and characteristics of oridonin-loaded nanostructured lipid carriers as a controlled-release delivery system. *Journal of Microencapsulation*, 27(3), 234-241.
- Daugé, V., & Léna, I. (1998). CCK in anxiety and cognitive processes. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 22(6), 815-825.
- Davis, M., Rainnie, D., & Cassell, M. (1994). Neurotransmission in the rat amygdala related to fear and anxiety. *Trends in neurosciences*, 17(5), 208-214.
- Deacon, R. M., & Rawlins, J. N. P. (2005). Hippocampal lesions, species-typical behaviours and anxiety in mice. *Behavioural Brain Research*, 156(2), 241-249.
- Del Valle-Mojica, L. M., & Ortíz, J. G. (2012). Anxiolytic properties of valeriana officinalis in the zebrafish: a possible role for metabotropic glutamate receptors. *Planta Medica*, 78(16), 1719-1724.
- Demirel, M. ve Yazan, Y., (2000). "Katı lipit nanopartiküller" *FABAD- Farmasötik bilimler Dergisi*, 25, 167-179.
- Demirel, M., & Yazan, Y., (2000), Kah Lipit Nanopartiküller (SLN). Disorders in Primary Care, 18-25. Elsevier. (<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1555415520305535#bib47>)
- Dolatabadi, J. E. N., Valizadeh, H., & Hamishehkar, H. (2015). Solid lipid nanoparticles as efficient drug and gene delivery systems: recent breakthroughs. *Advanced pharmaceutical bulletin*, 5(2), 151.
- Dulawa, S. C., & Hen, R. (2005). Recent advances in animal models of chronic antidepressant effects: the novelty-induced hypophagia test. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 29(4-5), 771-783.
- Eison, A. S., & Temple Jr, D. L. (1986). Buspirone: review of its pharmacology and current perspectives on its mechanism of action. *The American Journal Of Medicine*, 80(3), 1-9.
- Elmaskaya, A. (2020). *Ketoprofen Lizin İçeren Poli Laktik Ko Glikolik Asit (PLGA) Nanopartiküllerinin Hazırlanması Ve In-Vitro Değerlendirilmesi* (Doctoral dissertation, Anadolu University (Turkey)).

- Fajemiroye, J. O., da Silva, D. M., de Oliveira, D. R., & Costa, E. A. (2016). Treatment of anxiety and depression: medicinal plants in retrospect. *Fundamental & Clinical Pharmacology*, 30(3), 198-215.
- Fedotova, J., Kubatka, P., Büsselberg, D., Shleikin, A. G., Caprnda, M., Dragasek, J., & Opatrilova, R. (2017). Therapeutical strategies for anxiety and anxiety-like disorders using plant-derived natural compounds and plant extracts. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 95, 437-446.
- Felgentreff, F., Becker, A., Meier, B., & Brattström, A. (2012). Valerian extract characterized by high valerenic acid and low acetoxy valerenic acid contents demonstrates anxiolytic activity. *Phytomedicine*, 19(13), 1216-1222.
- File, S. E., & Hyde, J. R. G. (1978). Can social interaction be used to measure anxiety?. *British Journal of Pharmacology*, 62(1), 19-24.
- Finger, B. C., Dinan, T. G., & Cryan, J. F. (2010). Leptin-deficient mice retain normal appetitive spatial learning yet exhibit marked increases in anxiety-related behaviours. *Psychopharmacology*, 210(4), 559-568.
- Freudenberg, F., O'Leary, A., Aguiar, D. C., & Slattery, D. A. (2018). Challenges with modelling anxiety disorders: a possible hindrance for drug discovery. *Expert Opinion on Drug Discovery*, 13(4), 279-281.
- Fuchs, E., & Flügge, G. (2022). Experimental animal models for depression and anxiety simulation. *Dialogues in clinical neuroscience*.
- Fuladi, S., Emami, S. A., Mohammadpour, A. H., Karimani, A., Manteghi, A. A., & Sahebkar, A. (2020). Assessment of *Withania somnifera* root extract efficacy in patients with generalized anxiety disorder: A randomized double-blind placebo-controlled trial. *Current clinical pharmacology*. GABAA receptors in a surgical menopause model in rats. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 109, 2387-2395.
- Ghadim, M. B. A., Neisy, A., Sisakht, M., & Khoshdel, Z. (2020). *Lavandula angustifolia* aqueous extract ameliorates anxiety and depressive-like behaviors in chronic mild stress-treated male rats. *Journal of Medicinal Plants Research*, 14(11), 593-603.

- Ghazizadeh, J., Hamedeyazdan, S., Torbati, M., Farajdokht, F., Fakhari, A., Mahmoudi, J., & Sadigh-Eteghad, S. (2020). Melissa officinalis L. hydro-alcoholic extract inhibits anxiety and depression through prevention of central oxidative stress and apoptosis. *Experimental physiology*, 105(4), 707-720.
- Ghosh, S., Basak, P., Dutta, S., Chowdhury, S., & Sil, P. C. (2017). New insights into the ameliorative effects of ferulic acid in pathophysiological conditions. *Food and Chemical Toxicology*, 103, 41-55.
- Gloster, A. T., Sonntag, R., Hoyer, J., Meyer, A. H., Heinze, S., Ströhle, A., Wittchen, H. U. (2015). Treating treatment-resistant patients with panic disorder and agoraphobia using psychotherapy: A randomized controlled switching trial. *Psychotherapy and psychosomatics*, 84(2), 100-109.
- Goldberg, H. L., & Finnerty, R. J. (1979). The comparative efficacy of buspirone and diazepam in the treatment of anxiety. *The American journal of psychiatry*.
- Gould, T. D., Dao, D. T., & Kovacsics, C. E. (2009). The open field test. *Mood and anxiety related phenotypes in mice: Characterization using behavioral tests*, 1-20.
- Govindaswamy, V. (2015). Therapeutical properties of ferulic acid and bioavailability enhancement through feruloyl esterase. *Journal of Functional Foods*, 17, 657-666.
- Graeff, F. G., Netto, C. F., & Zangrossi Jr, H. (1998). The elevated T-maze as an experimental model of anxiety. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 23(2), 237-246.
- Griebel, G., & Holmes, A. (2013). 50 years of hurdles and hope in anxiolytic drug discovery. *Nature Reviews Drug Discovery*, 12(9), 667-687.
- Grundmann, O., Nakajima, J. I., Kamata, K., Seo, S., & Butterweck, V. (2009). Kaempferol from the leaves of Apocynum venetum possesses anxiolytic activities in the elevated plus maze test in mice. *Phytomedicine*, 16(4), 295-302.
- Grundmann, O., Nakajima, J. I., Seo, S., & Butterweck, V. (2007). Anti-anxiety effects of Apocynum venetum L. in the elevated plus maze test. *Journal of ethnopharmacology*, 110(3), 406-411.

- Grundmann, O., Wähling, C., Staiger, C., & Butterweck, V. (2009). Anxiolytic effects of a passion flower (*Passiflora incarnata* L.) extract in the elevated plus maze in mice. *Die Pharmazie-An International Journal of Pharmaceutical Sciences*, 64(1), 63-64.
- Grundmann, O., Wang, J., McGregor, G. P., & Butterweck, V. (2008). Anxiolytic activity of a phytochemically characterized *Passiflora incarnata* extract is mediated via the GABAergic system. *Planta Medica*, 74(15), 1769-1773.
- Gu, L., Sun, R., Wang, W., & Xia, Q. (2022). Nanostructured lipid carriers for the encapsulation of phloretin: Preparation and in vitro characterization studies. *Chemistry and Physics of Lipids*, 242, 105150.
- Guaiana, G., Barbui, C., & Cipriani, A. (2010). Hydroxyzine for generalised anxiety disorder. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, (12).
- Gulati, K., Rai, N., & Ray, A. (2017). Nitric oxide and anxiety. *Vitamins And Hormones*, 103, 169-192.
- Gumireddy, A., Christman, R., Kumari, D., Tiwari, A., North, E. J., & Chauhan, H. (2019). Preparation, characterization, and in vitro evaluation of curcumin-and resveratrol-loaded solid lipid nanoparticles. *Aaps Pharmscitech*, 20, 1-14.
- Guo, Y. Y., Zhou, Y., Li, Y. J., Liu, A., Yue, J., Liu, Q. Q., & Zhao, M. G. (2021). Scutellarin ameliorates the stress-induced anxiety-like behaviors in mice by regulating neurotransmitters. *Phytotherapy Research*.
- Han H, Ma Y, Eun JS, Li R, Hong JT, Lee MK, Oh KW. Anxiolytic-like effects of sanjoinine A isolated from *Zizyphi Spinosi Semen*: possible involvement of GABAergic transmission. *Pharmacol Biochem Behav*. 92(2):206-13, 2009.
- Han, H., Jung, J. K., Han, S. B., Nam, S. Y., Oh, K. W., & Hong, J. T. (2011). Anxiolytic-like effects of 4-O-methylhonokiol isolated from *Magnolia officinalis* through enhancement of GABAergic transmission and chloride influx. *Journal of Medicinal food*, 14(7-8), 724-731.

- Han, H., Ma, Y., Eun, J. S., Li, R., Hong, J. T., Lee, M. K., & Oh, K. W. (2009). Anxiolytic-like effects of sanjoinine A isolated from *Zizyphi Spinosi Semen*: possible involvement of GABAergic transmission. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 92(2), 206-213.
- Hang, A., Wang, Y. J., He, L., & Liu, J. G. (2015). The role of the dynorphin/ κ opioid receptor system in anxiety. *Acta Pharmacologica Sinica*, 36(7), 783-790.
- Hascoët, M., & Bourin, M. (1998). A new approach to the light/dark test procedure in mice. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 60(3), 645-653.
- Hascoët, M., & Bourin, M. (2009). The mouse light–dark box test. Mood and anxiety related phenotypes in mice: *Characterization using behavioral tests*, 197-223.
- Hernández-Esquivel, R. A., Navarro-Tovar, G., Zárate-Hernández, E., & Aguirre-Bañuelos, P. (2022). Solid lipid nanoparticles (SLN). In *Nanocomposite Materials for Biomedical and Energy Storage Applications*. IntechOpen.
- Hernandez-Gomez, A. M., Aguilar-Roblero, R., & de La Mora, M. P. (2002). Role of cholecystokinin-A and cholecystokinin-B receptors in anxiety. *Amino Acids*, 23(1), 283-290.
- Hoge, E. A., Bui, E., Marques, L., Metcalf, C. A., Morris, L. K., Robinaugh, D. J., Simon, N. M. (2013). Randomized controlled trial of mindfulness meditation for generalized anxiety disorder: effects on anxiety and stress reactivity. *The Journal of clinical psychiatry*, 74(8), 0-0.
- Hogg, S. (1996). A review of the validity and variability of the elevated plus-maze as an animal model of anxiety. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 54(1), 21-30.
- Holmes, A., Parmigiani, S., Ferrari, P. F., Palanza, P., & Rodgers, R. J. (2000). Behavioral profile of wild mice in the elevated plus-maze test for anxiety. *Physiology & Behavior*, 71(5), 509-516.
- Howard, J. L., & Pollard, G. T. (1990). Effects of buspirone in the geller-seifter conflict test with incremental shock. *Drug Development Research*, 19(1), 37-49.

- ICH, International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. (2014). *ICH Harmonised Tripartite Guideline Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology*. Q2(R1). 1-13.
- Ioniță, R., Postu, P. A., Cioancă, O., Mircea, C., Hăncianu, M., & Hrițcu, L. (2019). Anxiolytic and antidepressant effects of *Matricaria chamomilla* hydroalcoholic extract in a rat model of scopolamine. *Medicine*, 67, 1.
- Janda, K., Wojtkowska, K., Jakubczyk, K., Antoniewicz, J., & Skonieczna-Żydecka, K. (2020). *Passiflora incarnata* in Neuropsychiatric Disorders. A Systematic Review. *Nutrients*, 12(12), 3894.
- Jardim, M. C., Nogueira, R. L., Graeff, F. G., & Nunes-de-Souza, R. L. (1999). Evaluation of the elevated T-maze as an animal model of anxiety in the mouse. *Brain Research Bulletin*, 48(4), 407-411.
- Jarić, S., Popović, Z., Mačukanović-Jocić, M., Djurdjević, L., Mijatović, M., Karadžić, B., ... & Pavlović, P. (2007). An ethnobotanical study on the usage of wild medicinal herbs from Kopaonik Mountain (Central Serbia). *Journal Of Ethnopharmacology*, 111(1), 160-175)
- Jarić, S., Popović, Z., Mačukanović-Jocić, M., Djurdjević, L., Mijatović, M., Karadžić, B., ... & Pavlović, P. (2007). An ethnobotanical study on the usage of wild medicinal herbs from Kopaonik Mountain (Central Serbia). *Journal of ethnopharmacology*, 111(1), 160-175.
- Kalkumbe, M. A., Waghmare, S., & Kamble, H. (2023). Solid Lipid Nanoparticle (SLN). *International Research Journal of Modernization in Engineering Technology and Science*, 4.
- Kang, T. H., Jeong, S. J., Kim, N. Y., Higuchi, R., & Kim, Y. C. (2000). Sedative activity of two flavonol glycosides isolated from the flowers of *Albizzia julibrissin* Durazz. *Journal of ethnopharmacology*, 71(1-2), 321-323.
- Karami, M. A., Zadeh, B. S. M., Koochak, M., & Moghimipur, E. (2016). Superoxide dismutase-loaded solid lipid nanoparticles prepared by cold homogenization method: characterization and permeation study through burned rat skin. *Jundishapur Journal of Natural Pharmaceutical Products*, 11(4).

- Karamustafalıoğlu, O., & Yumrukçal, H. (2011). Depresyon ve anksiyete bozuklukları. *Şişli Etfal Hastanesi Tıp Bülteni*, 45(2), 65-74.
- Kasper, S., Gastpar, M., Müller, W. E., Volz, H. P., Möller, H. J., Dienel, A., & Schläfke, S. (2010). Silexan, an orally administered Lavandula oil preparation, is effective in the treatment of 'subsyndromal' anxiety disorder: a randomized, double-blind, placebo controlled trial. *International Clinical Psychopharmacology*, 25(5), 277-287.
- Kaur, D., Kamboj, A. ve Shri, R. (2016). Deney hayvanlarında çeşitli yulaf (*Avena sativa*), pirinç kepeği (*Oryza sativa*) ve ıspanak (*Spinacia oleracea*) özlerinin anksiyolitik etkilerinin karşılaştırmalı değerlendirmesi. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 7(10), 4110.
- Kaushik, M., Mohan, G., Shukla, T. P., Upadhyay, N., Mathur, A., & Cherian, B. P. (2012). Formulation Development and Evaluation of Solid Lipid Nanoparticles of Aceclofenac Using Solvent Injection Method. *Journal of Drug Delivery and Therapeutics*, 2(4).
- Kayaalp SO. *Akılcıl Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji*. Kayaalp SO (ed). Pelikan Yayıncılık, Ankara, 2012, 13. Baskı, 827-831.
- Khairnar, S. V., Pagare, P., Thakre, A., Nambiar, A. R., Junnuthula, V., Abraham, M. C., . & Dyawanapelly, S. (2022). Review on the scale-up methods for the preparation of solid lipid nanoparticles. *Pharmaceutics*, 14(9), 1886.
- Khom, S., Baburin, I., Timin, E., Hohaus, A., Trauner, G., Kopp, B., & Hering, S. (2007). Valerenic acid potentiates and inhibits GABAA receptors: molecular mechanism and subunit specificity. *Neuropharmacology*, 53(1), 178-187.
- Kim, W. K., Jung, J. W., Ahn, N. Y., Oh, H. R., Lee, B. K., Oh, J. K., ... & Ryu, J. H. (2004). Anxiolytic-like effects of extracts from the bark of *Albizia julibrissin* with high surplus maze crust in rats. *Life sciences*, 75(23), 2787-2795.
- Kipriye, Z., Şenel, B., & Yenilmez, E. (2017). Preparation and evaluation of carvedilol-loaded solid lipid nanoparticles for targeted drug delivery. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 16(9), 2057-2068.

- Koen, N., & Stein, D. J. (2022). Pharmacotherapy of anxiety disorders: a critical review. *Dialogues in clinical neuroscience*.
- Kotwal, S., Upaganlawar, A. B., Mahajan, M., & Upasani, C. (2015). Protective Effects of Ferulic Acid in Alcohol Withdrawal Induced Anxiety and Depression in Mice. *Malays J Med Biol Res*, 2(3), 231-6.
- Kraisit, P., Hirun, N., Mahadlek, J., & Limmatvapirat, S. (2021). Fluconazole-loaded solid lipid nanoparticles (SLNs) as a potential carrier for buccal drug delivery of oral candidiasis treatment using the Box-Behnken design. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 63, 102437.
- Kulkarni, S. K., Singh, K., & Bishnoi, M. (2007). Elevated zero maze: a paradigm to evaluate antianxiety effects of drugs. *Methods and findings in experimental and clinical pharmacology*, 29(5), 343-348.
- Kumar, A., & Chanana, P. (2017). Role of nitric oxide in stress-induced anxiety: from pathophysiology to therapeutic target. *Vitamins and Hormones*, 103, 147-167.
- Kumar, C. S., Thangam, R., Mary, S. A., Kannan, P. R., Arun, G., & Madhan, B. (2020). Targeted delivery and apoptosis induction of trans-resveratrol-ferulic acid loaded chitosan coated folic acid conjugate solid lipid nanoparticles in colon cancer cells. *Carbohydrate Polymers*, 231, 115682.
- Kumar, N., & Pruthi, V. (2014). Potential applications of ferulic acid from natural sources. *Biotechnology Reports*, 4, 86-93.
- Kumar, S., & Singh, M. (2019). Anxiolytic assessment of *Centella asiatica* with elevated zero maze and elevated plus maze in rats.
- Kumar, V., Bhat, Z. A., & Kumar, D. (2013). Animal models of anxiety: a comprehensive review. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 68(2), 175-183.
- Kuribara, H., Weintraub, S. T., Yoshihama, T., & Maruyama, Y. (2003). An anxiolytic-like effect of Ginkgo biloba extract and its constituent, ginkgolide-A, in mice. *Journal of Natural Products*, 66(10), 1333-1337.

- Küçük A, Gölgeli A, Arslan M. (2005). Depresyon oluşturulan sıçanlarda yaşın açık alan parametrelerine etkisi. *Erciyes Tıp Dergisi*, 27 (3):110-114.
- Küçük A, Gölgeli A. (2002). Emosyonel hipofaji öncesi ve sonrasında farelerde davranış parametreleri. *Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*, 11(1):31-35.
- Lader, M., & Kyriacou, A. (2016). Withdrawing benzodiazepines in patients with anxiety disorders. *Current psychiatry reports*, 18, 1-8.
- Leichsenring, F., Salzer, S., Beutel, M. E., Herpertz, S., Hiller, W., Hoyer, J., ... & Leibing, E. (2013). Psychodynamic therapy and cognitive-behavioral therapy in social anxiety disorder: a multicenter randomized controlled trial. *American Journal of Psychiatry*, 170(7), 759-767.
- Lenzi, J., Rodrigues, A. F., Ros, A. D. S., de Castro, B. B., de Lima, D. D., Magro, D. D. D., & Zeni, A. L. B. (2015). Ferulic acid chronic treatment exerts antidepressant-like effect: role of antioxidant defense system. *Metabolic brain disease*, 30, 1453-1463.
- Li, G., Ruan, L., Chen, R., Wang, R., Xie, X., Zhang, M., ... & Xu, Y. (2015). Synergistic antidepressant-like effect of ferulic acid in combination with piperine: involvement of monoaminergic system. *Metabolic brain disease*, 30(6), 1505-1514.
- Li, J., Liu, Q. T., Chen, Y., Liu, J., Shi, J. L., Liu, Y., & Guo, J. Y. (2016). Involvement of 5-HT 1A receptors in the anxiolytic-like effects of quercitrin and evidence of the involvement of the monoaminergic system. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2016.
- Lima, G.P., Vianello, F., Correa, C.R., Campos, R.A., Galhardo, M., 2014, "Polyphenols in Fruits and Vegetables and Its Effect on Human Health", *Food and Nutrition Sciences*, 5(11), 18 pages.
- Lipkind, D., Sakov, A., Kafkafi, N., Elmer, G. I., Benjamini, Y., & Golani, I. (2004). New replicable anxiety-related measures of wall vs. center behavior of mice in the open field. *Journal of Applied Physiology*, 97(1), 347-359.
- Lister, R. G. (1987). The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. *Psychopharmacology*, 92(2), 180-185.

- Liu, L., Liu, H., Hou, Y., Shen, J., Qu, X., & Liu, S. (2019). Temporal effect of electroacupuncture on anxiety-like behaviors and c-Fos expression in the anterior cingulate cortex in a rat model of post-traumatic stress disorder. *Neuroscience letters*, 711, 134432.
- Liu, Y. M., Hu, C. Y., Shen, J. D., Wu, S. H., Li, Y. C., & Yi, L. T. (2017). Elevation of synaptic protein is associated with the antidepressant-like effects of ferulic acid in a chronic model of depression. *Physiology & behavior*, 169, 184-188.
- Lopez, V., Nielsen, B., Solas, M., Ramírez, M. J., & Jäger, A. K. (2017). Exploring pharmacological mechanisms of lavender (*Lavandula angustifolia*) essential oil on central nervous system targets. *Frontiers in pharmacology*, 8, 280.
- López, V., Nielsen, B., Solas, M., Ramírez, M. J., & Jäger, A. K. (2017). Exploring pharmacological mechanisms of lavender (*Lavandula angustifolia*) essential oil on central nervous system targets. *Frontiers in pharmacology*, 8, 280.
- Lorigooini, Z., Nouri, A., Balali-Dehkordi, S., Bijad, E., Dehkordi, S. H., Soltani, A., & Amini-Khoei, H. (2021). Ferulic acid through mitigation of NMDA receptor pathway exerts anxiolytic-like effect in mouse model of maternal separation stress. *Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology*, 32(1).
- Magaji, M. G., Iniaghe, L. O., Abolarin, M., Abdullahi, O. I., & Magaji, R. A. (2017). Neurobehavioural evaluation of resveratrol in murine models of anxiety and schizophrenia. *Metabolic Brain Disease*, 32(2), 437-442.
- Mancuso, C., & Santangelo, R. (2014). Ferulic acid: pharmacological and toxicological aspects. *Food and Chemical Toxicology*, 65, 185-195.
- Mandrioli, R., & Mercolini, L. (2015). Discontinued anxiolytic drugs (2009–2014). *Expert Opinion on Investigational Drugs*, 24(4), 557-573.
- Manjunath, K., Reddy, J. S., & Venkateswarlu, V. (2005). Solid lipid nanoparticles as drug delivery systems. *Methods Find Exp Clin Pharmacol*, 27(2), 127-144.
- Marazioti, A., Spyraiki, C., & Thermos, K. (2009). GABA antagonists reverse the somatostatin dependent attenuation of rat locomotor activity. *Neuropeptides*, 43(3), 207-212.

- Masand, P. S., & Gupta, S. (1999). Selective serotonin-reuptake inhibitors: an update. *Harvard Review Of Psychiatry*, 7(2), 69-84.
- Mashhadian, A., Afjoul, H., & Shamloo, A. (2022). An integrative method to increase the reliability of conventional double emulsion method. *Analytica Chimica Acta*, 1197, 339523.
- McCall, J. G., Siuda, E. R., Bhatti, D. L., Lawson, L. A., McElligott, Z. A., Stuber, G. D., & Bruchas, M. R. (2017). Locus coeruleus to basolateral amygdala noradrenergic projections promote anxiety-like behavior. *Elife*, 6, e18247.
- Mehnert, W., & Mäder, K. (2012). Solid lipid nanoparticles: Production, Characterization and Applications. *Advanced drug delivery reviews*, 64, 83-101.
- Melaragno, A., Spera, V., & Bui, E. (2020). Psychopharmacology of Anxiety Disorders. *In Clinical Handbook of Anxiety Disorders* (pp. 251-267). Humana, Cham.
- Mi, X. J., Chen, S. W., Wang, W. J., Wang, R., Zhang, Y. J., Li, W. J., & Li, Y. L. (2005). Anxiolytic-like effect of paeonol in mice. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 81(3), 683-687.
- Mi, X. J., Chen, S. W., Wang, W. J., Wang, R., Zhang, Y. J., Li, W. J., Li, Y. L. (2005). Anxiolytic-like effect of paeonol in mice. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 81(3), 683-687.
- Millan, M. J., & Brocco, M. (2003). The Vogel conflict test: procedural aspects, γ -aminobutyric acid, glutamate and monoamines. *European Journal of Pharmacology*, 463(1-3), 67-96.
- Milrod, B., Leon, A. C., Busch, F., Rudden, M., Schwalberg, M., Clarkin, J., ... & Shear, M. K. (2007). A randomized controlled clinical trial of psychoanalytic psychotherapy for panic disorder. *American Journal of Psychiatry*, 164(2), 265-272.
- Mishra, V., Bansal, K. K., Verma, A., Yadav, N., Thakur, S., Sudhakar, K., & Rosenholm, J. M. (2018). Solid lipid nanoparticles: Emerging colloidal nano drug delivery systems. *Pharmaceutics*, 10(4), 191

- Moini J., Koenitzer J., LoGalbo A. (2021). Global Emergency of Mental Disorders. Moini J., LoGalbo A., Koenitzer J.(Editörler) , *Chapter 5 -Anxiety disorders* (71-93). Academic Press.
- Mombereau, C., Kaupmann, K., Froestl, W., Sansig, G., van der Putten, H., & Cryan, J. F. (2004). Genetic and pharmacological evidence of a role for GABA B receptors in the modulation of anxiety-and antidepressant-like behavior. *Neuropsychopharmacology*, 29(6), 1050-1062.
- Monsef-Esfahani, H. R., Amini, M., Goodarzi, N., Saiedmohammadi, F., Hajiaghaee, R., Faramarzi, M. A., ... & Ghahremani, M. H. (2013). Coumarin compounds of Biebersteinia multifida roots show potential anxiolytic effects in mice. *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences*, 21, 1-8.
- Mora-Huertas, C. E., Fessi, H., & Elaissari, A. (2011). Influence of process and formulation parameters on the formation of submicron particles by solvent displacement and emulsification–diffusion methods: Critical comparison. *Advances in colloid and interface science*, 163(2), 90-122.
- Mosienko, V., Bert, B., Beis, D., Matthes, S., Fink, H., Bader, M., & Alenina, N. (2012). Exaggerated aggression and decreased anxiety in mice deficient in brain serotonin. *Translational Psychiatry*, 2(5), e122-e122.
- Muller, R. H., & Keck, C. M. (2004). Challenges and solutions for the delivery of biotech drugs—a review of drug nanocrystal technology and lipid nanoparticles. *Journal of biotechnology*, 113(1-3), 151-170.
- Munir, S., & Takov, V. (2017). Generalized anxiety disorder. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK441870/>
- Murphy, K., Kubin, Z. J., Shepherd, J. N., & Ettinger, R. (2010). Valeriana officinalis root extracts have potent anxiolytic effects in laboratory rats. *Phytomedicine*, 17(8-9), 674-678.
- Muscattello, M. R., Spina, E., Bandelow, B., & Baldwin, D. S. (2012). Clinically relevant drug interactions in anxiety disorders. *Human Psychopharmacology: Clinical and Experimental*, 27(3), 239-253.

- Müller, R. H., Mäder, K., & Gohla, S. (2000). Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery—a review of the state of the art. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 50(1), 161-177.
- Müller, R. H., Petersen, R. D., Hommoss, A., & Pardeike, J. (2007). Nanostructured lipid carriers (NLC) in cosmetic dermal products. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 59(6), 522-530.
- Müller, R. H., Radtke, M., & Wissing, S. A. (2002). Solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC) in cosmetic and dermatological preparations. *Advanced drug delivery reviews*, 54, S131-S155.
- Nemeroff, C. B. (2003). The role of GABA in the pathophysiology and treatment of anxiety disorders. *Psychopharmacology Bulletin*, 37(4), 133-146.
- Nikandish, N., Hosseinzadeh, L., Azandaryani, A. H., & Derakhshandeh, K. (2016). The role of nanoparticle in brain permeability: An in-vitro BBB model. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research: IJPR*, 15(2), 403.
- Nordquist, R. E., Meijer, E., van der Staay, F. J., & Arndt, S. S. (2017). Pigs as model species to investigate effects of early life events on later behavioral and neurological functions. In *Animal models for the study of human disease* (pp. 1003-1030). Academic Press.of Pharmaceutical Research: IJPR, 15(2), 403.
- Nunes, S., Madureira, A. R., Campos, D., Sarmiento, B., Gomes, A. M., Pintado, M., & Reis, F. (2017). Solid lipid nanoparticles as oral delivery systems of phenolic compounds: overcoming pharmacokinetic limitations for nutraceutical applications. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 57(9), 1863-1873.
- Nuss, P. (2015). Anxiety disorders and GABA neurotransmission: a disturbance of modulation. *Neuropsychiatric disease and treatment*, 11, 165.
- Orhan, I. E. (2021). A review focused on molecular mechanisms of anxiolytic effect of Valerina officinalis L. in connection with its phytochemistry through in vitro/in vivo studies. *Current Pharmaceutical Design*.
- Ou, S., & Kwok, K. C. (2004). Ferulic acid: pharmaceutical functions, preparation and applications in foods. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 84(11), 1261-1269.

- Özakkaş, T. (2014). Anksiyete Bozuklukları Ve Tedavisi.
- Palenicek, T., Votava, M., Bubenikova, V., & Horacek, J. (2005). Increased sensitivity to the acute effects of MDMA (“ecstasy”) in female rats. *Physiology & behavior*, 86(4), 546-553.
- Parhi, R., & Suresh, P. (2010). Production of solid lipid nanoparticles-drug loading and release mechanism. *J Chem Pharm Res*, 2(1), 211-27.
- Patra, J. K., Das, G., Fraceto, L. F., Campos, E. V. R., Rodriguez-Torres, M. D. P., Acosta-Torres, L. S., ... & Shin, H. S. (2018). Nano based drug delivery systems: recent developments and future prospects. *Journal of Nanobiotechnology*, 16(1), 1-33
- Pellow, S., Chopin, P., File, S. E., & Briley, M. (1985). Validation of open: closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *Journal of Neuroscience Methods*, 14(3), 149-167.
- Pınar Çetiner, Ö. (2017). *Ferulik asitin anksiyolitik etkinliğine aracılık eden mekanizmalar* (Master's thesis, Anadolu Üniversitesi).
- Pitsikas, N., Boulதாகis, A., Georgiadou, G., Tarantilis, P. A., & Sakellaris, N. (2008). Effects of the active constituents of *Crocus sativus* L., crocins, in an animal model of anxiety. *Phytomedicine*, 15(12), 1135-1139.
- Pittler, M. H., & Ernst, E. (2000). Efficacy of kava extract for treating anxiety: systematic review and meta-analysis. *Journal of Clinical Psychopharmacology*, 20(1), 84-89.
- Pooja, D., Tunki, L., Kulhari, H., Reddy, B. B., & Sistla, R. (2016). Optimization of solid lipid nanoparticles prepared by a single emulsification-solvent evaporation method. *Data in brief*, 6, 15-19.
- Prut, L., & Belzung, C. (2003). The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. *European Journal Of Pharmacology*, 463(1-3), 3-33
- Rabbani, M., Sajjadi, S. E., Vaseghi, G., & Jafarian, A. (2004). Anxiolytic effects of *Echium amoenum* on the elevated plus-maze model of anxiety in mice. *Fitoterapia*, 75(5), 457-464.

- Rex, A., Voigt, J. P., Gustedt, C., Beckett, S., & Fink, H. (2004). Anxiolytic-like profile in Wistar, but not Sprague–Dawley rats in the social interaction test. *Psychopharmacology*, 177(1), 23-34.
- Rodgers, R. J. (1997). Animal models of 'anxiety': where next?. *Behavioural pharmacology*, 8(6), 477-496.
- Rodriguez-Landa, J. F., Hernández-López, F., Cueto-Escobedo, J., Herrera-Huerta, E. V., Rivadeneyra-Domínguez, E., Bernal-Morales, B., & Romero-Avenidaño, E. (2019). Chrysin (5, 7-dihydroxyflavone) exerts anxiolytic-like effects through GABA_A receptors in a surgical menopause model in rats. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 109, 2387-2395.
- Rodríguez-Landa, J. F., Hernández-López, F., Cueto-Escobedo, J., Herrera-Huerta, E. V., Rivadeneyra-Domínguez, E., BernalMorales, B., & Romero-Avenidaño, E. (2019). Chrysin (5, 7-dihydroxyflavone) exerts anxiolytic-like effects through GABA_A receptors in a surgical menopause model in rats. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 109, 2387-2395.
- Rodríguez-Landa, J. F., Hernández-López, F., Cueto-Escobedo, J., Herrera-Huerta, E. V., Rivadeneyra-Domínguez, E., Rojas-Carvajal, M., Quesada-Yamasaki, D., & Brenes, J. C. (2021). The cage test as an easy way to screen and evaluate spontaneous activity in preclinical neuroscience studies. *MethodsX*, 8, 101271.
- Rosca, I. D., Watari, F., & Uo, M. (2004). Microparticle formation and its mechanism in single and double emulsion solvent evaporation. *Journal of controlled release*, 99(2), 271-280.
- Runge SA, Müller RH. Solid Lipid Nanoparticles (SLNTM) for Oral Administration-Drug Incorporation and Degradation(1998) , Diederichs J.E.Müller R.H. (Eds.), *Future Strategies far Delivery Systems*, CRC Press, Florida, 91-100.
- RxMediaPharma® İnteraktif İlaç Bilgi Kaynağı, 2023. Genel Editör Prof. Dr. Levent Üstünes, GEMAŞ Genel Mühendislik A.Ş., Bornova, İzmir, ISBN: 978-975-6168-20-2.
- Saeed, S. A., Cunningham, K., & Bloch, R. M. (2019). Depression and anxiety disorders: benefits of exercise, yoga, and meditation. *American Family Physician*, 99(10), 620-627.

- Saini, S., Sharma, T., Jain, A., Kaur, H., Katare, O. P., & Singh, B. (2021). Systematically designed chitosan-coated solid lipid nanoparticles of ferulic acid for effective management of Alzheimer's disease: A preclinical evidence. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 205, 111838.
- Sandeep, K., Rajmeet, S., & Poonam, A. (2018). Pharmacological studies on protective effect of ferulic acid in monosodium glutamate induced anxiety and motor incoordination. *Current Psychopharmacology*, 7(2), 208-214.
- Sara, S. J. (2009). The locus coeruleus and noradrenergic modulation of cognition. *Nature reviews neuroscience*, 10(3), 211-223.
- Sarris, J., Stough, C., Bousman, C. A., Wahid, Z. T., Murray, G., Teschke, R., ... & Schweitzer, I. (2013). Kava in the treatment of generalized anxiety disorder: a double-blind, randomized, placebo-controlled study. *Journal of clinical psychopharmacology*, 33(5), 643-648.
- Sartori, S. B., & Singewald, N. (2019). Novel pharmacological targets in drug development for the treatment of anxiety and anxiety-related disorders. *Pharmacology & therapeutics*, 107402.
- Savage, K., Firth, J., Stough, C., & Sarris, J. (2018). GABA-modulating phytochemicals for anxiety: A systematic review of preclinical and clinical evidence. *Phytotherapy Research*, 32(1), 3-18.
- Seibenhener, M. L., & Wooten, M. C. (2015). Use of the open field maze to measure locomotor and anxiety-like behavior in mice. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, (96), e52434.
- Shah, R. M., Bryant, G., Taylor, M., Eldridge, D. S., Palombo, E. A., & Harding, I. H. (2016). Structure of solid lipid nanoparticles produced by a microwave-assisted microemulsion technique. *RSC advances*, 6(43), 36803-36810.
- Shepherd, J. K., Grewal, S. S., Fletcher, A., Bill, D. J., & Dourish, C. T. (1994). Behavioural and pharmacological characterisation of the elevated "zero-maze" as an animal model of anxiety. *Psychopharmacology*, 116(1), 56-64.

- Shirodkar, R. K., Kumar, L., Mutalik, S., & Lewis, S. (2019). Solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers: emerging lipid based drug delivery systems. *Pharmaceutical Chemistry Journal*, 53, 440-453.
- Silva, A. C., Amaral, M. H., González-Mira, E., Santos, D., & Ferreira, D. (2012). Solid lipid nanoparticles (SLN)-based hydrogels as potential carriers for oral transmucosal delivery of Risperidone: Preparation and characterization studies. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 93, 241-248.
- Simiand, J., Keane, P. E., & Morre, M. (1984). The staircase test in mice: a simple and efficient procedure for primary screening of anxiolytic agents. *Psychopharmacology*, 84(1), 48-53.
- Simon, P., Dupuis, R., & Costentin, J. (1994). Thigmotaxis as an index of anxiety in mice. Influence of dopaminergic transmissions. *Behavioural Brain Research*, 61(1), 59-64.
- Singh, L., Lewis, A. S., Field, M. J., Hughes, J., & Woodruff, G. N. (1991). Evidence for an involvement of the brain cholecystokinin B receptor in anxiety. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 88(4), 1130-1133.
- Singh, R. (2019). Preparation of solid lipid nanoparticles through various methods using different precursors. *Journal of Drug Delivery and Therapeutics*, 9(2), 415-419.
- Singh, Y. N., & Singh, N. N. (2002). Therapeutic potential of kava in the treatment of anxiety disorders. *CNS drugs*, 16(11), 731-743.
- Solati, J., & Sanaguye Motlagh, H. (2008). Anxiolytic effects of Valepotriates extracted from *Valeriana officinalis* L. in rats. *Journal of Inflammatory Disease*, 12(3), 63-67.
- Soltani, A., & Pakravan, P. (2023). Preparation and Characterization of Magnetic Solid Lipid Nanoparticles as a Targeted Drug Delivery System for Doxorubicin. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, 13(2), 301.
- Srinivasan, M., Sudheer, A. R., & Menon, V. P. (2007). Ferulic acid: therapeutic potential through its antioxidant property. *Journal of clinical biochemistry and nutrition*, 40(2), 92-100.

- Stahl, M. M. S., Lindquist, M., Pettersson, M., Edwards, I. R., Sanderson, J. H., Taylor, N. F. A., ... & Schou, J. S. (1997). Withdrawal reactions with selective serotonin reuptake inhibitors as reported to the WHO system. *European journal of clinical pharmacology*, 53, 163-169.
- Sultana, A., Asma, K., Rahman, K., & Rahman, S. (2015). Oleo-gum-resin of *Ferula asafoetida*: A traditional culinary spice with versatile pharmacological activities. *Research Journal of Recent Sciences*. ISSN, 2277, 2502.
- Svilenov, H., & Tzachev, C. (2014). Solid lipid nanoparticles—apromising drug delivery system. *Nanomedicine*, 8, 188-237.
- Szymborska-Sandhu, I., Przybył, J. L., Kosakowska, O., Bączek, K., & Węglarz, Z. (2020). Chemical diversity of Bastard Balm (*Melittis melisophyllum* L.) as affected by plant development. *Molecules*, 25(10), 2421.
- Takao, K., & Miyakawa, T. (2006). Light/dark transition test for mice. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, (1), e104.
- Takeda, H., Tsuji, M., & Matsumiya, T. (1998). Changes in head-dipping behavior in the hole-board test reflect the anxiogenic and/or anxiolytic state in mice. *European Journal of Pharmacology*, 350(1), 21-29.
- Tallarida, R. J. (2011). Quantitative methods for assessing drug synergism. *Genes & Cancer*, 2(11), 1003-1008.
- Taylor, D. P. (1988). Buspirone, a new approach to the treatment of anxiety. *The FASEB Journal*, 2(9), 2445-2452.
- Thanacoody, H. R., & Thomas, S. H. (2005). Tricyclic antidepressant poisoning. *Toxicological reviews*, 24(3), 205-214. toxicological aspects. *Food and Chemical Toxicology*, 65, 185-195.
- Tiller, JW (2013). Depression and anxiety. *Australian Medical Journal*, 199(6), S. 28–S31.
- Toksoy, M. O., & Tırnaksız, F. F. (2021). Katı Lipit Nanopartiküller ve Beyne Özgü İlaç Taşıyıcı Sistem Olarak Uygulamaları. *Journal of Faculty of Pharmacy of Ankara University*, 45(2), 428-442.

- Toksoy, M. O., & Tirnaksız, F. F. (2021). Katı Lipit Nanopartiküller Ve Beyne Özgü İlaç Taşıyıcı Sistem Olarak Uygulamaları. *Journal of Faculty of Pharmacy of Ankara University*, 45(2), 428-442.
- Trauner, G., Khom, S., Baburin, I., Benedek, B., Hering, S., & Kopp, B. (2008). Modulation of GABAA receptors by valerian extracts is related to the content of valerenic acid. *Planta Medica*, 74(01), 19-24.
- Trombino, S., Cassano, R., Ferrarelli, T., Barone, E., Picci, N., & Mancuso, C. (2013). Trans-ferulic acid-based solid lipid nanoparticles and their antioxidant effect in rat brain microsomes. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 109, 273-279.
- Trotta, M., Debernardi, F., & Caputo, O. (2003). Preparation of solid lipid nanoparticles by a solvent emulsification–diffusion technique. *International journal of pharmaceutics*, 257(1-2), 153-160.
- Turner, P. V., Brabb, T., Pekow, C., & Vasbinder, M. A. (2011). Administration of substances to laboratory animals: routes of administration and factors to consider. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*, 50(5), 600-613.
- Tyrer, P., & Shawcross, C. (1988). Monoamine oxidase inhibitors in anxiety disorders. *Journal of psychiatric research*, 22, 87-98.
- Uvnäs-Moberg, K., Alster, P., Lund, I., Lundeberg, T., Kurosawa, M., & Ahlenius, S. (1996). Stroking of the abdomen causes decreased locomotor activity in conscious male rats. *Physiology & behavior*, 60(6), 1409-1411.
- Valle-Mojica, D., Lisa, M., Ayala-Marín, Y. M., Ortiz-Sanchez, C. M., Torres-Hernández, B. A., Abdalla-Mukhaimer, S., & Ortiz, J. G. (2011). Selective interactions of Valeriana officinalis extracts and valerenic acid with [3 H] glutamate binding to rat synaptic membranes. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2011.
- Valvassori, S. S., Varela, R. B; Quevedo, J. (2017). Animal models of mood disorders: focus on bipolar disorder and depression. *In Animal Models for the Study of Human Disease* (pp. 991-1001). Academic Press.

- Viegas, C., Seck, F., & Fonte, P. (2022). An insight on lipid nanoparticles for therapeutic proteins delivery. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 103839.
- Vinchhi, P., Patel, J. K., & Patel, M. M. (2021). High-pressure homogenization techniques for nanoparticles. In *Emerging Technologies for Nanoparticle Manufacturing* (pp. 263-285). Cham: Springer International Publishing..
- Vogel, J. R., Beer, B., & Clody, D. E. (1971). A simple and reliable conflict procedure for testing anti-anxiety agents. *Psychopharmacologia*, 21(1), 1-7.
- Volke, V., Soosaar, A., Kõks, S., Bourin, M., Männistö, P. T., & Vasar, E. (1997). 7-Nitroindazole, a nitric oxide synthase inhibitor, has anxiolytic-like properties in exploratory models of anxiety. *Psychopharmacology*, 131, 399-405.
- Walsh, R. N., & Cummins, R. A. (1976). The open-field test: a critical review. *Psychological Bulletin*, 83(3), 482.
- Wanasuntronwong, A., Tantisira, M. H., Tantisira, B., & Watanabe, H. (2012). Anxiolytic effects of standardized extract of *Centella asiatica* (Eca 233) after chronic immobilization stress in mice. *Journal of ethnopharmacology*, 143(2), 579-585.
- Wanasuntronwong, A., Wanakhachornkrai, O., Phongphanphanee, P., Isa, T., Tantisira, B., & Tantisira, M. H. (2018). Modulation of neuronal activity on intercalated neurons of amygdala might underlie anxiolytic activity of a standardized extract of *Centella asiatica* Eca233. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2018.
- Wensel, T. M., Powe, K. W., & Cates, M. E. (2012). Pregabalin for the treatment of generalized anxiety disorder. *Annals of Pharmacotherapy*, 46(3), 424-429.
- White, H. L., Scates, P. W., & Cooper, B. R. (1996). Extracts of *Ginkgo biloba* leaves inhibit monoamine oxidase. *Life Sciences*, 58(16), 1315-1321.
- Wijeweera, P., Arnason, J. T., Koszycki, D., & Merali, Z. (2006). Evaluation of anxiolytic properties of Gotukola-(*Centella asiatica*) extracts and asiaticoside in rat behavioral models. *Phytomedicine*, 13(9-10), 668-676.
- Williams, M., & Porsolt, R. D. (2007). CNS safety pharmacology.
- Wissing, S. A., Kayser, O., & Müller, R. H. (2004). Solid lipid nanoparticles for parenteral drug delivery. *Advanced drug delivery reviews*, 56(9), 1257-1272.

- Woelk, H., & Schläfke, S. (2010). A multi-center, double-blind, randomised study of the Lavender oil preparation Silexan in comparison to Lorazepam for generalized anxiety disorder. *Phytomedicine*, 17(2), 94-99.
- Xu, Y., Zhang, L., Shao, T., Ruan, L., Wang, L., Sun, J., ... & Pan, J. (2013). Ferulic acid increases pain threshold and ameliorates depression-like behaviors in reserpine-treated mice: behavioral and neurobiological analyses. *Metabolic Brain Disease*, 28(4), 571-583.
- Xu, Z., Wang, F., Tsang, S. Y., Ho, K. H., Zheng, H., Yuen, C. T., ... & Xue, H. (2006). Anxiolytic-like effect of baicalin and its additivity with other anxiolytics. *Planta Medica*, 72(02), 189-192.
- Yadav, K. S., & Kale, K. (2020). High pressure homogenizer in pharmaceuticals: understanding its critical processing parameters and applications. *Journal of Pharmaceutical Innovation*, 15, 690-701.
- Yadav, N., Khatak, S., & Sara, U. S. (2013). Solid lipid nanoparticles-a review. *Int. J. Appl. Pharm*, 5(2), 8-18.
- Yamada, M., & Yasuhara, H. (2004). Clinical pharmacology of MAO inhibitors: safety and future. *Neurotoxicology*, 25(1-2), 215-221.,
- Yoon, B. H., Jung, J. W., Lee, J. J., Cho, Y. W., Jang, C. G., Jin, C., Ryu, J. H. (2007). Anxiolytic-like effects of sinapic acid in mice. *Life sciences*, 81(3), 234-240.
- Zarrindast, M. R., & Khakpai, F. (2015). The modulatory role of dopamine in anxiety-like behavior. *Archives Of Iranian Medicine*, 18(9), 0-0.
- Zeni, A. L. B., Camargo, A., & Dalmagro, A. P. (2017). Ferulic acid reverses depression-like behavior and oxidative stress induced by chronic corticosterone treatment in mice. *Steroids*, 125, 131-136.
- Zeni, A. L. B., Zomkowski, A. D. E., Maraschin, M., Rodrigues, A. L. S., & Tasca, C. I. (2012). Ferulic acid exerts antidepressant-like effect in the tail suspension test in mice: evidence for the involvement of the serotonergic system. *European Journal of Pharmacology*, 679(1-3), 68-74.

- Zhang, J., Wang, J., Qiao, F., Liu, Y., Zhou, Y., Li, M., & Zhou, Z. (2021). Polymeric non-spherical coarse microparticles fabricated by double emulsion-solvent evaporation for simvastatin delivery. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 199, 111560.
- Zhang, Y. J., Huang, X., Wang, Y., Xie, Y., Qiu, X. J., Ren, P., & Qiao, M. Q. (2011). Ferulic acid-induced anti-depression and prokinetics similar to Chaihu–Shugan–San via polypharmacology. *Brain research bulletin*, 86(3-4), 222-228.
- Zhao, Z., Egashira, Y., & Sanada, H. (2004). Ferulic acid is quickly absorbed from rat stomach as the free form and then conjugated mainly in liver. *The Journal of Nutrition*, 134(11), 3083-3088.
- Zielińska, A., Ferreira, N. R., Durazzo, A., Lucarini, M., Cicero, N., Mamouni, S. E., ... & Souto, E. B. (2019). Development and optimization of alpha-pinene-loaded solid lipid nanoparticles (SLN) using experimental factorial design and dispersion analysis. *Molecules*, 24(15), 2683.
- Zmudzka, E., Sałaciak, K., Sapa, J., & Pytka, K. (2018). Serotonin receptors in depression and anxiety: Insights from animal studies. *Life Sciences*, 210, 106-124.
- Zwanzger, P. (2016). Pharmacotherapy of anxiety disorders. *Fortschritte der Neurologie-psychiatrie*, 84(5), 306-314.
- <http-1:https://www.nimh.nih.gov/health/topics/anxiety-disorders>
[Erişim Tarihi:16.01.2024]

EKLER

EK-1

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ			
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU KARAR FORMU			
Toplantı No: 3 Dosya Kayıt No: 21-11 BAŞVURU BİLGİLERİ	ARAŞTIRMANIN ADI	Ferulik asidin ve ferulik asit yüklü taşıyıcı sistemin anksiyete üzerine etkilerinin karşılaştırılması.	
	SORUMLU ARAŞTIRMACI ÜNVANI / ADI KURUMU	Prof. Dr. Rana ARSLAN Anadolu Üniversitesi Eczacılık Fakültesi	
	YARDIMCI ARAŞTIRMACILAR	Mevcutte ÇAM	
	Hayvan Türü ve Sayısı	Balb/c (Erkek) 100	
DEĞERLENDİRİLEN BELGE	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ ve EKLERİ	Var	
KARAR BİLGİLERİ	Anadolu Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Öğretim Üyesi Prof. Dr. Rana ARSLAN'ın 11.11.2020 tarih ve 2020-48 karar no ile onaylanmış olan "Ferulik asidin katı lipid nanopartikül formülasyonunun hazırlanması ve anksiyete tedavisinde terapötik etkisinin araştırılması" başlıklı etik kurul projesinin başlığı ile ilgili düzeltme başvurusu etik kurulumuzca değerlendirilmiş ve proje adının "Ferulik asidin ve ferulik asit yüklü taşıyıcı sistemin anksiyete üzerine etkilerinin karşılaştırılması" olarak değiştirilmesine; karar verilmiştir.		
	KARAR NO: 2021-11	KARAR TARİHİ: 17.03.2021	
ETİK KURUL ÜYELERİ			
ÜNVANI / ADI SOYADI ETİK KURUL GÖREVİ	BİRİMİ	TOPLANTIYA KATILMA	KARARA KATILMA İMZA
Prof. Dr. Bülent ERGUN BAŞKAN	Eczacılık Fakültesi Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı	<input checked="" type="checkbox"/> Katıldı <input type="checkbox"/> Katılmadı	
Prof. Dr. Özgür Devrim CAN ÜYE	Eczacılık Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalı	<input checked="" type="checkbox"/> Katıldı <input type="checkbox"/> Katılmadı	
Prof. Dr. A.Tansu KOPARAL ÜYE	Yunus Emre Sağlık Hiz. Meslek Yüksek Okulu	<input checked="" type="checkbox"/> Katıldı <input type="checkbox"/> Katılmadı	
Doç. Dr. Mustafa Sinan KAYNAK ÜYE	Eczacılık Fakültesi Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı	<input checked="" type="checkbox"/> Katıldı <input type="checkbox"/> Katılmadı	
Prof. Dr. Ümide DEMİR ÖZKAY ÜYE	Eczacılık Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalı	<input checked="" type="checkbox"/> Katıldı <input type="checkbox"/> Katılmadı	
Prof. Dr. Gülşen AKALIN ÇİFTÇİ ÜYE	Eczacılık Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı	<input checked="" type="checkbox"/> Katıldı <input type="checkbox"/> Katılmadı	
Dr. Öğr. Üyesi Vet. Hek. Mustafa ESER ÜYE	Deney Hayvanları Arş. Ve Uyg. Birimi	<input checked="" type="checkbox"/> Katıldı <input type="checkbox"/> Katılmadı	
Vet. Hek. Mustafa SAYIN ÜYE	Serbest	<input checked="" type="checkbox"/> Katıldı <input type="checkbox"/> Katılmadı	
		<input type="checkbox"/> Katıldı <input type="checkbox"/> Katılmadı	