T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

JUGLON VE CEVİZ EKSTRAKTININ RATLARDA SEROTONİN VE DOPAMİN NÖROTRANSMİTTERLERİ ÜZERİNE ETKİLERİ

Şener ÇİNTESUN

YÜKSEK LİSANS TEZİ
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı
Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı

Danışman
Prof. Dr. İsmail KOCAÇALIŞKAN

Eş-Danışman
Doç. Dr. Banu Mansuroğlu

Ocak, 2022

T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

JUGLON VE CEVİZ EKSTRAKTININ RATLARDA SEROTONİN VE DOPAMİN NÖROTRANSMİTTERLERİ ÜZERİNE ETKİLERİ

Şener ÇİNTESUN tarafından hazırlanan tez çalışması 14.01.2022 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. İsmail KOCAÇALIŞKAN
Yıldız Teknik Üniversitesi
Danışman

Doç. Dr. Banu Mansuroğlu
Yıldız Teknik Üniversitesi
Eş-Danışman

Jüri Üyeleri

Prof. Dr. İsmail KOCAÇALIŞKAN, Danışman
Yıldız Teknik Üniversitesi _____

Prof. Dr. Semiha Erişen, Üye
Yıldız Teknik Üniversitesi _____

Prof. Dr. Abdürrahim Koçyiğit, Üye
Bezmialem Vakıf Üniversitesi _____

Danışmanım Prof. Dr. İsmail KOCAÇALIŞKAN sorumluluğunda tarafımca hazırlanan Juglon ve Ceviz Ekstraktının Ratlarda Serotonin ve Dopamin Nörotransmitterleri Üzerine Etkileri başlıklı çalışmada veri toplama ve veri kullanımında gerekli yasal izinleri aldığımı, diğer kaynaklardan aldığım bilgileri ana metin ve referanslarda eksiksiz gösterdiğimi, araştırma verilerine ve sonuçlarına ilişkin çarpıtma ve/veya sahtecilik yapmadığımı, çalışmam süresince bilimsel araştırma ve etik ilkelerine uygun davrandığımı beyan ederim. Beyanımın aksinin ispatı halinde her türlü yasal sonucu kabul ederim.

Şener ÇİNTESUN

İmza

Bu çalışma Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK) tarafından 220S443 numaralı proje kapsamında 1002 hızlı destek programı ile desteklenmiştir.

Sevgili anne ve babama,

TEŞEKKÜR

Lisans ve yüksek lisans eğitimim süresince bilgi birikimini ve desteğini esirgemeyen danışman hocam Prof. Dr. İsmail Kocaçalışkan'a, tez çalışmaları esnasında rehberlik eden eş danışman hocam Doç. Dr. Banu Mansuroğlu'na, çalışmanın hemen hemen tüm basamaklarında bilgisi ve deneyimleriyle yol gösteren hocam Prof. Dr. Abdürrahim Koçyiğit'e, laboratuvarda çalışmayı gerçekleştirirken özverili yardımlarından ötürü Arş. Gör. Zeynep Özman'a, okulda geçirdiğim vaktin büyük kısmını beraber harcadığım mesai arkadaşlarıma, bu günlere gelmemde büyük emekleri olan değerli aileme ve bu süreçte manevi desteğiyle yanımda olan eşim Elif Ede Çintesun'a teşekkür ederim.

Şener ÇİNTESUN

İÇİNDEKİLER

KISALTMA LİSTESİ ix

ŞEKİL LİSTESİ xi

TABLO LİSTESİ xiii

ÖZET xiv

ABSTRACT xvi

1 GİRİŞ 1

1.1 Literatür Özeti 1
1.2 Tezin Amacı 3
1.3 Hipotez 3

2 GENEL BİLGİLER 4

2.1 Serotonin 4
2.1.1 Serotonin Reseptörleri 6
2.1.2 Merkezi Sinir Sisteminde Serotonin 6
2.2 Dopamin 8
2.3 Ceviz Bitkisi 13
2.3.1 Cevizin Antioksidan Özelliği 15
2.3.2 Cevizin Nörokoruyucu Etkisi 15
2.4 Juglon 17
2.4.1 Juglonun Antioksidan Özelliği 18
2.4.2 Juglonun Nörokoruyucu Etkisi 18

3 MATERYAL METOD 19

3.1 Materyal 19
3.1.1 Bitkisel Materyaller 19
3.1.2 Deney Hayvanları 19
3.1.3 Cihazlar 19
3.1.4 Sarf Malzemeler 20
3.1.5 Kimyasallar ve Kitler 21

3.2 Metod 22
3.2.1 Cevizin Juglon İçeriğinin Belirlenmesi 22
3.2.1.1 Örneğin Hazırlanması 22
3.2.1.2 Juglon Standartının Hazırlanması 22
3.2.1.3 HPLC Koşulları ve Analizi 23
3.2.2 Ceviz Ekstraktının Hazırlanması 23
3.2.3 Ceviz Ekstraktının Total Fenolik, Flavanoid ve Antioksidan İçeriğinin Belirlenmesi 23
3.2.3.1 Total Fenolik İçeriğin Belirlenmesi 23
3.2.3.2 Total Flavonoid İçeriğin Belirlenmesi 24
3.2.3.3 Total Antioksidan İçeriğin Belirlenmesi 24
3.2.4 Hücre Kültürü Çalışmaları 24
3.2.4.1 Sitotoksisite Analizi 25
3.2.4.2 ROS Üretiminin Ölçülmesi 25
3.2.5 Deney Hayvanları Çalışmaları 26
3.2.5.1 Ceviz Ekstraktı ve Juglon Çözeltilerinin Hazırlanması 27
3.2.5.2 Çalışmanın Sonlandırılması ve Örneklerin Toplanması 28
3.2.6 Doku Homojenatlarının Hazırlanması 28
3.2.7 Dokuların Total Protein Konsantrasyonunun Belirlenmesi 28
3.2.8 Biyokimyasal Kan Parametrelerinin Ölçümü 29
3.2.9 Serum ve Beyin Dokusu Serotonin Miktarının Ölçümü 29
3.2.10 Serum ve Beyin Dokusu Dopamin Miktarının Ölçümü 30
3.2.11 Total Oksidan Seviyesi Ölçümü 30
3.2.12 Total Antioksidan Seviyesi Ölçümü 31
3.2.13 İstatistiksel Analiz 31

4 SONUÇ VE ÖNERİLER **32**
4.1 HPLC Analizi 32
4.2 Total Fenolik İçerik Seviyesi 33
4.3 Total Flavonoid İçerik Seviyesi 33
4.4 Total Antioksidan İçerik Seviyesi 34
4.5 ATP Canlılık Testi Sonuçları 34
4.6 ROS Düzeyleri 37
4.7 Doku Total Protein Düzeyleri 39
4.8 Biyokimyasal Kan Parametreleri 40
4.9 Serum ve Beyin Serotonin Düzeyleri 41
4.10 Serum ve Beyin Dopamin Düzeyleri 42
4.11 Total Oksidan Seviye 44
4.12 Total Antioksidan Seviye 45

4.13 Oksidatif Stres İndeksi 45
4.14 Tartışma ve Öneriler 49

KAYNAKÇA **55**

A EKLER **68**

TEZDEN ÜRETİLMİŞ YAYINLAR **69**

KISALTMA LİSTESİ

5-HT	5-Hidroksitriptamin
5-HTP	5-Hidroksi-L-Triptofan
5-HTT	5-Hidroksitriptamin Transport
ALT	Alanin Aminotransferaz
AST	Aspartat Transaminaz
ATP	Adenozin Trifosfat
BHT	Bütil Hidroksi Toluen
BSA	Bovin Serum Albumin
COMT	Katekol-O-metiltransferaz
DOPAC	3,4 dihidroksifenilasetik asit
DOPAL	3,4-dihidroksifenilasetaldehid
DOPET	3,4-dihidroksifeniletanol
EDTA	Etilendiamin tetraasetik asit
H_2DCF-DA	Dihidrodiklorofloresin diasetat
HVA	Homovanilik asit
HPA	Hipotalamus-hipofiz-adrenal
IDO	İndolamin 2,3-dioksigenaz
L-DOPA	3,4-dihidroksi-L-fenilalanin
MOA	Monoamin Oksidaz
OSI	Oksidatif stres indeksi
PBS	Steril fosfat tamponu
PIN1	Peptidil prolil izomeraz 1
ROS	Reaktif oksijen türleri

SN	Substantia nigra
SOD	Süperoksit dismutaz
TAS	Total antioksidan seviyesi
TOS	Total oksidan seviyesi
TPH	Triptofan hidroksilaz
VMAT 2	Veziküler monoamin taşıyıcı 2
VTA	Ventral tegmental alan

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1 Serotonin sentez reaksiyonu 4
Şekil 2.2 Merkezi sinir sisteminde serotonin sinyal iletimi ve geri alım mekanizması 6
Şekil 2.3 Kinürenin yolağı 8
Şekil 2.4 Dopamin sentezi 9
Şekil 2.5 Dopamin sinyal iletimi ve geri alım mekanizmaları 10
Şekil 2.6 Beyindeki dopamin yolakları 11
Şekil 2.7 Cevizin nörokoruyucu etkisi 16
Şekil 2.8 Juglonun kimyasal yapısı 17
Şekil 3.1 Gavaj uygulaması 26
Şekil 3.2 Ceviz ekstraktı ve juglon çözeltilerinin homojenizasyonu 27
Şekil 4.1 Juglon standart kromotogramı 32
Şekil 4.2 Ceviz meyvesi juglon kromotogramı 32
Şekil 4.3 Fenolik bileşik standart eğrisi ve farklı konsantrasyonlarda ceviz ekstraktlarındaki absorbans değerleri 33
Şekil 4.4 Flavonoid bileşik standart eğrisi ve farklı konsantrasyonlardaki ceviz ekstraktlarının absorbans değerleri 33
Şekil 4.5 TAS standart eğrisi ve farklı konsantrasyonlarda ceviz ekstraktlarındaki R_2-R_1 absorbans değerleri 34
Şekil 4.6 Farklı konsantrasyonlardaki ceviz ekstraktlarının 24 saatteki ATP canlılık grafiği 35
Şekil 4.7 Farklı konsantrasyonlardaki ceviz ekstraktlarının 48 saatteki ATP canlılık grafiği 35
Şekil 4.8 24 ve 48 saat ceviz ekstraktı uygulanmış hücrelerdeki canlılık 36
Şekil 4.9 Juglonun 24 saatteki ATP canlılık grafiği 36
Şekil 4.10 Juglonun 48 saatteki ATP canlılık grafiği 36
Şekil 4.11 24 ve 48 saat juglon uygulanan hücrelerdeki canlılık 37
Şekil 4.12 Ceviz ekstraktının L929 hücrelerinde ROS'a etkisi 38
Şekil 4.13 24 ve 48 saat ceviz ekstraktı uygulanan hücrelerdeki ROS düzeyleri 38
Şekil 4.14 Juglonun L929 hücrelerinde ROS'a etkisi 39
Şekil 4.15 24 ve 48 saat juglon uygulanan hücrelerdeki ROS düzeyleri 39

Şekil 4.16 Serum serotonin seviyeleri 41
Şekil 4.17 Beyin serotonin düzeyleri 42
Şekil 4.18 Serum dopamin seviyeleri 42
Şekil 4.19 Beyin dopamin seviyeleri 43
Şekil 4.20 Serum TOS seviyeleri 44
Şekil 4.21 Beyin TOS seviyeleri 44
Şekil 4.22 Karaciğer TOS seviyeleri 45
Şekil 4.23 Serum TAS seviyeleri 46
Şekil 4.24 Beyin TAS seviyeleri 46
Şekil 4.25 Karaciğer TAS seviyeleri 47
Şekil 4.26 Serum TOS/TAS oranları 48
Şekil 4.27 Beyin dokusu TOS/TAS oranları 48
Şekil 4.28 Karaciğer dokusu TOS/TAS oranları 49

TABLO LİSTESİ

Tablo 2.1 Cevizin besin ögesi kompozisyonu 14
Tablo 2.2 Juglonun imyasal özellikleri 17
Tablo 3.1 Serotonin standart dilüsyonları 29
Tablo 3.2 Dopamin standart dilüsyonları 30
Tablo 4.1 Beyin dokusu protein miktarları 40
Tablo 4.2 Karaciğer dokusu protein miktarları 40
Tablo 4.3 Biyokimyasal kan parametreleri 40
Tablo 4.4 Serum ile beyin dokusu serotonin ve dopamin seviyeleri 43
Tablo 4.5 Serum ve dokuların TAS ile TOS seviyeleri 47

ÖZET

Juglon ve Ceviz Ekstraktının Ratlarda Serotonin ve Dopamin Nörotransmitterleri Üzerine Etkileri

Şener ÇİNTESUN

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı
Yüksek Lisans Tezi

Danışman: Prof. Dr. İsmail KOCAÇALIŞKAN
Eş-Danışman: Doç. Dr. Banu Mansuroğlu

5-hidroksitriptamin,5-HT (serotonin) ve 3,4-dihisroksifenetilamin (dopamin) merkezi ve çevresel sinir sisteminde önemli fonksiyonları bulunan nörotransmitterlerdir. Merkezi sinir sisteminde serotonin metabolizması genellikle duygu durum bozuklukları, depresyon ve anksiyete gibi mental rahatsızlıklarla ilişkilendirilmiştir. Dopamin metabolizmasının ise ödül algısı, anhedoni ve motivasyon gibi mental süreçlerin yanısıra nörodejeneratif hastalıkların etiyolojisiyle de bağlantılı olduğu anlaşılmıştır.

Bu çalışmada ceviz *(Juglans regia L.)* meyvesinin etanolik ekstraktı ile cevizde doğal olarak bulunan ve onun allelopatik etkisinden sorumlu olan 5-hidroksi-1,4 naftakinon (juglon)'un ratlarda serotonin ve dopamin seviyeleri üzerine etkileri araştırıldı. Bu doğrultuda çalışmanın *in vitro* safhasında ceviz ekstraktının juglon içerik analizi ve karakterizasyonu gerçekleştirildi. Ceviz ekstraktı ve juglonun sitotoksik dozları ve reaktif oksijen türleri (ROS) üretimine etkisi belirlendi. *In vivo* çalışmalarda ise ratlara gavaj ile farklı konsantrasyonlarda juglon ve ceviz ekstraktı uygulaması yapıldı. Çalışmanın sonunda serum ve beyin dokusu serotonin ve dopamin seviyeleri ölçüldü. Serum, beyin ve karaciğerdeki total oksidan seviye (TOS) ve total antioksidan seviye (TAS) belirlendi. Elde edilen TOS değerleri TAS değerlerine bölünerek Oksidatif stres İndeksi (OSI) hesaplandı.

In vitro çalışmalarda ceviz ekstraktı ve juglonun düşük dozlarında sitotoksisite ve ROS üretiminin yüksek dozlara kıyasla daha az olduğu saptandı. Fare fibroblast hücre

soyları (L929) üzerinde ceviz ekstraktının IC_{50} dozu 24 saatte 2,871 mg/ml, 48 saatte 1,170 mg/ml ölçülürken juglonun IC_{50} dozu 24 saatte 27,25 μM, 48 saatte ise 7,901 μM olarak bulundu.

In vivo çalışmalarda rat serum ve beyninde gruplar arasında serotonin seviyesine ilişkin istatistiksel anlamlı bir fark tespit edilemedi. Serumdaki dopamin seviyeleri ceviz ekstraktı ve yüksek dozda juglon uygulanan grupta kontrol grubuna kıyasla bir miktar daha yüksek olsa da anlamlı bir fark belirlenemedi. Beyin dopamin seviyesi ise ceviz ekstraktı ve yüksek dozda juglon uygulanan gruplarda kontrole kıyasla önemli ölçüde yüksek bulundu.

OSI değerleri karşılaştırıldığında serumda kontrol grubunda OSI'nin diğer gruplara kıyasla daha düşük olduğu ancak beyin ve karaciğerde OSI'nin ceviz ekstraktı ve juglon uygulanan gruplarda kontrol grubuna kıyasla düşük olduğu belirlendi.

Elde edilen verilerden hareketle ceviz ekstraktı ve juglon uygulanan ratlarda beyinde dopamin miktarının önemli ölçüde yükseldiği ve oksidatif stresin azaldığı saptandı.

Anahtar Kelimeler: Ceviz ekstraktı, Dopamin, *Juglans regia L.*, Juglon, Serotonin, Total antioksidan seviye, Total oksidan seviye

ABSTRACT

Effects of Juglone and Walnut Extract on Serotonin and Dopamine Neurotransmitters in Rats

Şener ÇİNTESUN

Department of Molecular Biology and Genetics
Master of Science Thesis

Advisor: Prof. Dr. İsmail Kocaçalışkan
Co-advisor: Assoc. Prof. Dr. Banu Mansuroğlu

5-hydroxytryptamine, 5-HT (serotonin) and 3,4-dihydroxyphenethylamine (dopamine) are neurotransmitters with important functions in the central and peripheral nervous system. Serotonin metabolism in the central nervous system has often been associated with mental disorders such as mood disorders, depression and anxiety. It has been understood that dopamine metabolism is related to the etiology of neurodegenerative diseases as well as mental processes such as reward perception, anhedonia and motivation.

In this study, the effects of ethanolic extract of walnut *(Juglans regia L.)* fruit and 5-hydroxy-1,4 naphthoquinone (juglone), naturally found in walnuts and responsible for its allelopathic effect, on serotonin and dopamine levels in rats were investigated. For this purpose, juglone content analysis and characterization of walnut extract was carried out. In the *in vitro* phase of the study, the effects of walnut extract and juglone on cytotoxic doses and reactive oxygen species (ROS) production were determined. *In vivo*, different concentrations of juglone and walnut extract were applied to the rats by gavage. Subsequently, serum and brain tissue serotonin and dopamine levels were measured. Total oxidant status (TOS) and total antioxidant status (TAS) in serum, brain and liver were determined. Oxidative stress Index (OSI) was calculated by dividing the obtained TOS values by TAS values.

In vitro studies showed that, cytotoxicity and ROS production were found to be less at low doses of walnut extract and juglone compared to higher doses. The IC_{50} dose

of walnut extract on mouse fibroblast cells (L929 cell line) was 2.871 mg/ml in 24 hours and 1.170 mg/ml in 48 hours, while the IC_{50} dose of juglone was 27.25 μM in 24 hours and 7.901 μM in 48 hours.

In vivo studies showed that, no statistically significant difference in serotonin levels was detected between the groups in rat serum and brain. Although dopamine levels in the serum were slightly higher in the walnut extract and high-dose juglone administered group compared to the control group, no significant difference could be detected. Brain dopamine levels were found significantly higher in the walnut extract and high dose juglone groups compared to the control group.

When the OSI values were compared, it was determined that the OSI in the serum was lower in the control group compared to the other groups, but the OSI in the brain and liver were lower in the walnut extract and juglone applied groups compared to the control group

Based on the data obtained, it was determined that the amount of dopamine in the brain increased significantly and oxidative stress decreased in rats treated with walnut extract and juglone.

Keywords: Dopamine, Walnut extract, *Juglans regia L.*, Juglone, Serotonin, Total oxidant status, Total antioxidant status

1
GİRİŞ

1.1 Literatür Özeti

Serotonin ve dopamin merkezi sinir sisteminde birçok görevi bulunan önemli nörotransmitterlerdir. Serotonin merkezi sinir sistemi ve gastrointestinal sistemde bulunur. Sosyal davranışları, duygu durumunu, uykuyu, iştahı, hafızayı ve sindirimi düzenler. Serotoninin eksikliği depresyon ve anksiyete ile ilişkilendirilmiştir. Dopamin ise bir diğer önemli nörotransmitterdir ve hareket, hafıza, kavrama, dikkat, zevk ve ödül algısından sorumludur. Serotonin ve dopaminin oldukça benzer fonksiyonları olabilmektedir [1]. Serotoninin yanı sıra dopaminin de depresyon ve duygu dalgalanmalarıyla ilişkili olduğunu anlaşılmıştır [2].

2017 yılında yapılan bir çalışmaya göre dünyada yaklaşık 792 milyon insan mental bir hastalıktan muzdariptir. Bu sayı toplam dünya nüfusunun %10,7'sine eşittir. Depresyon %3,4; anksiyete bozukluğu ise ortalama %3,8 ile bu hastalıklar arasında önemli bir yer tutar. Yine aynı çalışmaya göre ülkemizde nüfusun %3,72'sinde depresyon görülürken %3,91'inde anksiyete bozukluğu bulunmaktadır [3]. 2013 yılında T.C. Sağlık Bakanlığı ve TÜİK verilerinden yola çıkarak hazırlanan bir raporda ülkemizde 2003 yılında 14,24 milyon kutu antidepresan kullanılırken 2012 yılında bu sayı %162 artarak 37,35 milyon kutu olmuştur [4]. Amerika'da yıllık ortalama 238,3 milyar dolar depresyon hastalığının tedavisine harcanmaktadır [5].

Günümüzde depresyon tedavisinde seçici serotonin geri alım inhibitörleri (SSRI) ve serotonin norepinefrin geri alım inhibitörleri kullanılmaktadır. Ancak bu tür birinci basamak antidepresanlar bile zayıf tepki, yavaş etki başlangıcı, zayıf tolere edilebilirlik ve kalıcı yan etkilere sahiptir [6]. Bu nedenle depresyon tedavisinde alternatif antidepresanlara ihtiyaç vardır. Bugüne kadar birçok bitkisel kaynaklı molekülün antidepresan özelliği araştırılmıştır. Bitkilerden elde edilen saponinler [7], alkoloidler [8][9], polifenoller [10], triterpenoidler [11], esansiyel yağlar [12], yağ asitleri [13] ve flavanoidlerin [14] antidepresan benzeri etkisi gösterilmiştir.

Ceviz bitkisi *Juglandales* takımının *Juglandaceae* familyasından, *Juglans* cinsine mensuptur. 10–25 m yüksekliğinde, oldukça geniş taçlı ve gevşek dallı bir ağaçtır. Ceviz bitkisi E vitamini, folat, melatonin, birçok antioksidan fenolik bileşik ve yüksek düzeyde omega-3 yağ asitleri içermektedir [15]. Cevizin zengin içeriği dolayısıyla depresyon ve zihin sağlığı üzerinde olumlu etkileri bulunduğu ileri sürülmektedir [16]. Amerikada yapılan bir çalışmada ceviz tüketen bireylerin tüketmeyenlere oranla depresyon skorlarının %26 daha az olduğu sonucuna ulaşılmıştır [17]. Sánchez-Villegas ve arkadaşlarının 2013 yılında yaptığı bir araştırmada cevizle zenginleştirilmiş Akdeniz diyeti uygulayan kişilerin kontrol grubuna göre %20-%30 arası düşük depresyon riskine sahip olduğu anlaşılmıştır [18]. Yine başka bir çalışmada diyetlerinde ceviz bulunduran Alzheimer'lı farelerin kontrol grubuna göre ROS'un, lipid peroksidasyonunun, protein oksidasyonun azaldığı, antioksidan kapasiteye sahip enzimlerinin aktivitesinin arttırdığı görülmüştür [19].

Cevizde yukarıda bahsedilen moleküllerin yanında sadece ceviz türlerinde bulunan ve antioksidan özellik gösteren, fenolik yapıda juglon bileşiği bulunmaktadır [20]. Juglon, ceviz (Junglans regia) ve kara ceviz (Junglans nigra) gibi ceviz türlerinin kök, yaprak ve meyvesinde doğal olarak bulunan bir kimyasaldır [21]. Juglon bitkiler arası kök kontağıyla, yapraklardan yağmurla yıkanarak veya yaprakların toprakta çürümesiyle toprağa salınır [22].

Juglon bazı canlı dokularda yüksek konsantrasyonlarda büyüme, fotosentez ve solunumu baskılayabildiği ancak bunun yanında çok güçlü antimikrobiyal, antifungal, antiparazitik ve anti tümör etkilere de sahip olduğu gösterilmiştir [20]. Juglon güçlü fenolik karakteriyle metabolizmanın zararlı yan ürünleri olan ROS'u inhibe edebildiği belirtilmiştir [23][24][25].

Juglonun şimdiye dek antioksidan [26], antikanser [27][28] ve antimikrobiyal [29][30][31] gibi birçok etkinliği üzerine araştırmalar yapılmıştır. Ancak yapılan literatür taramasında juglon ve ceviz ekstraktının, serotonin ve dopamin üzerinde doza bağlı değişen etkisine dair bir çalışma tespit edilememiştir. Juglonun düşük konsantrasyonlarda gösterdiği güçlü antioksidan özellik, serbest radikal birikimine neden olan Pin1 enzimini baskılaması ve ROS'ları etkisiz hale getirmesi onun oksidatif strese karşı oldukça hassas olan nörotransmitterler [32] için güçlü bir koruyucu olabileceğini düşündürmektedir.

Bu çalışma juglonun doza bağlı etki değişimlerini tespit ederek, onu depresyon ve zihin sağlığı üzerinde olumlu etkileri olduğu ileri sürülen cevizle [17][19] karşılaştıracak ve literatürde bu yönde bulunan boşluğu doldurmaya çalışacaktır. Juglonun bu nörotransmitterler üzerinde doza bağlı veya ceviz ekstraktı ile birlikte

kombine biçiminde uygulanışının olumlu etkisi tespit edildiğinde juglon gibi sekonder metabolitler ile ilgili daha ileri çalışmalara model teşkil edebileceği öngörülmektedir.

1.2 Tezin Amacı

Sunulan tezin amacı; ceviz bitkisinde doğal olarak bulunan juglonun ve ceviz ekstraktının beyin sağlığı üzerinde önemli etkileri olan serotonin ve dopamin seviyeleri üzerine olan etkisinin araştırılmasıdır. Bu doğrultuda yapılacak *in vitro* çalışmalarda; juglon ve ceviz ekstraktının IC_{50} ve sitotoksik olmayan güvenli dozlarının tespit edilmesi ve bu maddelerin farklı konsantrasyonları ile hücrelerin ROS üretimi arasındaki ilişkinin belirlenmesi hedeflenmektedir. *In vivo* çalışmalarda ratlarda juglon ve ceviz ekstraktının farklı konsantrasyonlarının kan ve beyin serotonin ve dopamin seviyeleri üzerine etkilerinin belirlenmesi, serum,beyin ve karaciğer dokularında TOS ve TAS'ın belirlenmesi, karaciğer ve böbrek fonksiyon testi ile juglonun karaciğer ve böbrek metabolizmaları üzerindeki etkilerinin saptanması hedeflenmektedir.

1.3 Hipotez

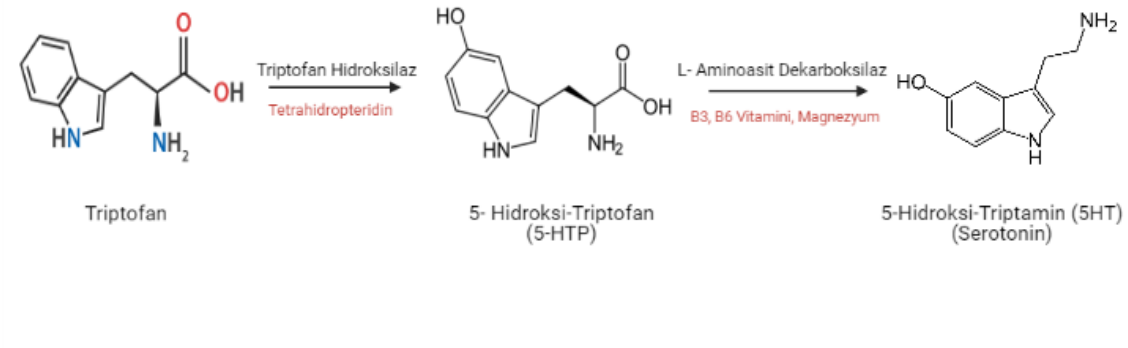
Mental ve nörodejeneratif hastalıkların prevelansının giderek arttığı günümüzde bu hastalıkların etiyolojisinde etkili iki kimyasal olan serotonin ve dopamin seviyelerini arttırmaya veya korumaya yönelik alternatif çalışmalar önem kazanmıştır. Juglonun şimdiye dek antioksidan [26], antikanser [27][28] ve antimikrobiyal [29][30][31] gibi birçok etkinliği üzerine araştırmalar yapılmıştır. Ancak yapılan literatür taramasında juglon ve ceviz ekstraktının, serotonin ve dopamin üzerinde doza bağlı değişen etkisine dair bir çalışma tespit edilememiştir. Juglonun düşük konsantrasyonlarda gösterdiği güçlü antioksidan özellik, serbest radikal birikimine neden olan peptidil prolil izomeraz 1 (Pin1) enzimini baskılaması ve ROS'ları etkisiz hale getirmesi onu oksidatif strese karşı oldukça hassas olan serotonin ve dopamin [32] nörotransmitterleri için güçlü bir koruyucu yapabilir. Bu çalışma juglonun doza bağlı etki değişimlerini tespit ederek, onu depresyon ve zihin sağlığı üzerinde olumlu etkileri olduğu ileri sürülen cevizle [17][19] karşılaştıracak ve literatürde bu yönde bulunan boşluğu doldurmaya çalışacaktır. Juglonun bu nörotransmitterler üzerinde doza bağlı veya ceviz ekstraktı ile birlikte kombine biçiminde uygulanışının olumlu etkisi tespit edildiğinde juglon gibi sekonder metabolitler ile ilgili daha ileri çalışmalara model teşkil edebileceği öngörülmektedir.

2
GENEL BİLGİLER

2.1 Serotonin

5-HT veya serotonin ilk olarak 1948 yılında Rapport ve arkadaşları tarafından hipertansiyona neden olan vazokonstriktörleri araştırılırken önce kanda trombositlerde daha sonra merkezi sinir sisteminde keşfedilmiştir. Keşfedilen bu yeni molekül serumda bulunmasından ötürü -sero ve vazoaktif (damar genişletip daraltabilme) etkisinden dolayı -tonin kelimelerinin birleşimi olacak şekilde serotonin olarak adlandırılmıştır [33].

Serotonin insan vücudunda doğal olarak bulunan esansiyel bir aminoasit olan triptofandan bir dizi reaksiyon ile sentezlenir. İlk olarak L-triptofan, triptofan hidroksilaz enzimi ile 5- hidroksi-L-triptofana (5-HTP) hidroksilenir. Reaksiyonun gerçekleşebilmesi için ortamda oksijen ve tetrahidropteridin bulunması gereklidir. Reaksiyonun bu adımı serotonin sentezinin hız sınırlayıcı basamağını oluşturur [34]. İkinci basamakta 5- HTP, L- amino asit dekarboksilaz enzimi yardımıyla 5-HT'ye dönüşür (Şekil 2.1). Bu basamakta B3 vitamini, B6 vitamini koenzim, magnezyum kofaktör olarak görev yapar [35].

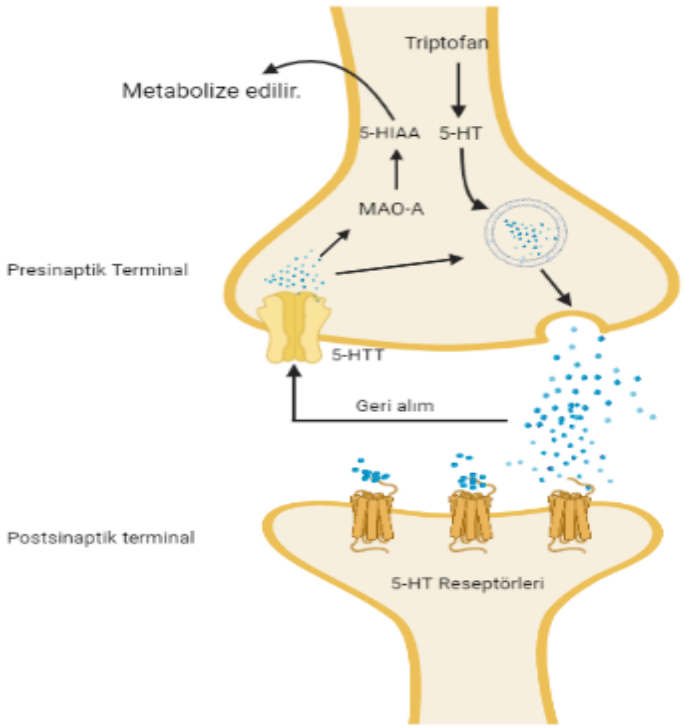


Şekil 2.1 Serotonin sentez reaksiyonu

Serotonin vücutta hem hormon hem de nörotransmitter görevlerini yapabilen

çok yönlü bir moleküldür. Vücut serotoninin %2'si merkezi sinir sisteminde nörotransmitter olarak görev yaparken büyük çoğunluğu periferal serotonin olarak çeşitli mekanizmaların düzenlenmesinde rol oynar [36]. Periferal serotoninin yaklaşık %95'i gastrointerstinal kanalda bulunan enterokromafin hücreleri tarafından sentezlenir ve burada depolanır. Dolaşım sistemine verilmek istenen serotonin enterokromafin hücrelerinden salgılanır. 5-HT transporter veya serotonin transporter da denilen bir protein aracılığıyla salgılanan serotonin trombositlere taşınır. Trombositlerde yoğun granüller şeklinde depo edilen serotonin dolaşım sistemindeki toplam serotoninin büyük kısmına karşılık gelmektedir [34]. Serotonin kardiyovasküler sistemde önemli görevleri olan düzenleyici bir nörohormondur. Trombosit agregasyonunun düzenlenmesinde, vasküler direncin ve kan basıncının kontrol edilmesinde, homeostazın sağlanmasında ve kan damarlarının genişleyip daralmasında etkin bir rol üstlenmektedir [37]. Serotonin sinyali değiştiğinde veya konsantrasyonunda herhangi bir değişiklik meydana geldiğinde kardiyovasküler disfonksiyon gözlemlenmiştir. Periferik serotoninin üretimi durduğunda trombositlerdeki serotonin düzeyinin önemli ölçüde azaldığı ve bunun sonucunda kalp yetmezliğine yol açabileceği gösterilmiştir [38]. 2007 yılında yapılan bir çalışmada serotoninin kalbin çalışma temposunu düzenlediğini ancak belirli miktarın üstünde kalp ritminde bozulmalar yaratabileceği bildirilmiştir [39].

Merkezi sinir sisteminde serotonin sentezi ise burada bulunan toplam nöronların yalnızca milyonda birini oluşturan ve büyük çoğunluğu beyin sapının orta hattında bulunan raphe çekirdeğindeki serotonerjik nöronlar tarafından sentezlenir. Üretilen serotonin salgı granüllerinde depolanır ve serotonerjik nöronlar tarafından sinapslara salınır. Salgılanan serotonin bir diğer postsinaptik nöronda bulanan 5-HT reseptörleri tarafından algılanır ve işlevini yerine getirir. Serotonin salınımını gerçekleştiren presinaptik nöron, sinaptik boşluktaki görevini tamamlayan serotonini akson membranında bulunan 5-HTT proteini aracılığıyla geri alır [40][34]. Geri alım süreci sürekli devam eden aktif bir süreçtir, bu yolla üretilen serotonin verimli bir şekilde kullanılması sağlanmaktadır. Bu süreçten sonra geri kazanılan serotoninin bir kısmı salgı granüllerinde tekrar kullanılmak üzere depolanırken bir kısmı ise önce monoamin oksidaz enzimiyle 5-hidroksiindol asetaldehite daha sonra aldehit dehidrogenaz enzmiyle 5- hidroksiindol asetik asite metabolize edilir. 5-hidroksiindol asetik asit beyin-omurilik sıvısına geçer, buradan kana ve son olarak da idrarla vücuttan dışarı atılır [41] (Şekil 2.2).



Şekil 2.2 Merkezi sinir sisteminde serotonin sinyal iletimi ve geri alım mekanizması

2.1.1 Serotonin Reseptörleri

Serotonin reseptörleri serotonin salımını düzenleyerek birçok biyolojik süreçte önemli görevler yapar. İlk olarak 1957 yılında Gaddum ve Picarelli tarafından birden fazla türde 5-HT reseptörü bulunduğu ileri sürülmüştür [42]. Daha sonra yapılan çeşitli çalışmalarda 7 reseptör ailesine ait 14 farklı alt tip reseptör tanımlanmıştır. Bunlar 5-HT1 (5-HT1A, 5-HT1B, 5-HT1D, 5-HT1E, 5-HT1F), 5-HT2 (5-HT2A, 5-HT2B, 5-HT2C), 5-HT3, 5-HT4, 5-HT5(5-HT5A, 5-HT5B), 5-HT6 ve 5-HT7 şeklinde tanımlanmıştır [43]. 5-HT3 reseptörleri hariç bilinen tüm reseptörler 7 transmembran G proteinine bağlı reseptörlerdir ve hücre içinde siklin adenozin monofosfat (cAMP) gibi ikincil mesajcı molekülleri aktif ederler. 5-HT3 reseptörleri ise ligand kapılı iyon kanallarıdır [44].

2.1.2 Merkezi Sinir Sisteminde Serotonin

Vücuttaki toplam serotoninin çok az kısmı merkezi sinir sisteminde bulunmasına karşın buradaki işlevi birçok süreçle ilişkilendirilmiştir. Beyindeki hemen hemen her hücre serotonerjik liflere yakındır. Bu yakınlık yardımıyla birçok davranış ve beyin işlevleri serotonin tarafından regüle edilir. Ruh hali, algı, ödül, iştah, saldırganlık, öfke, hafıza, cinsellik ve dikkat toplama süreçleri gibi davranışsal

durumlar serotoninin başlıca rol aldığı durumlardır. Bunun yanında serotoninin; motor kontrol, beyincik, uyku ve sirkadiyen ritim, merkezi sinir sistemi vasküler tonusu, kusma, solunum güdüsü ve vücut ısısı dengede tutulması gibi merkezi sinir sisteminin sorumluluğunda olan mekanizmaları düzenlemede aktif rol oynar [40].

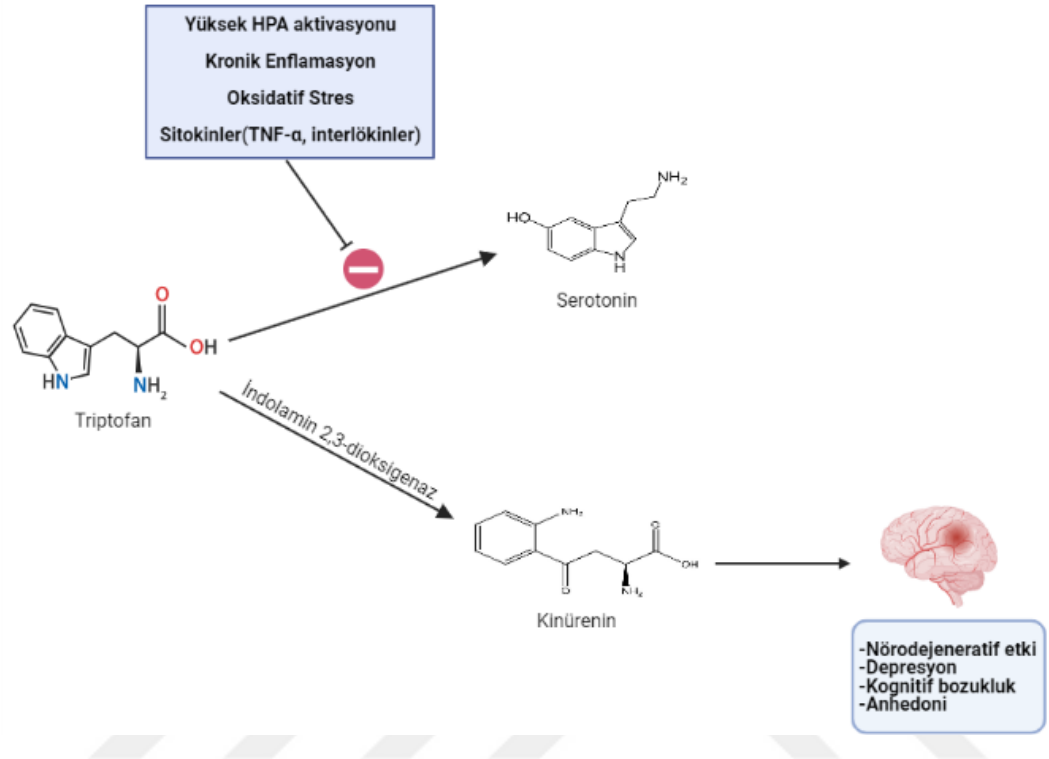
Serotoninin depresyon ve duygu durumu ile ilişkili olabileceği ilk olarak monoamin hipoteziyle 1965 yılında ileri sürülmüştür. Bu hipotez depresyonun altında yatan biyolojik temelin, beyinde serotonin, dopamin ve norepinefrin gibi monoaminlerin eksikliklerinden kaynaklı olduğunu iddia etmektedir [45].

Bu bağlamda yapılan çalışmalarda majör depresyonu olan kişilerde kontrol grubuna kıyasla önemli ölçüde daha az plazma triptofan seviyesi bulunduğu rapor edilmiştir [46]. Bir diğer çalışmada insanlarda beyindeki triptofan seviyesi azaldığında dolayısıyla serotonin seviyesi azalmış ve saatler içersininde depresyonun tetiklendiği görülmüştür [47]. Serotonin ile anksiyete ve benzeri davranışların ilişkisini araştıran bir başka çalışmada 5-HT1A reseptörü nakavt edilmiş farelerin yeni ortamlara adapte olmakta zorlandığı ve stres oluşturabilecek durumlardan kaçındığı görülmüştür [48].

Beyinde serotonerjik sistemin düzensizliği şiddet ve saldırgan davranışların patofizyolojisinde de etkin rol alabileceği düşünülmektedir. 2002 yılında yapılan bir çalışmada farelerde sinaptik boşluktaki serotoninin geri alımından sorumlu 5-HTT geni nakavt edilmiştir. Bu grupta kontrol grubuna kıyasla saldırganlığın ve kafesteki aktivitenin azaldığı kayıt edilmiştir [49]. Bir başka çalışmada bir grup farede merkezi sinir sisteminde serotonin sentezinde görevli olan triptofan hidroksilaz 2(TPH2) enzimini kodlayan genin iki kopyası da susturularak beyindeki serotonin eksikliğinin davranışlar üzerindeki etkisi araştırılmıştır. $Tph2^{-}/^{-}$ grubundaki farelerde $Tph2^{+}/^{-}$ ve $Tph2^{+}/^{+}$ gruplarındaki farelere kıyasla beyinde serotoninin önemli ölçüde az olduğu gözlemlenmiştir. Depresyon benzeri davranışları test edebilmek amacıyla zorunlu yüzme testi yapılmıştır. Bu testte de $Tph2^{-}/^{-}$ grubundaki fareler diğer gruplara oranla daha az mücadele ederek depresyon benzeri davranışlar göstermiştir. Saldırgan davranış testi kapsamında izinsiz giriş testi yapılmıştır. $Tph2^{-}/^{-}$grubu farelerinin diğer gruplara kıyasla yedi kat daha saldırgan olduğu gözlemlenmiştir [50].

Merkezi sinir sisteminde serotonin eksikliği çeşitli durumlardan ötürü olabilir. Bu mekanizmalarda biri kinürenin yolağı kaynaklı serotonin eksikliğidir (Şekil 2.3). Hipotalamus-hipofiz-adrenal (HPA) aksın hiperaktivitesi ve bağışıklık sistemindeki düzensizlikler kinürenin yolağını indükler. Bu yolakta sağlıklı bir insanda serotonine metabolize olması gereken triptofan aminoasiti enflamatuar faktörler sebepli aktivitesi artmış olan indolamin 2,3-dioksigenaz (IDO) enzimiyle kinürenine metabolize

olur. Nörotoksik bir molekül olan kinürenin beyinde nörodejeneratif ve nörotoksik süreçlerin gelişme riskini arttırır. Bu yolakta IDO enzimi mevcut triptofan miktarını azalttığından serotonin miktarı da azalmış olur böylece bu yolak doğrudan depresyonla ilişkilendirilmiştir [51].



Şekil 2.3 Kinürenin yolağı

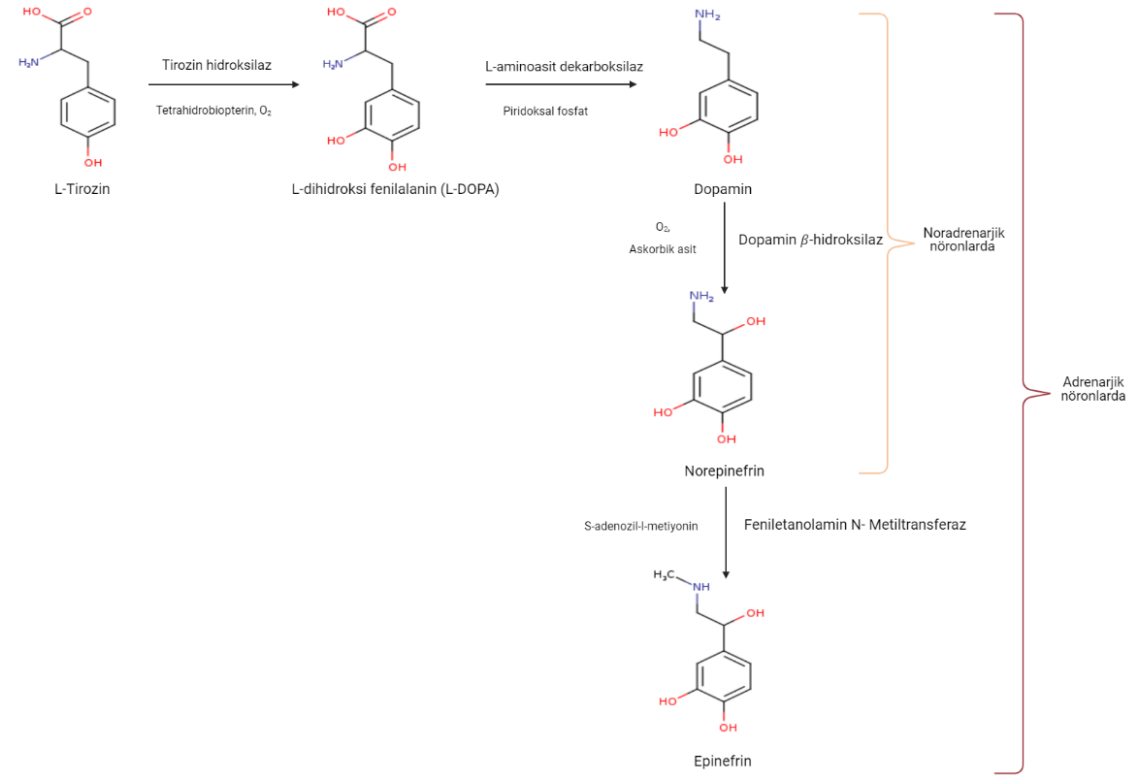
Oksidatif stres ROS aktivitesinin artmasıyla ortaya çıkan serotonin metabolizmasını etkileyebilen bir diğer durumdur. Toksik oksijen türlerinin oluşturulması ve ortadan kaldırılması arasındaki dengenin bozulmasından kaynaklanır. Bu dengenin ROS lehine bozulması canlı dokularda geri döndürülemez bozukluklar ve enflamatuar reaksiyonlar meydana gelmesine sebep olur. Beyin dokusu oksitatif hasara karşı oldukça hassastır [52]. Yapılan çalışmalar depresyonlu hastalarda serum TAS'ın, paraoksonaz enzimi miktarının ve antioksidan seviyelerinin kontrol gruplarına göre düşük, serum serbest radikallerinin ve oksidatif stres ürünlerinin yüksek olduğunu bildirmiştir [53][54].

2.2 Dopamin

Dopamin, beyindeki substantia nigra, ventral tegmental alan ve hipotalamusta üretilen bir nörotransmiterdir [55]. Dopaminin büyük çoğunluğu esansiyel olmayan bir aminoasit olan tirozinden sentezlenmektedir ancak L-fenilalanin karaciğerde ve dopaminerjik nöronlarda fenilalanin hidroksilaz tarafından tirozine dönüştürülür. Tirozin kan yoluyla beyne düşük afiniteli taşıma sistemiyle taşınır. Burada beyin

ekstraselüler sıvısından dopaminerjik nöronlara aktarılır. Biyosentez sitozolde iki adımda gerçekleşir. Birinci basamakta tirozin hidroksilaz enzimi tetrahidobiopterin, oksijen ve demiri kofaktör olarak kullanarak tirozini 3,4-dihidroksi-L-fenilalanine (L-DOPA) dönüştürür. Bu basamak reaksiyonun hız kısıtlayıcı basamağını meydana getirir. Daha sonra L-DOPA L-aminoasit dekarboksilaz (L-DOPA dekarboksilaz) enzimi tarafından piridoksal fosfat kofaktör olarak kullanılarak dopamine dönüştürülür [56].

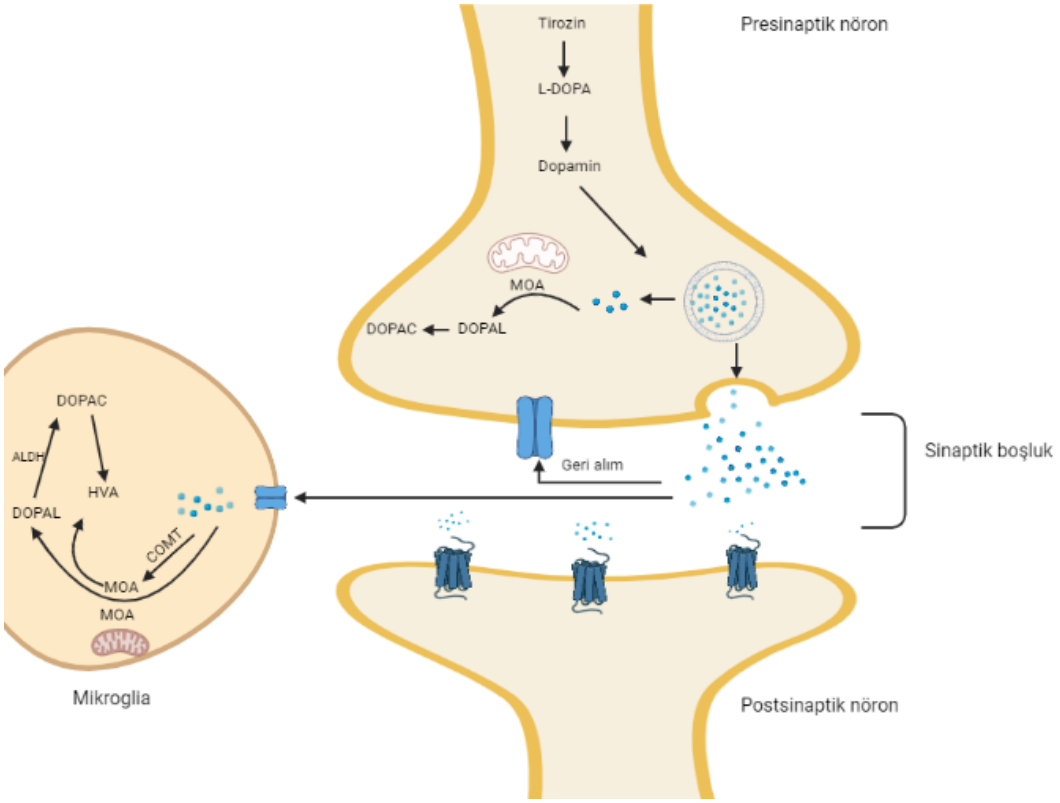
Noradrenarjik nöronlarda dopamin, dopamin hidroksilaz enzimiyle O_2 ve l-askorbik asit varlığında norepinefrinin biyosentezinde görev alır. Adrenarjik nöronlarda norepinefrin feniletanolamin N-metiltransferaz enzimiyle s-adenozil-l-metiyonin varlığında epinefrine dönüştürülür [57][58] (Şekil 2.4).



Şekil 2.4 Dopamin sentezi

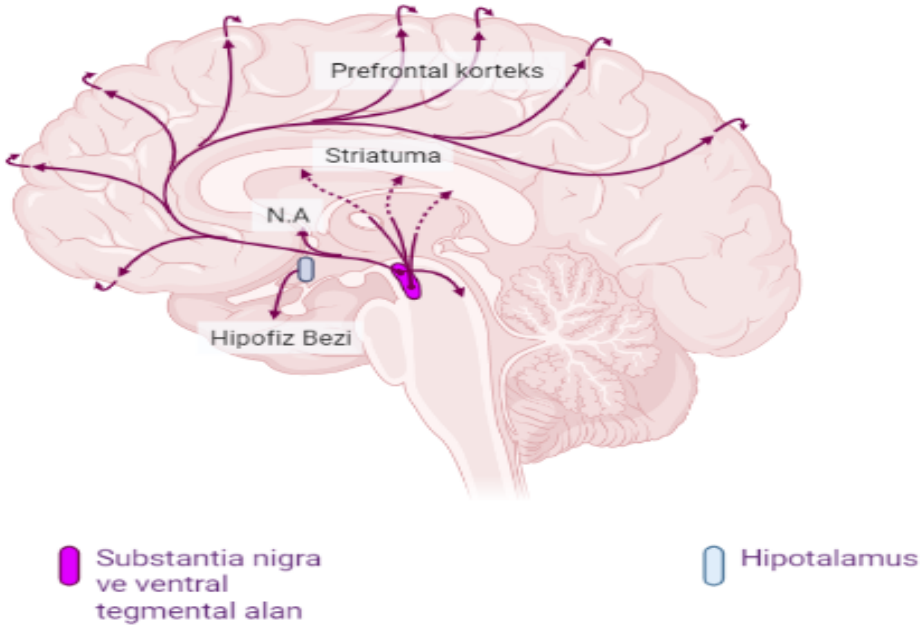
Dopamin sentezlendikten sonra veziküler monoamin taşıyıcı 2 (VMAT 2) proteini yardımıyla sinaptik veziküllerde depo edilir. Salgılanma sırasında bu veziküller ekzositozla hücre zarıyla birleşerek sinaptik boşluğa bırakılır. Dopaminin veziküllerde birikmesi sırasında sitozele sızan fazla dopamin monoamin oksidaz(MOA) degrade edilir. MOA'nın oksitatif deaminasyonu hidrojen peroksit ve reaktif 3,4-dihidroksifenilasetaldehid (DOPAL) üretir. Bu aldehit alkol dehidrojenaz enzimi ile 3,4- dihidroksifeniletanol (DOPET)'e indirgenerek veya aldehit dehidrojenaz enzimi ile 3,4 dihidroksifenilasetik aside (DOPAC)'a yükseltgenerek zararsız hale getirilir. Dopaminerjik nöronların uyarılmasıyla sinaptik veziküller sinaptik

boşluğa salınarak dopaminin sinyal iletimi yapması sağlanmaktadır. Sinyal iletimi gerçekleştikten sonra sinyalin durdurulması için sinaptik boşluktaki dopaminin geri alımı gereklidir. Dopamin sinyalinin durdurulması ya dopaminerjik nöron tarafından geri alımla ya da glia hücreleri tarafından degrade edilerek gerçekleştirilir. Glia hücrelerinde bulunan katekol-O-metiltransferaz (COMT) ve MOA enzimleri (MOA-A, MOA-B) tarafından degradasyon gerçekleştirilerek son ürün olarak homovanilik asit (HVA) sentezlenir [59] (Şekil 2.5).



Şekil 2.5 Dopamin sinyal iletimi ve geri alım mekanizmaları

Dopamin beyinde substantia nigra (SN), ventral tegmental alan (VTA) ve hipotalamusta üretilen bir nörotransmitterdir [55]. Merkezi sinir sisteminde dört temel dopaminerjik yolak bulunmaktadır. Bunlar; mezolimbik yolak, mezokortikal yolak, nigrostriatal yolak ve tuberoinfindubuler yolaktır. VTA mezolimbik ve mezokortikal yolağın kaynağıdır. Mezolimbik yolak VTA ile nükleus akümbens arasında gerçekleşir. Bu yolak ödül, haz duyuları ve istek ile ilişkilendirilmiştir. Mezokortikal yolak VTA'dan prefrontal kortekse uzanır ve bilişsel işlevlerle ilişkilendirilmiştir. Nigrostriatal yolak SN'den başlayarak dorsal striatuma uzanır [60]. Alışma, motor davranışlarının kontrolü, öğrenme kapasitesiyle ilişkilendirilmiştir [61]. Tuberoinfindubuler dopaminerjik yolak hipotalamusun arkuat çekirdeğinden hipofiz bezine uzanır ve burada prolaktin salınımının düzenlenmesinde etkin rol oynamaktadır [62] (Şekil 2.6).



Şekil 2.6 Beyindeki dopamin yolakları

Dopaminerjik sistem motor kontrol, ödül, motivasyon, bilişsel fonksiyonlar, duygu durum ve üreme gibi çeşitli davranışların nörolojik süreçlerin düzenlenmesinde önemli bir rol oynamaktadır. Dopamin hem merkezi sinir sisteminde hem de periferal sistemde sentezlenir. İşlevini hücre üzerinde bulunan G proteinine bağlanarak yerine getirir. Dopamin reseptörleri genellikle merkezi sinir sisteminde eksprese edilir ancak böbreklerde, kalpte ve retinada da bulunur. Reseptörlerin yapı ve farmakolojik özelliklerinden ötürü D1 benzeri reseptörler ve D2 benzeri reseptörler olarak iki grup altında incelenmektedir. D1 benzeri reseptörler D1 ve D5 reseptörleri olup genellikle striatum, nükleus akümbens, amigdala ve frontal kortekste bulunmaktadır. D2 benzeri reseptörler ise D2, D3 ve D4 reseptörleridir. Bunlar genellikle striatum, bazal ganglia, nükleus akümbens çekirdeği, VTA, hipotalamus, amigdala hipokampus ve hipofiz bezinde eksprese edilir. D1 ve D5 reseptörleri postsinaptik hücrelerde bulunurken D2 ve D3 reseptörleri hep postsinaptik hem de presinaptik hücrelerde bulunur [56].

Parkinson hastalığı yavaş bir şekilde ilerleyen bozuk motor fonksiyonları, yavaş hareketler, titreme, yürüme ve denge bozuklukları ile karakterize olmuş nörodejeneratif hastalıktır. Hastalığın patofizyolojisinde beynin SN bölgesinde dopamin üreten nöronların kaybının ve Lewy cismi denilen nöronlar arası -sinükleince zengin protein birikmelerinin etkili olduğu düşünülmektedir. Parkinsonun etiyolojisinde muhtemelen çok çeşitli faktörler rol alabilmektedir. Hastalığı durduracak veya ilerlemesini engelleyecek bir tedavi hali hazırda bulunmamaktadır.

Günümüzde uygulanan tedaviler bozulan motor fonksiyonlarını düzeltmeye yönelik semptomatik tedavilerdir. Dopamin öncü molekülü olan L-DOPA hastalar için kullanılan en yaygın başlangıç tedavisidir. L-DOPA'ya yanıt erken dönemde hastalığın ilerlemesinin durması ve dopamin depolanmasının azalması ile genellikle olumludur ancak motor fonksiyonda olan komplikasyonları azaltmaya yönelik başka dopaminerjik ilaçlar da uygulanabilmektedir. Bunlar MOA-B inhibitörleri, COMT inhibitörleri ve dopamin reseptör antagonistleri olabilmektedir [63].

Dopaminerjik sistemle yakından alakalı olduğu düşünülen bir diğer hastalık şizofrenidir. Şizofreni nüfusun yaklaşık %1'inde görülen şiddetli mental bir hastalıktır. Şizofreni semptomları genellikle geç ergenlik döneminde ortaya çıkmaktadır. Semptomlar pozitif, negatif ve bilişsel olarak üç başlık altında sınıflandırılmıştır. Pozitif semptomlar halüsinasyonlar, sanrılar ve şiddetli düşünce düzensizliği gibi belirtilerdir. Negatif semptomlar duygu körelmesi, konuşma ve düşünce yoksunluğu, sosyal ilgninin azalması ve motivasyon kaybı gibi durumlardır. Bilişsel semptomlar ise dikkat ve hafıza kaybı gibi hastalığın öne çıkan özellikleridir. Şizofreninin etiyoloji ve patofizyolojisi halen dahi tam olarak anlaşılmamış olsa da hastalıkla ile alakalı bulguların büyük kısmı çeşitli nörotransmitter sistemlerin düzensizliğinden kaynaklandığını göstermektedir. Bu sistemlerin arasında dopaminerjik sistem üzerinde en çok çalışma yapılmış alandır [64].

Şizofrenide dopamin hipotezi ilk olarak amfetamin ve benzer bileşiklerin uygulanmasının ardından ekstraselüler dopamin konsantrasyonunun arttığı bununla beraber şizofreniye benzer psikotik etkiler meydana geldiğini bildiren çalışmalarla ileri sürülmüştür [65]. Bu bulgular rezerpin, alfa-metil-p-tirozin gibi dopamin yoksunluğuna yol açacak ilaçların psikotik semptomları iyileştirilmesiyle desteklenmiştir [66][67]. Klinikte etkinlik sağlamış antipsikotik ilaçların yapısı incelendiğinde dopamin reseptörleriyle yüksek afiniteye sahip oldukları görülmüştür. Buradan yola çıkarak yapılan çalışmalarda şizofreni hastalarında sağlıklı kontrol grubuna kıyasla daha yüksek dopamin reseptör yoğunluğu olduğu gösterilmiştir [68][69].

Depresyon tarihsel olarak serotonin ve norepinefrinle ilişkilendirilmiştir ancak insanda ve depresyonlu hayvan modellerinde yapılan modern çalışmalar dopaminerjik sistemdeki düzensizlikler veya bozulmalar ile depresyon arasında bir bağ olabileceğini göstermiştir [70]. Depresyon ve majör depresif bozukluklarda sık görülen semptomlardan olan anhedoni ve motivasyonsuzluk daha çok dopaminerjik sistemdeki bozulmalarla ilişkilendirilmiştir [1]. Yapılan çeşitli araştırmalarda şiddetli depresyonu olan kişilerde hem beyin-omurilik sıvısında hem de beyinde ruh hali ve motivasyondan sorumlu bölgelerde dopamin konsantrasyonun daha az

olduğu gösterilmiştir [71]. İnsanda yapılan çalışmalarda dopamin agonistlerinin antidepresan benzeri etkiler gösterdiği kaydedilmiştir [72]. Seçici dopamin geri alım inhibitörü olan nomifensin ve metilfenidatın dopamin salınımını teşvik ettiği ve antidepresan etki gösterdiği bildirilmiştir [73][74].

2.3 Ceviz Bitkisi

Ceviz (*Juglans regia L.*) *Juglandales* takımının *Juglandaceae* familyası *Juglans* cinsi içerisinde yer alan sert kabuklu bir meyvedir. *Juglans* cinsi içerisinde şimdiye dek 18 tür tanımlanmıştır. Günümüzde ceviz denilince akla gelen ve meyve kalitesi yüksek İran cevizi veya İngiliz cevizi olarak da bilinen *Juglans regia L.* türüdür [75]. Yüksek enerji içeriğine sahip ceviz büyük oranda yağ, protein çeşitli vitaminler ve mineraller (magnezyum, potasyum, kalsiyum vd.) içerir. Ceviz sağlıklı yağ asitleri ve E vitamini için oldukça iyi bir kaynaktır. Cevizde bulunan başlıca yağ asitleri; total yağ içeriğinin yaklaşık %20'sini oluşturan oleik asit (18:1), %60 oranıyla linoleik asit (18:2) ve %10 oranıyla linolenik asittir(18:3) [76]. 100 gram cevizde yaklaşık 21 mg -Tokoferol (E vitamini) bulunmaktadır [77]. Bunun yanında flavanoidler, fenolik bileşikler, polifenoller gibi fitokimyasallar [78] ve serotonin ve melatonin gibi biyojenik aminlerce zengin bir besindir [79].

Cevizin gıda bileşenleri kapsamlı olarak Tablo 2.1'de belirtilmiştir [80].

Ceviz meyvesi yüksek oranda çeşitli fenolik bileşikler içerir ve buruk tadının bu bileşikler dolayısıyla olduğu düşünülmektedir [81]. Fenolik bileşikler bitki türlerinin çeşitli kısımlarında bulunan sekonder metabolitlerdir. Biyolojik olarak oldukça aktif olan bu bileşikler çeşitli metabolik yolaklar esnasında birçok farklı enzimin faliyetleri sonucu oluşur [82]. Fenolik bileşiklerin büyük bir kısmını fenolik asitler grubu oluşturur. Hidroksisinamik asitler ve hidroksibenzoik asitler bu kimyasal gruba dahildir. Cevizde bulunan kolorojenik, kafeik, p-kumarik, ferulic ve sinapik asit hidroksisinamik asitler grubuna ait bileşiklerdir. Siringik asit ve ellajik asit ise hidroksibenzoik asitler sınıfında bulunan ceviz meyvesinin içerdiği diğer fenolik asitlerdir. Fenolik asitler dışında cevizde kinonlar, hidroksibenzaldehitler ve flavanoidler gibi fenolik gruplar da mevcuttur [83]. Fenolik bileşikler insan sağlığı üzerinde çok çeşitli etkileri olabilmektedir [84]). Fenolik bileşiklerin şimdiye dek kardiyovasküler sistem hastalıkları [85][86] diyabet [87], enflamasyonla ilişkili hastalıklar [88] ve kanser [89][90] üzerinde iyileştirici etkileri olabileceğine dair araştırmalar bulunmaktadır. Son yıllarda yapılan çalışmalarda fenolik bileşiklerin nörokoruyucu etkisi olabileceğine vurgulanmış ve bu alanda bir potansiyele sahip olduğu ileri sürülmüştür [91][92].

Tablo 2.1 Cevizin besin ögesi kompozisyonu

Bileşen	**Birim**	**Ortalama**	**Minimum**	**Maksimum**
Enerji	kcal	679	667	691
Su	g	3.63	3.41	3.74
Kül	g	1.81	1.74	1.87
Protein	g	14.57	13.62	15.11
Azot	g	2.75	2.57	2.85
Yağ, toplam	g	64.82	62.48	67.74
Karbonhidrat	g	3.68	0.13	5.84
Lif, toplam diyet	g	11.5	9.03	13.26
Lif, suda çözünür	g	2.03	0.99	3.44
Lif, suda çözünmeyen	g	9.49	5.59	11.43
Tuz	mg	8	2	12
Demir, Fe	mg	2.34	2.12	2.58
Fosfor, P	mg	365	325	395
Kalsiyum, Ca	mg	103	90	124
Magnezyum, Mg	mg	165	150	179
Potasyum, K	mg	437	349	492
Sodyum, Na	mg	3	1	5
Çinko, Zn	mg	3	2.75	3.25
Selenyum, Se	µg	3.1	1.2	4.4
Riboflavin	mg	0.138	0.125	0.156
Niasin eşdeğerleri, toplam	NE	6.982	5.394	8.958
Niasin	mg	1.201	1.048	1.418
B-6 vitamini, toplam	mg	0.549	0.488	0.636
Folat, gıda	µg	64	50	80
E vitamini	$\alpha - TE$	1.19	0.97	1.44
E vitamini, IU	IU	1.78	1.45	2.15
Alfa-tokoferol	mg	1.19	0.97	1.44
Triptofan	mg	347	260	471
Treonin	mg	1083	417	1628
Izolosin	mg	569	451	672
Lösin	mg	967	880	1081
Lizin	mg	353	321	377
Metiyonin	mg	182	61	283
Sistin	mg	114	92	135
Fenilalanin	mg	649	560	712
Tirozin	mg	449	381	521
Valin	mg	655	548	717
Arjinin	mg	723	523	902
Histidin	mg	538	454	586
Alanin	mg	540	414	643
Aspartik asit	mg	1381	1292	1504
Glutamik asit	mg	2564	2045	3496
Glisin	mg	800	741	924
Prolin	mg	841	686	1122
Serin	mg	1105	829	1294

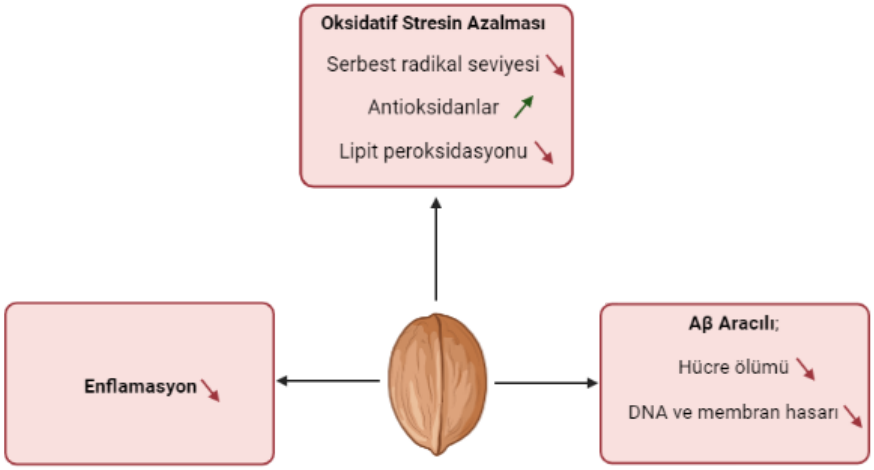
2.3.1 Cevizin Antioksidan Özelliği

Antioksidanlar bitkilerde bulunan oldukça farklı kimyasal yapılara sahip bir bileşikler grubudur. Antioksidanlar metabolizma faliyetleri ve yaşlanma sürecinde oluşan serbest radikalleri nötralize edebilirler. Kardiyovasküler hastalıklar ve nörolojik hastalık başta olmak üzere enflamasyona bağlı birçok hastalığı önlemede büyük bir potansiyele sahip oldukları düşünülmektedir [93]. Yapılan çeşitli çalışmalarda cevizin antioksidan özelliğinin içerdiği hidroksi edilebilir tanenler [94] gibi fenolik bileşikler [95] ve tokoferolden [96] geldiği ileri sürülmüştür [97]. 2002 yılında Halvorsen ve arkadaşlarının, 2010 yılında Mishra ve arkadaşlarının yaptığı çalışmalarda ceviz incelenen tohumlar ve kabuklu yemişler arasında en yüksek antioksidan içeriğe sahip besin olmuştur [98][99]. Yapılan bir başka karşılaştırma çalışmasında ceviz ile yüksek antioksidan kapasiteye sahip olduğu bilinen yağlı balıklar karşılaştırılmıştır. Araştırmanın sonucunda diyetlerinde ceviz bulunduran kişilerin kontrol ve yağlı balık tüketen gruba kıyasla plazma örneklerinde önemli ölçüde daha yüksek antioksidan kapasiteye sahip olduğu gösterilmiştir [100].

2010 yılında Carvalho ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada cevizin tohum, yeşil kabuk ve yaprak ekstraktları hazırlanmış ve çeşitli kanser hücre hatları üzerindeki etkileri incelenmiştir. Böbrek kanser hücre hatları olan A-498 ve 769-P ile kolon kanseri hücre hattı olan Caco-2 üzerinde yapılan çalışmada cevizin tüm ekstraktlarının konsantrasyona bağlı şekilde hücre hatlarının büyümesini inhibe ettiği gözlemlenmiştir [101]. 2001 yılında yapılan bir başka çalışmada ceviz polifenollerinin plazma ve LDL oksidasyonunu etkili bir şekilde inhibe ettiği belirtilmiştir [94].

2.3.2 Cevizin Nörokoruyucu Etkisi

Ceviz sahip olduğu zengin besin içeriği ve fitokimyasal bileşikler dolayısıyla beyin ve zihin sağlığı üzerinde olumlu etkileri olduğu düşünülmektedir [102][15] (Şekil 2.7). 2020 yılında Rusu ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ratlarda D- Galaktoz aracılı yaşlanma modeli oluşturulup, günlük ceviz tüketiminin kan, karaciğer ve beyinde etkileri incelenmiştir. Sekiz haftanın sonunda diyetlerinde ceviz bulunan gruplarda control grubuna kıyasla hücresel antioksidan aktivitenin ve glutatyon seviyelerinin arttığı, ROS'un, ileri glikasyon son ürünlerinin, nitrik oksitin ve malondialdehit seviyelerinin ise azaldığı gözlemlenmiştir. Bu bağlamda ceviz tüketiminin karaciğer ve beyin sağlığını korumada etkili olabileceği ve ileri yaşa bağlı hastalıklara yakalanma riskini azalttığı ve yaşlanma sürecini geciktirebileceği ileri sürülmüştür [103]. Bir başka çalışmada Lauren ve arkadaşları tarafından yaşlanmış ratlarda cevizin motor ve bilişsel fonksiyonlar üzerinde doza bağlı etkisi araştırılmıştır. Diyetlerinde %2 ve %6 oranında ceviz bulunduran ratların motor fonksiyonlarında önemli ölçüde



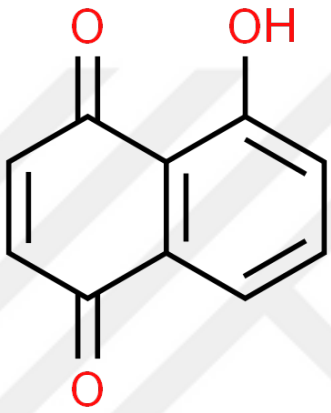
Şekil 2.7 Cevizin nörokoruyucu etkisi

gelişme gözlemlenirken, %9 oranında ceviz tüketen grupta herhangi bir gelişme gözlemlenmemiştir. Ancak cevizle beslenen tüm gruplarda bilişsel fonksiyonların control grubuna kıyasla arttığı gözlemlenmiştir [104]. 2011 yılında yapılan bir başka çalışmada PC12 hücre hattında ceviz ekstraktının Alzheimer hastalığının etiyolojisinde oldukça önemli bir protein olan amiloid beta proteinine, ROS'a ve apoptoza olan etkileri araştırılmıştır. Çalışmanın sonucunda ceviz ekstraktının amyloid beta sebepli hücre ölümlerini azalttığı bunun yanında membran hasarının bir göstergesi olan laktat dehidrojenaz enziminin salınımının azaldığı ve DNA hasarının (Apoptoz) azaldığı kaydedilmiştir. ROS miktarının azaldığı gözlemlenmiştir. Sonuç olarak ceviz ekstraktının amiloid beta aracılı oksidatif stresle baş etmede etkili olabileceğini göstermiştir [105].

Cevizde bol miktarda bulunan E vitamini ile Alzheimer ilişkisine dair de birçok çalışma bulunmaktadır. Alzheimer hastalığının çeşitli oluşum mekanizmaları göz önüne alındığında E vitamininin yüksek antioksidan aktivitesi, lipit peroksidasyonunu azaltması, amyloid beta proteini ile ilişkili ROS'ların oluşumunu önlemesi ve anti enflamatuar özellikleri onun bu hastalıkla baş etmede etkili bir molekül olabileceğini düşündürmektedir [106].

2.4 Juglon

Ceviz ağacının olumsuz etkileri insanlar tarafından uzun yıllardır gözlemlenmiştir. Ceviz ağacının yakınındaki bitkilerin solması veya ölmesi ”ceviz solgunluğu” olarak bilinmekteydi. Ancak ceviz solgunluğunun nedeni uzun yıllar bilinememiştir [20]. 1850'li yıllarda ceviz ağacının bu karakterinden sorumlu olan sarı renkli kristal bileşik perikarpten izole edilmiş ve ”nüsin” olarak adlandırılmıştır [107]. 1887 yılında Bemthsen ve Semper bu bileşiğin kimyasal yapısının 5-hidroksi-1,4 naftakinon (Şekil 2.8) olduğunu keşfetmişlerdir [108]. Daha sonraları bu bu bileşiğe cevizin latince ismine ithafen juglon adı verilmiştir. 1928 yılında Davis tarafından bileşik tanımlanmış ve cevizin allelopatik etkisinden sorumlu olduğu ileri sürülmüştür [109].



Şekil 2.8 Juglonun kimyasal yapısı

Ceviz ağacının yapraklar, meyve kabuğu, kök ve iç kabuk gibi canlı dokularında juglon hidrojuglon olarak bulunmaktadır. Juglonun indirgenmiş hali olan hidrojuglon renksiz ve toksik olmayan bir formdur. Hidrojuglon havaya veya diğer bitkilerin köklerinde bulunan oksitleyici bir ajanla karşılaşınca direkt olarak toksik forma geçerek juglona dönüşür. Juglon çoğunlukla yağmurla canlı yapraklardan yıkanarak toprağa geçer. Bunun yanında toprakta çürüyen yaprak ve meyve kabuğuyla da toprağa geçebilir [110] [111].

Juglonun kimyasal özellikleri Tablo 2.2'de belirtilmiştir.

Tablo 2.2 Juglonun imyasal özellikleri

Formül	$C_{10}H_6O_3$
Moleküler Ağırlık	174.15 g/mol
Erime Noktası	151°C
Suda Çözünürlüğü	52 mg/L
Fiziksel Özellikleri	Sarı, Katı, Işığa karşı hassas

Juglonun bitkiler üzerindeki etkileri bitki türlerine göre oldukça çeşitlilik

göstermektedir. Yapılan çalışmalarda domates, hıyar, tere, patates, lahana, patlıcan, monolya ve çam bitkilerinin kök ve gövde gelişimi juglondan olumsuz etkilenirken soğan, kavun, mısır ve pancar gibi bitkiler üzerinde ya hiçbir olumsuz etki gözlemlenmemiş veya çok az bir etki gözlemlenmiştir [112][113][114]. Ayrıca juglonun etkisi konsantrasyonuna bağlı olarak da değişmektedir. Juglon düşük konsantrasyonlarda antioksidan özellik gösterirken yüksek konsantrasyonlarda prooksidant özellik gösterdiği bildirilmiştir [115].

2.4.1 Juglonun Antioksidan Özelliği

Fenolik bileşiklerde molekül içi hidrojen bağları serbest radikalleri stabil hale getirmede önemli bir rol üstlenmektedir. Juglon hidroksil ve keto grupları arasında molekül içi bir hidrojen bağına sahiptir. Bu bağ serbest radikallerle karşılaşınca onlara hidrojen atomu transfer ederek etkisiz hale gelmelerini sağlamaktadır [116]. Yapılan bir çalışmada juglonun karaciğerde süperoksit dismutaz (SOD) enziminin aktivitesini arttırdığı böylece oksidatif stresi azalttığı gösterilmiştir [117]. Bunun yanında juglon aktif olarak Pin1 enzimini baskılar. Pin1 enzimi proteinlerde konformasyonel değişiklikler yaparak hücresel fonsiyonların düzenlenmesinde önemli rol oynar. Pin1; glikolitik enzimlerde, protein kinazlarda, protein fosfatazlarda, transkripsiyon aktivatörlerinde ve daha birçok protein yapılı molekülde spesifik olarak serin-treonin ve serin-prolin bağlarını fosforlar. Pin1 kaynaklı konformasyonel değişimler serbest radikallerin birikmesini sağlar [118].

2.4.2 Juglonun Nörokoruyucu Etkisi

Serbest radikallerin beyin dokusunda birikmesi, sinir hücrelerinin fonksiyon kaybı veya ölümü dolayısıyla da Alzheimer ve Parkinson hastalıklarının başlangıcına neden olabileceği ileri sürülmüştür [119]. Yapılan bir çalışmada hayvan modellemelerinde Parkinson hastalığında Pin1 enziminin ekspresyonunun arttığı ve bu enzimin nörodejeneratif etkisinin bulunduğu sonucuna ulaşılmıştır. Juglonun Pin1 inhibitörü olmasından dolayı nörokoruyucu etkisinin olabileceği önerilmiştir [120]. 2015 yılında yapılan bir çalışmada Pin1 geninin ekspresyonunun artışı Notch yolağı üzerinden nöronal hasarın artışına sebep olduğu gözlemlenmiştir. Nöronal hasarın ise *in vitro* ve *in vivo* koşullarda Pin1'in juglon ile baskılandığı durumda azaldığı bildirilmiştir [121]. Peng ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada juglonun ratlarda yüksek yağlı diyet kaynaklı nöroinflamasyonu önlediği gösterilmiştir [122]. Bir başka çalışmada juglon Alzheimer hastalığında önemli bir patojen olan Tau proteinini defosforile ederek inaktive etmiştir [123].

3
MATERYAL METOD

3.1 Materyal

3.1.1 Bitkisel Materyaller

Ceviz ekstraktı hazırlamak için gerekli cevizler Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü'nden sağlanmıştır. Kullanılan ceviz türüne ve varyetesine göre ekstraktın içeriği farklılık göstermesi sebebiyle [124], tüm cevizler *Juglans regia L.* Cv. Chandler varyetesi olacak şekilde seçildi ve tek bir ağaçtan toplandı. Hasat Ekim ayında gerçekleştirildi.

3.1.2 Deney Hayvanları

Çalışmada 41 adet 2 aylık erkek ve ağırlıkları 250 gram ile 300 gram arasında değişen Sprague-Dawley cinsi sıçan kullanıldı.

3.1.3 Cihazlar

- HPLC (UFLC-Shımadzu)
- Analitik Ters Fazlı Kolon (Inertsil ODS-3, 250 $\times$ 4.6 mm, 5 μm)
- Hücre Kültürü Kabini (Class II) (Safe Fast Classic Faster Air)
- Ters Işık Mikroskopu (Novel)
- Hassas Terazi (DAIHAN SCIENT)
- Rotary Evaporatör (Heidolph)
- Liyofilizatör (Labconco FreeZone 2.5 Liter)
- Otoanalizatör (Abbot Architect c8000)
- -86°C Ultra Derin Dondurucu (Haider)

- -20°C Derin dondurucu (Uğur)
- Santrifüj (Hermle Z 32 HK)
- Mini Santrifüj (ISOLAB)
- Vorteks (DLAB MX-S)
- CO_2 İnkübatör (ESCO)
- Mikroplaka Okuyucu (Thermo Varioskan)
- Elisa Reader (Thermo Scientific™ 1423405)
- Su Banyosu (Memmert)
- Buzdolabı (Uğur)
- Ultrasonik Su Banyosu (SELECTA, ULTRASONS-HD)
- Bilyeli Homojenizatör (Retsch MM 400)
- pH metre (Milwaukee Instruments Inc.)

3.1.4 Sarf Malzemeler

- Hücre kültürü flaskları (Corning)
- Steril 1000 µL pipet ucu (ISOLAB T-R-S-1000)
- Steril olmayan 200 µL pipet ucu (NEST 302106)
- Steril 10 µL pipet ucu (ISOLAB I.083.13.010)
- 10 ml'lik serolojik pipet (NEST 327001)
- 2 ml'lik krojenik şişe (NEST 607001)
- 96 kuyucuklu plaka (SPL 30196)
- 96 kuyucuklu siyah plaka (SPL 30296)
- Dondurma tüpleri (Kryotüp) (PAN BIOTECH P07-90050)
- Falkon tüp (15 ml) (NEST)
- Falkon tüp (50 ml) (NEST)
- 2,5 ml'lik enjektör (BD)

- 10 ml'lik enjektör (BD)
- Edtalı mor kapak hemogram tüpü (BD Vacutanier)
- Jelli sarı kapak biyokimya tüpü (BD Vacutanier)
- Eppendorf tüpü

3.1.5 Kimyasallar ve Kitler

- Juglon (5-hidroksi-1,4-naftakinon) (Sigma-Aldrich, CAS No: 481-39-0)
- L929 fare fibroblast hücre hattı
- ATP Hücre Canlılığı Ölçüm Kiti(Promega G7571)
- 2,7-diklorofluoresein diasetat (DCF-DA) (Sigma-Aldrich D6883-50MG)
- Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM) besiyeri (WISENT MULTICELL 320-036 CL)
- Fetal sığır serumu (FBS) (CAPRICORN SCI FBS-HI-11A)
- Phosphate Buffered Saline(PBS) (WISENT MULTICELL 311-010 CL)
- Tripsin-EDTA (WISENT MULTICELL 325-043 EL)
- Antibiyotik-antimikotik (WISENT MULTICELL 450-115 EL)
- Etanol absolute≥%99.9 (ISOLAB CHEMICALS 920.026.2500)
- Serotonin ELISA Kiti (SUNREDBIO 201-11-1683)
- Dopamin ELISA Kiti (SUNREDBIO 201-11-0220)
- AST ölçüm kiti
- ALT ölçüm Kiti
- Üre ölçüm Kiti
- Kreatinin ölçüm kiti
- Sığır Serum Albumin (Sigma-Aldrich, CAS No: 9048-46-8)
- Coomassie Brillant Mavisi
- Gallik Asit (Sigma-Aldrich , CAS No: 149-91-7)

- Quercetin (Sigma-Aldrich , CAS No: 117-39-5)
- Metanol (Sigma-Aldrich , CAS No: 67-56-1)
- Asetonitril
- Bütil Hidroksi Toluen
- Folin-Denis Reaktifi
- Sodyum Karbonat
- Potasyum Asetat
- Aliminyum Nitrat
- ABTS
- Askorbik Asit
- Ketamin
- Ksilazin

3.2 Metod

3.2.1 Cevizin Juglon İçeriğinin Belirlenmesi

3.2.1.1 Örneğin Hazırlanması

Ceviz örneği Colaric ve arkadaşlarının geliştirmiş olduğu yöntem modifiye edilerek etanol kullanılarak hazırlandı [83]. Ceviz içleri ufak parçalara ayrılıp porselen havan yardımıyla ezilerek iyice öğütüldü. Yaklaşık 150 mg ceviz içi falkon tüpe alınıp üzerine %1 bütillendirilmiş hidroksi tolüen (BHT) içeren 10 ml etanol eklendi. Fenolik bileşiklerin açığa çıkması amacıyla 0 °C sıcaklığında ultrasonik su banyosunda 40 dakika bekletildi. Ekstrakte edilmiş ceviz içleri 10°C sıcaklığında 13.000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası üst faz evaporasyon flaskına eklenerek, rotary evaporatörde etanolün tamamının uçması sağlandı. Flaskın çeperinde kalan kuru ekstrakt 2 ml etanol kullanılarak çözdürülüp, 0,45 µm por genişliğinde CA filtreden geçirilerek viallendi.

3.2.1.2 Juglon Standartının Hazırlanması

Standart juglon stok çözeltisi hazırlanması amacıyla 10 mg juglon hassas terazi yardımıyla tartılıp balon jojeye eklendi. Üzerine 10 ml asetonitril eklenerek juglonun çözünmesi sağlandı. Daha sonra saf su ile hacim 100 ml'ye tamamlandı.

3.2.1.3 HPLC Koşulları ve Analizi

Mobil faz hazırlamak için metanol, su ve asetonitril sırasıyla hacimce 42: 56: 2 oranlarında bir mezür içerisinde birleştirildi ve iyice karışmaları sağlandı. Analiz Inertsil ODS-3, 250 × 4.6 mm, 5 µm analitik ters fazlı kolon kullanılarak, 1ml/dakika akış hızında, kolon fırını 30 °C olacak şekilde gerçekleştirildi. Ölçüm florasan dedektör kullanılarak 254 nm dalga boyunda yapıldı.

3.2.2 Ceviz Ekstraktının Hazırlanması

Ceviz ekstraktı Slatnar ve arkadaşlarının gerçekleştirdiği yöntem modifiye edilerek hazırlandı[125]. Ekstrakt hazırlamak üzere ceviz içleri porselen havan yardımıyla iyice öğütüldü. 2,5 gram öğütülmüş ceviz içi hassas terazi vasıtasıyla tartılıp boş bir falkona eklendi. Üzerine 22,5 ml etanol/su eklenerek(v/v, 60/40) 0°C sıcaklığında ultrasonik su banyosunda 60 dakika ekstrakte edildi. Sonrasında ceviz ekstraktı 4°C sıcaklığında 6.000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Bu işlem sonrası süpernatant evaporasyon flaskına alınarak rotary evaporatörde su banyosu sıcaklığı 40°C altında tutularak etanolün tamamının uçması sağlandı. Flaskta kalan sulu ekstrakt -80°C'de dondurulduktan sonrasında su fazı liyofilizatörde uçurularak toz ekstrakt elde edildi.

3.2.3 Ceviz Ekstraktının Total Fenolik, Flavanoid ve Antioksidan İçeriğinin Belirlenmesi

3.2.3.1 Total Fenolik İçeriğin Belirlenmesi

Ekstrakttaki total fenolik bileşik miktarını tayin edebilmek için değişen konsantrasyonlarda (0,625 mg/ml - 0,312 mg/ml - 0,156) gallik asit standart olarak kullanıldı. Ceviz ekstraktı 5 mg tartılıp eppendorf tüpüne alındı. Üzerine 1 ml distile su eklendi. Seri dilüsyon yapılarak değişen konsantrasyonlarda (5 mg/ml - 2,5 mg/ml - 1,25 mg/ml - 0,625 mg/ml - 0,312 mg/ml) ceviz ekstraktı çözeltileri hazırlandı. 96'lık plate alınıp kuyucuklara 40µL örnek konuldu. Üzerine 200µL Folin-Denis reaktifi eklendi. Sonrasında 8 dakika oda sıcaklığında ışıktan koruyarak inkübe edildi. Daha sonra üzerine 30 µL %7.5'lik sodyum karbonat (Na_2CO_3) çözeltisi eklendi. İşlem sonrası çalkalayıcıda 2 saat ışık almayacak şekilde inkübasyona bırakıldı. 2 saatin sonunda plate 746 nm dalga boyunda çoklu mikroplate okuyucuda (Varioskan Flash, Multiplate Reader, Thermo,ABD) fotometrik olarak okundu.

3.2.3.2 Total Flavonoid İçeriğin Belirlenmesi

Ceviz ekstraktının total flavonoid içerik tayinini yapabilmek için değişen konsantrasyonlarda quercetin standart olarak kullanıldı. 1mg quercetin hassas terazi ile tartılıp eppendorf tüpüne alındı. Üzerine 1 ml %80 etil alkol çözeltisi eklendi. Daha sonra seri dilüsyon yapılarak 0,5 mg/ml - 0,25 mg/ml - 0,125 mg/ml - 0,0625 mg/ml - 0,031 mg/ml konsantrasyonlarında standart çözeltileri hazırlandı. Ceviz ekstrakt örneklerini hazırlamak için 5 mg ekstrakt tartılıp üzerine 1 ml %80 etil alkol çözeltisi eklendi. Sonrasında seri dilüsyonla 2,5 mg/ml - 1,25 mg/ml - 0,625 mg/ml - 0,31 mg/ml konsantrasyonlarında ceviz ekstrakt çözeltileri hazırlandı.

Kuyulara 192 µL örnek eklendi. Üzerine 1 M 4 µL potasyum asetat (CH_3CO_2K) çözeltisi eklenip 1 dakika beklendi. Devamında %10'luk 4 µL aliminyum nitrat çözeltisi eklenip 40 dakika inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası 415 nm dalga boyunda plate fotometrik (Varioskan Flash, Multiplate Reader, Thermo,ABD) olarak okundu.

3.2.3.3 Total Antioksidan İçeriğin Belirlenmesi

TAS'ın belirlenemebilmesi için tayinin 1 gün öncesinden R_1 ve R_2 reaktifleri hazırlandı. R_1 reaktifi için pH 5.8 0.4 M asetat tamponu hazırlandı. R_2 reaktifi için pH 3.6, 30 mM asetik asit tamponu , 10 mM ABTS , 55.6 µL H_2O_2 ve %10'luk etilen glikol ile 2000 ml olacak şekilde hazırlandı.

Antioksidan standartı olarak 1 mM askorbik asit (C vitamini) kullanıldı. Standart seri dilüsyon değişen konsantrasyonlarda dilüe edildi. Ceviz ekstraktı örnekleri için 5 mg tartılıp eppendorf tüpüne alındı. Üzerine 1 ml distile su eklendi. Seri dilüsyon yapılarak değişen konsantrasyonlarda (5 mg/ml - 2,5 mg/ml - 1,25 mg/ml - 0,625 mg/ml - 0,31 mg/ml) ceviz ekstraktı çözeltileri hazırlandı.

Kuyucuklara 100 µL R_1 reaktifi eklendi. Üzerine 6 µL örnekler konulup 658 nm dalga boyunda okundu. Daha sonra üzerine 15 µL R_2 reaktifi eklenip 2 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonrası 658 nm'de plate fotometrik olarak tekrar okundu.

3.2.4 Hücre Kültürü Çalışmaları

Tezin *in vitro* hücre kültürü çalışmaları için Amerikan Tip Kültür Koleksiyonu (ATCC, Manassas, VA, ABD)'den ticari olarak temin edilmiş olan fare fibroblast hücre hattı (L929) kullanıldı. Hücrelerin üretilmesi için %10 fetal bovin serum (FBS), %1 penisilin/streptomisin (100 U/ml penisilin ve 100 µg/ml streptomisin) içeren Eagle's minimal essential medium (EMEM) besiyeri hazırlandı. Kültür işlemleri steril laminar hava akımlı biyogüvenlik sınıf 2 kabinde gerçekleştirildi. Sıvı azot tankında depolanan

hücreler çalışma sırasında bu tanklardan alınarak 37°C su banyosunda çözdürülüp, hücre dondurma solüsyonundan arındırıldıktan sonra içerisinde besiyeri bulunan T25 filtreli hücre kültür flasklarına ekildi. Hücreler T25'te konfluent olduktan sonra T75 flasklara aktarıldı ve bu işlem de yeterli hücre miktarına ulaşıncaya kadar devam etti. Flasklarda çoğaltılacak hücrelerin inkübasyonu 37°C'de %5 CO_2 içeren inkübatörde yapıldı. Hücrelerin her gün invert mikroskop ile kontrolü yapılarak gün aşırı besiyerleri değiştirildi. Fazla hücreler, %10 dimetil sülfoksit (DMSO) içeren dondurma medyumu ile birlikte kriyotüpler içerisinde nitrojen tankına alınarak stoklandı.

3.2.4.1 Sitotoksisite Analizi

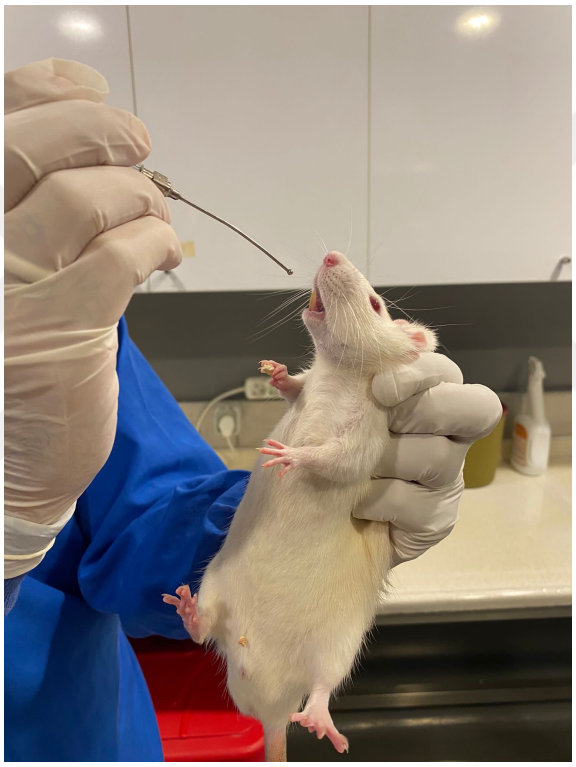
Ceviz ekstraktı ve juglonun farklı konsantrasyonlarının L-929 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisi, canlılık analizi kiti (Promega, Katalog No:G7571, CellTiter Luminescent Cell Viability Assay 10x10m, Wisconsin, ABD) kullanılarak luminometrik ATP ölçüm yöntemiyle belirlendi. Hücreler kuyu başına 5 x 10^3 hücre olacak şekilde 96 kuyucuklu plakalara ekildi ve ardından 37°C'de %5 CO_2 içeren inkübatörde 24 saat inkübe edildi. Daha sonra ceviz ekstraktı 0,5 mg/ml-10 mg/ml ve juglonun 1 µM-100 µM arasında değişen konsantrasyonları hücrelere uygulandı ve hücreler 24 ve 48 saat süreyle inkübe edildi [126][127]. İnkübasyon sonunda kuyular steril fosfat tamponu (PBS) ile yıkanıp, her kuyuya 100µL hazırlanmış reaktif ilave edilerek 10 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı. Sonrasında sonuçlar fotometrik çoklu plate okuyucusu (Varioskan Flash, Multiplate Reader, Thermo,ABD) kullanılarak okundu. ATP varlığına bağlı olarak ışık intensitesi artacağından, canlılık intensite artışı ile belirlendi. Deneyler üçlü tekrarlar şeklinde gerçekleştirildi. Deney sonunda ceviz ektraktı ve juglonun IC_{50} değerleri ve sitotoksik olmayan dozları belirlendi.

3.2.4.2 ROS Üretiminin Ölçülmesi

ROS üretimi, hücre geçirgen floresan dihidrodiklorofloresin diasetat (H_2DCF-DA) kullanılarak ölçüldü. H_2DCF-DA bir ROS indikatörüdür. Ortamda yüksek oranda ROS bulunduğunda yeşil floresan diklorofloreseine (DCF) oksitlenir. L929 hücreleri juglon (1 µM, 5 µM, 10 µM ve 50 µM) ve ceviz ekstraktının (0,5 mg/ml, 1mg/ml, 5mg/ml ve 10mg/ml) farklı konsantrasyonları ile 24 ve 48 saat boyunca muamele edildi. Sonrasında hücreler soğuk PBS ile yıkanıp, 100 µM H_2DCF-DA ile 37°C'de 30 dakika inkübasyona bırakıldı. DCF floresan yoğunluğu Ex/Em= 488/525 nm'de floresans plate okuyucu (Varioskan Flash, Multiplate Reader, Thermo,ABD) kullanılarak ölçüldü. Bulunan değerler ATP sitotoksisite testi değerlerine oranlandı. Sonuçlar kontrol ile karşılaştırıldığında % nisbi floresan olarak ifade edildi[128].

3.2.5 Deney Hayvanları Çalışmaları

Bu çalışma için gerekli etik kurul onayı Bezmialem Vakıf Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan 2020/153 sayılı karar ile alındı. Çalışma kapsamında 2 aylık erkek Sprague-Dawley cinsi 250-300 gram ağırlığındaki 41 sıçan kullanıldı. Denekler bir hafta boyunca ortam 12 saat gündüz 12 saat gece tutularak, 22±2 °C 'de ve %55 nemli ortamda ortama alıştırıldı. Sıçanlar deney süresince *ad libitum* bir şekilde yem ve suya erişebildi. Canlılar birinci haftanın sonunda karışık bir şekilde deney gruplarında 7 sıçan, kontrol grubunda ise 6 sıçan olacak şekilde 6 gruba ayrıldı. Deney gruplarına üç hafta boyunca aşağıda belirtilen konsantrasyonlarda gavajla üç günde bir ceviz ekstraktı ve juglon verildi (Şekil 3.1).



Şekil 3.1 Gavaj uygulaması

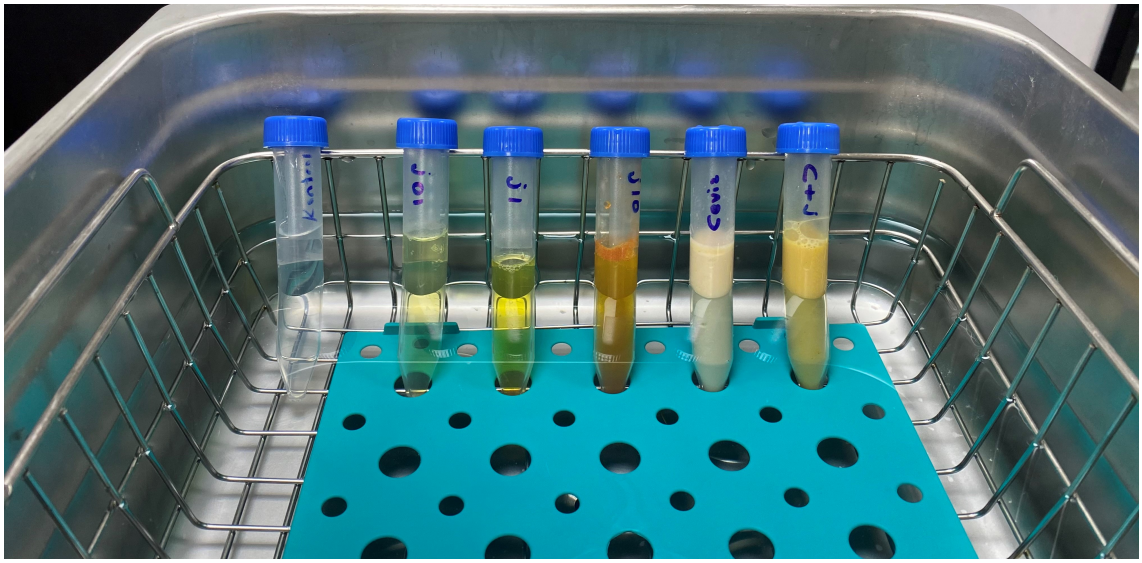
- **Grup I**: 0,1 mg/kg Juglon Grubu
- **Grup II**: 1 mg/kg Juglon Grubu
- **Grup III**: 10 mg/kg Juglon Grubu
- **Grup IV**: 300mg/kg Ceviz ekstraktı Grubu
- **Grup V**: 300mg/kg Ceviz ekstraktı + 1 mg/kg Juglon Grubu
- **Grup VI**: Kontrol Grubu

3.2.5.1 Ceviz Ekstraktı ve Juglon Çözeltilerinin Hazırlanması

Çözeltiler hayvanların ortalama ağırlıkları 250 gram olduğundan çözeltiler buna göre ve uygulamalardan önce taze olarak 10 ml hacminde hazırlandı. Her bir hayvana tek seferde verilecek gavaj hacmi 1,25 ml olarak belirlendi. Juglonun suda çözünürlüğü oldukça sınırlı olduğundan hazırlanan çözeltilere hacimce %2 olacak şekilde etanol eklendi. Juglon çözeltileri 10mg/kg juglon çözeltisinden seri dilüsyon yöntemiyle elde edildi. 10mg/kg juglon çözeltisi elde etmek için 20 mg juglon hassas terazi yardımıyla tartılıp 15 ml'lik falkon tüpe alındı. Üzerine 200µL etanol eklenip vortekslendi. Çözelti hacmi saf su ile 10 ml'ye tamamlandı. Çözeltinin 10 dakika 25°C sıcaklığındaki ultrasonik su banyosunda homojenleşmesi sağlandı. 1mg/kg juglon çözeltisi hazırlamak için 10mg/kg juglon çözeltisinden 1 ml alnıp üzerine 200µL etanol eklendi. Çözelti daha sonra 10 ml'ye saf su ile tamamlandı. 0,1mg/kg juglon çözeltisi hazırlamak için 1mg/kg juglon çözeltisinden 1 ml alınıp üzerine 200 µL etanol eklendi. Sonrasında çözelti saf su ile 10 ml'ye tamamlandı.

Ceviz çözeltileri için 600 mg ceviz ekstraktı hassas terazi ile tartıldı.Üzerine 200 µL etanol eklendi. Çözelti saf su ile 10 ml'ye tamamlandı. Homojenleşmesi için 1 dakika vortekslenip 10 dakika ultrasonik su banyosunda bekletildi. V.gruba çözelti içerisinde hayvan başına 1 mg/kg juglon olabilmesi için 2 mg juglon tartılıp eklendi.

Kontrol grubu için 200 µL etanol 15 ml'lik falkon tüpe eklenip saf su ile hacim 10 ml'ye tamamlandı. Tüm çözeltiler hazırlandıktan sonra homojenizasyon için 10 dakika ultrasonik su banyosunda homojenize edildi (Şekil 3.2).



Şekil 3.2 Ceviz ekstraktı ve juglon çözeltilerinin homojenizasyonu

3.2.5.2 Çalışmanın Sonlandırılması ve Örneklerin Toplanması

Üçüncü haftanın sonunda her bir canlıya 75-90 mg/kg ketamin ile 5-10 mg/kg ksilazin birlikte intraperitoneal uygulanarak anestezi gerçekleştirildi. Anestezi aldında canlılardan kardiyak kan örnekleri etilendiamin tetraasetik asit (EDTA)'li mor kapak hemogram tüpe ve jelli sarı kapak biyokimya tüpüne alındı. Kan alımı sonrası dekapütasyon gerçekleştirildi. Vakit kaybetmeden karaciğer ve beyin örnekleri buz içerisindeki tüplere alındı. Sonrasında dokular -80°C'de biyokimyasal testler yapılana kadar muhafaza edildi.

Alınan kan örnekleri 3500 x g'de 10 dakika santrifrüj edilerek serumları ve plazmaları ayrıldı. Serum ve plazmalar eppendorf tüplerine bölüştürülüp -80°C'de testler yapılana kadar muhafaza edildi.

3.2.6 Doku Homojenatlarının Hazırlanması

Beyin doku homejenizasyonu için -80°C'de saklanan bütün haldeki beyin dokusu çıkarılıp üzerine 5 ml pH 7.4 PBS eklendi. Sulandırılan dokular bilyeli homojenizatör cihazı ile homojenize edildi. Homojenatlar 10000 g'de 4°C'de 10 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası oluşan süpernatan alınarak farklı eppendorf tüplerine bölüştürüldü. Tüpler daha sonra çalışılmak üzere -80°C'de muhafaza edildi.

Karaciğer doku homojenizasyonu için -80°C'de saklanan karaciğer çıkarılıp hassas terazi yardımıyla 150 mg karaciğer dokusu eppendorf tüpüne tartıldı. Üzerine 1.5 ml pH 7.4 PBS eklenerek bilyeli homojenizatör cihazında homojenize edildi. Oluşan homojenat 10000 g'de 4°C'de 10 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası oluşan süpernatan alınarak farklı eppendorf tüplerine bölüştürüldü. Tüpler daha sonra çalışılmak üzere -80°C'de muhafaza edildi.

3.2.7 Dokuların Total Protein Konsantrasyonunun Belirlenmesi

Homojenize edilmiş beyin ve karaciğer dokularında protein tayini Bradford Assay yöntemiyle gerçekleştirildi. Bu yöntem Coomassie Brillant Blue G-250 boyasının proteinlerin asidik ve bazik gruplarıyla etkileşerek renk değiştirmesine dayanmaktadır. Boya asidik bir protein grubuyla karşılaşınca kahverengi-kırmızı, bazik protein gruplarıyla karşılaşınca mavi rengine dönüşür.

Tayin için sığır serum albumin (BSA) protein standartı olarak kullanıldı. 2 mg BSA hassas terazi ile tartılıp eppendorf tüpüne alındı. Üzerine 1 ml saf su alınarak 2mg/ml BSA içeren standart çözeltisi hazırlandı. Diğer standart çözeltileri seri dilüsyonla sırasıyla 1,5mg/ml - 1mg/ml - 0,75 mg/ml - 0,50 mg/ml - 0,25 mg/ml - 0,125 mg/ml

konsantrasyonlarında hazırlandı.

96'lık plate üzerinde kuyucuklara 5 µL örnek ve standart eklendi. Üzerine 250 µL Coomassie Brillant Blue G-250 boyası ilave edilip 10 dakika çalkalayıcıda ışık görmeyecek şekilde inkübe edildi. İnkübasyon sonrası plate 595 nm'de çoklu plate okuyucusunda (Varioskan Falash, Multiplate Reader, Thermo, ABD) fotometrik olarak okutuldu.

3.2.8 Biyokimyasal Kan Parametrelerinin Ölçümü

Rat serumunda karaciğer fonksiyon testi kapsamında AST ve ALT enzim aktiviteleri ölçülerek U/L olarak sonuç alındı. Böbrek fonksiyon testi kapsamında üre ve kreatinin seviyeleri belirlendi. Ölçüm rutin biyokimya otoanalizatörü (Abbot Architect c8000) aracığıyla ticari kitler (Abbott Laboratuvarları, Abbott Park, Illinois, ABD) kullanılarak gerçekleştirildi.

3.2.9 Serum ve Beyin Dokusu Serotonin Miktarının Ölçümü

Rat serotonin düzeyini tespit etmek için çift antikorlu sandviç ELISA kiti kullanıldı (Sunredbio, Katalog No 201-11-1683, Şangay, Çin). Serotonin standart dilüsyonları aşağıdaki tabloda belirtildiği şekilde gerçekleştirildi (Tablo 3.1).

Tablo 3.1 Serotonin standart dilüsyonları

120 ng/ml	Standart No.5	120 µL Orijinal Standart + 120µL Standart diluent
60 ng/ml	Standart No.4	120 µL Standart No.5 + 120µL Standart diluent
30 ng/ml	Standart No.3	120 µL Standart No.4 + 120µL Standart diluent
15 ng/ml	Standart No.2	120 µL Standart No.3 + 120µL Standart diluent
7,5 ng/ml	Standart No.1	120 µL Standart No.2 + 120µL Standart diluent

Plate üzerinde blank kuyusuna örnek, biyotin etiketli serotonin antikoru ve streptavidin-HRP kit protokolü gereğince eklenmedi. Sadece kromojen solüsyonu A ve B ile stop solüsyonu eklendi. Standart kuyularına 50 µL standart ile 50 µL streptavidin-HRP eklendi. Örnek kuyularına ise 40 µL örnek eklenerek üzerine 10µL serotonin antikoru ve 50µL streptavidin-HRP eklendi. Sonrasında plate üzeri membran ile kaplanarak 60 dakika 37°C'de hafifçe çalkalanarak inkübasyona bırakıldı.

İnkübasyon gerçekleşirken 30x yıkama solüsyonu distile su ile dilüe edildi. İnkübasyon tamamlanınca membran dikkatlice çıkartılıp kuyulardaki sıvı çekildi. Kuyucuklar 5 defa yıkama solüsyonu ile yıkanıp içerisindeki sıvılar uzaklaştırıldı. Sonrasında her kuyuya 50 µL kromojen a ve 50 µL kromojen b eklendi. Plate hafifçe çalkalanıp 10 dakika 37°C'de ışık görmeyen bir şekilde inkübe edildi.

İnkübasyon sonrası her kuyuya 50 µL stop solüsyonu eklendi. İşlem sonrası kuyucukların rengi maviden sarıya döndü. Sonrasında 10 dakika içerisinde OD değeri ELISA reader ile ölçüldü.

3.2.10 Serum ve Beyin Dokusu Dopamin Miktarının Ölçümü

Rat serum ve beyin dokusunda dopamin düzeylerini tespit etmek için çift antikorlu sandviç ELISA kiti kullanıldı (Sunredbio, Katalog No 201-11-0220, Şangay, Çin). Dopamin standart dilüsyonları Tablo 3.2'deki gibi hazırlandı.

Tablo 3.2 Dopamin standart dilüsyonları

4,8 ng/ml	Standart No.5	120 µL Orijinal Standart + 120µL Standart diluent
2,4 ng/ml	Standart No.4	120 µL Standart No.5 + 120µL Standart diluent
1,2 ng/ml	Standart No.3	120 µL Standart No.4 + 120µL Standart diluent
0,6 ng/ml	Standart No.2	120 µL Standart No.3 + 120µL Standart diluent
0,3 ng/ml	Standart No.1	120 µL Standart No.2 + 120µL Standart diluent

Plate üzerinde blank kuyusuna örnek, biyotin etiketli dopamin antikoru ve streptavidin-HRP kit protokolü gereğince eklenmedi. Sadece kromojen solüsyonu A ve B ile stop solüsyonu eklendi. Standart kuyularına 50 µL standart ile 50 µL streptavidin-HRP eklendi. Örnek kuyularına ise 40 µL örnek eklenerek üzerine 10µL dopamin antikoru ve 50 µL streptavidin-HRP eklendi. Sonrasında plate üzeri membran ile kaplanarak 60 dakika 37°C'de hafifçe çalkalanarak inkübasyona bırakıldı.

İnkübasyon gerçekleşirken 30x yıkama solüsyonu distile su ile dilüe edildi. İnkübasyon tamamlanınca membran dikkatlice çıkartılıp kuyulardaki sıvı çekildi. Kuyucuklar 5 defa yıkama solüsyonu ile yıkanıp içerisindeki sıvılar uzaklaştırıldı. Sonrasında her kuyuya 50 µL kromojen a ve 50 µL kromojen b eklendi. Plate hafifçe çalkalanıp 10 dakika 37°C'de ışık görmeyen bir şekilde inkübe edildi.

İnkübasyon sonrası her kuyuya 50 µL stop solüsyonu eklendi. İşlem sonrası kuyucukların rengi maviden sarıya döndü. Sonrasında 10 dakika içerisinde OD değeri ELISA reader ile ölçüldü.

3.2.11 Total Oksidan Seviyesi Ölçümü

Ceviz ektraktı ve juglonun oksidatif stres düzeyine etkilerini belirlemek için sıçanların serum, beyin ve karaciğer hemojenatlarından TAS ve TOS fotometrik yöntem ile ölçüldü. OSI hesaplanarak bulundu. TOS ölçümü Erel tarafından geliştirilen tam otomatik kolorimetrik bir yöntem ile spektrofotometrik olarak ölçüldü [129]. Bu yöntemde numunede bulunan oksidanlar ferröz iyon-o-dianisidin kompleksini ferrik

iyona oksitlerler. Ortamda bulunan gliserol bu reaksiyonu hızlandırarak yaklaşık üç katına çıkarır. Ferrik iyonlar asidik ortamda "xylenol orange" ile renkli bir kompleks oluştururlar. Örnekte bulunan oksidanların miktarıyla orantılı olarak oluşan rengin şiddeti otoanalizörde spektrofotometrik olarak ölçülerek TOS sonuçları belirlendi.

3.2.12 Total Antioksidan Seviyesi Ölçümü

TAS ölçümü Erel tarafından geliştirilen güçlü serbest radikallere karşı vücudun total antioksidan kapasitesini ölçen bir metod ile spektrofotometrik olarak ölçüldü [130]. Bu yöntemde TAS düzeyi ölçülürken Fe^{+2}-o-dianisidin kompleksi hidrojen peroksit ile Fenton tipi reaksiyon oluşturarak OH radikalini oluşturur. Bu güçlü reaktif oksijen türü indirgenerek düşük pH'da renksiz o-dianisidin molekülüyle reaksiyona girer ve kahverengi-sarı renkli dianisidil radikalleri oluşur. Dianisidil radikalleri ileri oksidasyon reaksiyonlarına katılarak renk oluşumunu artırır. Ancak örneklerdeki antioksidan bileşikler bu oksidasyon reaksiyonlarını bastırarak renk oluşumunu azaltmaktadır. Bu düşüş otomatik analizörde spektrofotometrik olarak ölçülerek TAS sonuçları belirlendi. Dokulardaki TOS TAS'a oranlanarak OSI hesaplandı[131].

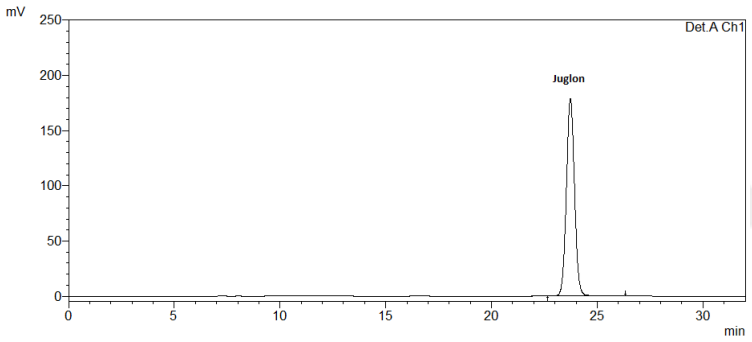
3.2.13 İstatistiksel Analiz

Bu çalışmanın Güç Analizi (Power Analysis) yapılan literatür taraması neticesinde etki genişliği 0,60 seçilerek [132], $p<0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edilerek, çalışmanın gücü %80 olacak şekilde ve 6 deney grubu üzerinden G-Power programı kullanılarak yapıldı. Yapılan analiz sonucu toplam denek sayısının 41 adet olması planlandı. Çalışma neticesinde gruplardan elde edilen sayısal veriler doğrultusunda ortalamalar ve standart sapmalar hesaplandı. Grupların kendi içindeki dağılımları non-parametrik bir test olan Shapiro-Wilk Testi ile değerlendirildi. Dağılımın normal olması durumunda gruplar arası değerlendirme one-way ANOVA, ikili karşılaştırmalar ise Tukey's HSD testiyle sağlandı. Normal dağılım göstermeyen gruplar Kruskal-Wallis testi, ikili karşılaştırmaları ise Mann-Whitney U ile değerlendirildi. Gruplar arasındaki istatistiki farklar * = $p<0,05$; ** = $p<0,01$; *** = $p<0,001$; **** = $p<0,0001$ şeklinde ifade edildi. Tüm istatistiksel analizler IBM SPSS 25.0 ve GraphPad Prism 9 programları kullanılarak yapıldı.

4
SONUÇ VE ÖNERİLER

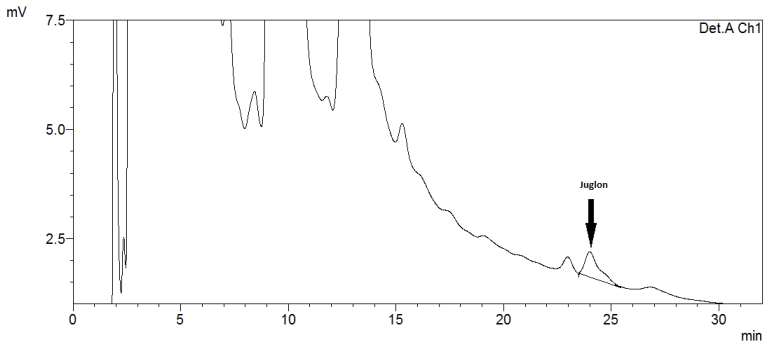
4.1 HPLC Analizi

Hazırlanmış 100 ppm konsantrasyonunda juglon standartının HPLC grafiği Şekil 4.1'de belirtilmiştir. Juglonun metod kısmında belirtilen koşullarda kromotografi kolonunda tutulma süresi yaklaşık 24 dakika olarak saptandı.



Şekil 4.1 Juglon standart kromotogramı

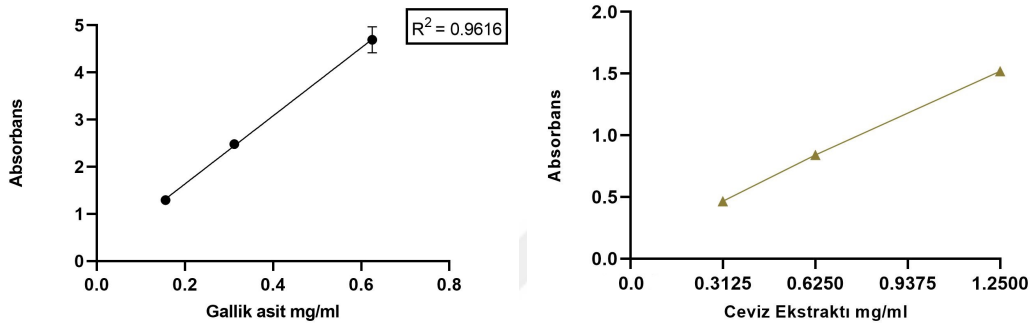
Cevizin meyvesinin kromotogramı Şekil 4.2'de gösterilmiştir. Hesaplamalar sonucu ceviz meyvesinin juglon içeriği 961.89 µg/100g olarak ölçüldü.



Şekil 4.2 Ceviz meyvesi juglon kromotogramı

4.2 Total Fenolik İçerik Seviyesi

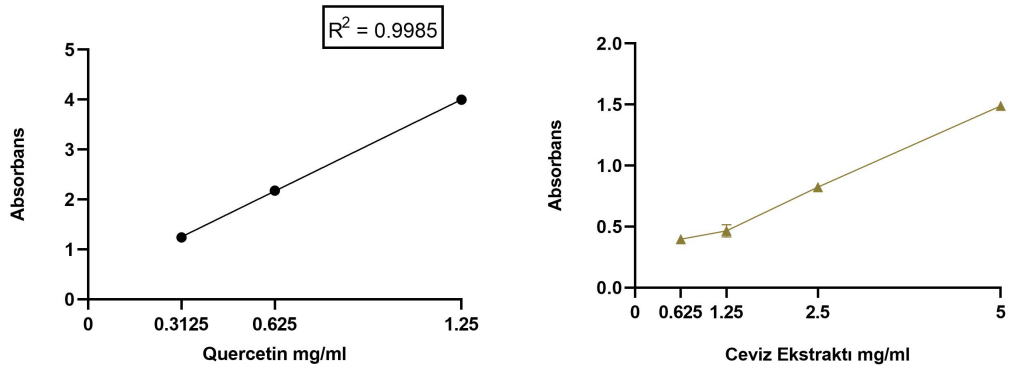
Fenolik içerik tayini için gallik asit standart olarak kullanıldı. Ceviz ekstraktının 0,3125, 0,6125 ve 1,25 mg/ml sulu çözeltilerinde ölçülen absorbans değerleri Şekil 4.3'de belirtilmiştir. Total fenolik bileşik içerik 0,3125, 0,6125 ve 1,25 mg/ml konsantrasyonlarında sırasıyla 94,87, 105,59 ve 105,62 mg gallik asit Eq/g'a eşit olarak bulundu. Hesaplamalar sonucu ceviz ekstraktının gramında ortalama 102,02 ± 5,06 mg gallik asite denk fenolik içerik tespit edildi.



Şekil 4.3 Fenolik bileşik standart eğrisi ve farklı konsantrasyonlarda ceviz ekstraktlarındaki absorbans değerleri

4.3 Total Flavonoid İçerik Seviyesi

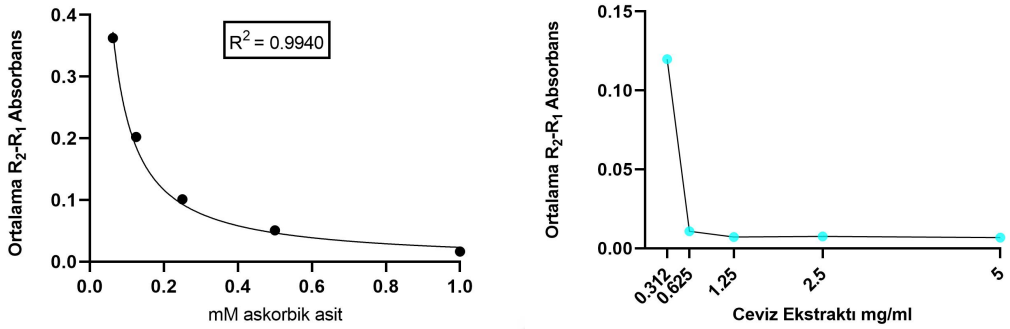
Ekstrakttaki total flavonoid tayini için quercetin standart olarak kullanıldı. Ceviz ekstraktının 0,625, 1,25, 2,5 ve 5 mg/ml sulu çözeltilerinde ölçümlenen absorbans değerleri Şekil 4.4'de belirtilmiştir. Total flavonoid içerik sırasıyla 3,43, 3,61, 6,67 ve 7,87 mg quercetin Eq/g'a eşit olarak hesaplandı. Ceviz ekstraktının gramında ortalama 5,40 ± 1,92 mg quercetine denk flavonoid olduğu belirlendi.



Şekil 4.4 Flavonoid bileşik standart eğrisi ve farklı konsantrasyonlardaki ceviz ekstraktlarının absorbans değerleri

4.4 Total Antioksidan İçerik Seviyesi

C vitamini TAS belirlenmesi amacıyla standart olarak kullanıldı. Ceviz ekstraktının 0,3125, 0,625, 1,250, 2,5 ve 5 mg/ml sulu çözeltilerinde ölçülen R_2-R_1 absorbans değeri Şekil 4.5'de belirtilmiştir. Çalışılan dozlardaki TAS sırasıyla 2,94, 4,84, 4,92, 4,91 ve 4,93 mM askorbik asit Eq/L'e eşit olarak bulundu.



Şekil 4.5 TAS standart eğrisi ve farklı konsantrasyonlarda ceviz ekstraktlarındaki R_2-R_1 absorbans değerleri

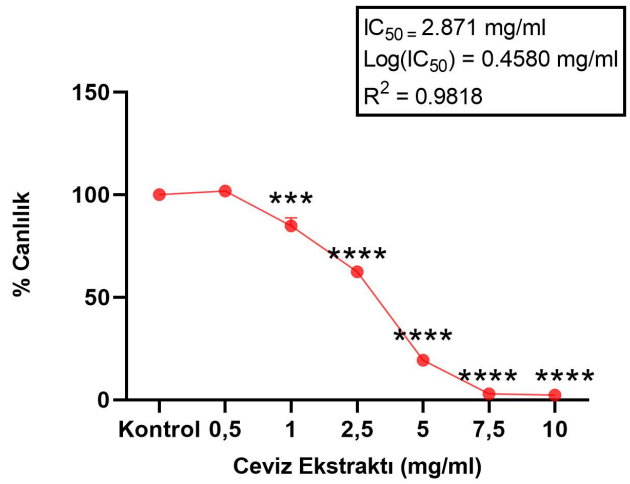
4.5 ATP Canlılık Testi Sonuçları

Ceviz ekstraktı (0,5mg/ml-10mg/ml) ve juglonun (1µM-100µM) sitotoksik etkisini belirleyebilmek amacıyla farklı konsantrasyonları L929 fare fibroblast hücre hatlarına 24 saat ve 48 saat olmak üzere uygulandı.

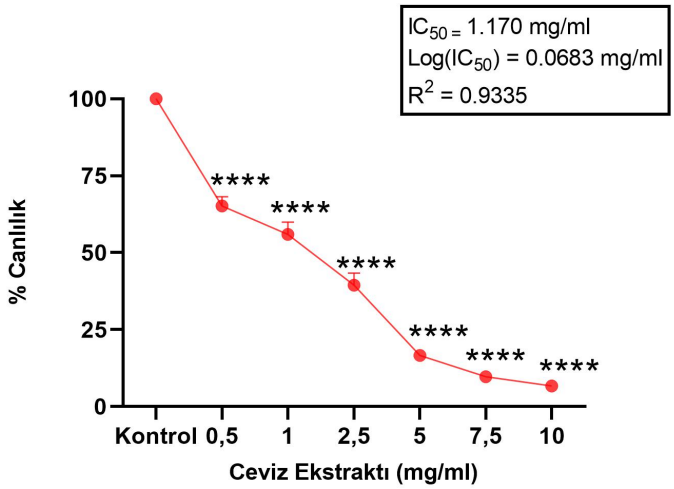
0,5 mg/ml, 1 mg/ml, 2,5 mg/ml, 5 mg/ml, 7,5 mg/ml ve 10 mg/ml konsantrasyonlarında ceviz ekstraktı uygulanan hücrelerde 24 saatte canlılık sırasıyla %101,84, %84,81, %62,41, %19,25, %2,937 ve %2,34 (Şekil 4.6) olarak belirlenirken 48 saatte ise sırasıyla %65,19, %55,98, %39,43, %16,59, %9,72 ve %6,69 (Şekil 4.7) olarak belirlendi. Ceviz ekstraktının L929 hücre hattında IC_{50} dozları 24 saat 2,871 mg/ml 48 saatte ise 1,17 mg/ml olarak bulundu.

24 saat ceviz ekstraktı uygulanan hücre hatlarında 7,5 mg/ml ve 10 mg/ml dozları arası haricinde tüm konsantrasyonların birbiri arasında $p<0,05$ düzeyinde istatistiki olarak anlamlı bir fark bulundu. 48 saat ceviz ekstraktı uygulanmış hücre hatlarında ise 0,5 mg/ml ile 1mg/ml dozları arasında ve 5 mg/ml, 7,5 mg/ml ve 10 mg/ml dozları aralarında hücre canlılığı üzerine istatistiki anlamlı bir fark belirlenemezken diğer tüm ikili karşılaştırmalarda $p<0,05$ düzeyinde anlamlı fark gözlemlendi.

24 saat ve 48 saat ceviz ekstraktı uygulanmış hücre hatlarının canlılık düzeyleri arasındaki fark Şekil 4.8'de belirtildi. 0,5 mg/ml ve 1 mg/ml dozları uygulanan hücrelerdeki canlılık 48 saat sonunda 24 saate göre anlamlı ölçüde azaldığı



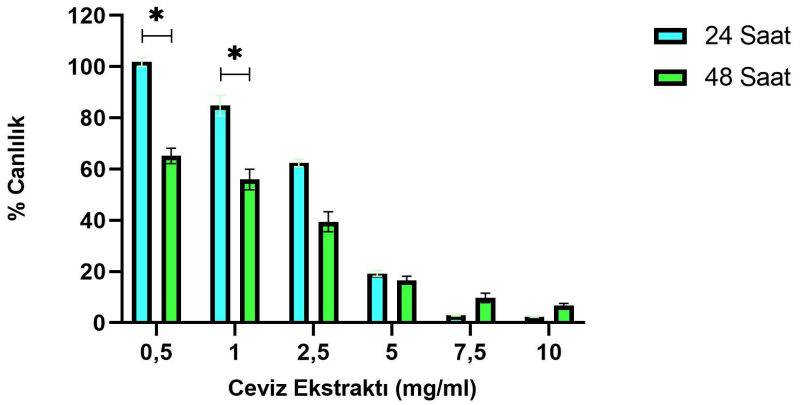
Şekil 4.6 Farklı konsantrasyonlardaki ceviz ekstraktlarının 24 saatteki ATP canlılık grafiği



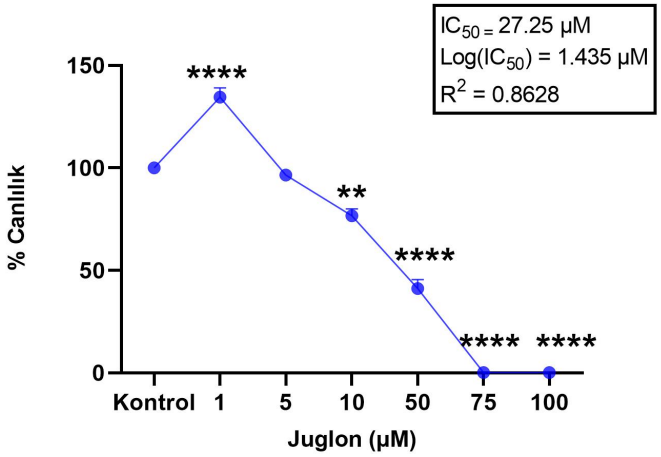
Şekil 4.7 Farklı konsantrasyonlardaki ceviz ekstraktlarının 48 saatteki ATP canlılık grafiği

gözlemlendi. 2,5 mg/ml ve 5 mg/ml ceviz ekstraktı uygulanan hücrelerde canlılık 24 saatte 48 saate göre daha fazla olmasına karşın bu fark istatistiki olarak yeterli bulunmadı. 7,5 mg/ml ve 10 mg/ml ceviz ekstraktı uygulanan hücrelerde ise 48 saatte canlılık 24 saate göre daha yüksek bulundu ancak bu fark da istatistiki olarak anlamlı değerlendirilmedi.

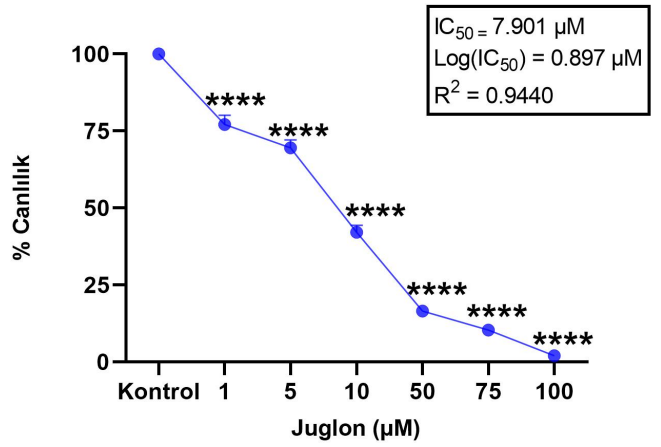
1 µM, 5 µM, 10 µM, 50 µM, 75 µM ve 100 µM konsantrasyonlarında juglon uygulanan hücrelerde 24 saatte canlılık sırasıyla %134,61, %96,52, %76,65, %41,13, %0,24 ve %0,17 olarak saptandı (Şekil 4.9). 48 saatteki canlılık ise sırasıyla %77,08, %69,54, %42,08, %16,54, %10,35 ve %2 olarak bulundu (Şekil 4.10). Juglonun L929 hücre hattında IC_{50} dozları 24 saatte 27,25 µM, 48 saatte ise 7,901 µM olarak belirlendi.



Şekil 4.8 24 ve 48 saat ceviz ekstraktı uygulanmış hücrelerdeki canlılık



Şekil 4.9 Juglonun 24 saatteki ATP canlılık grafiği

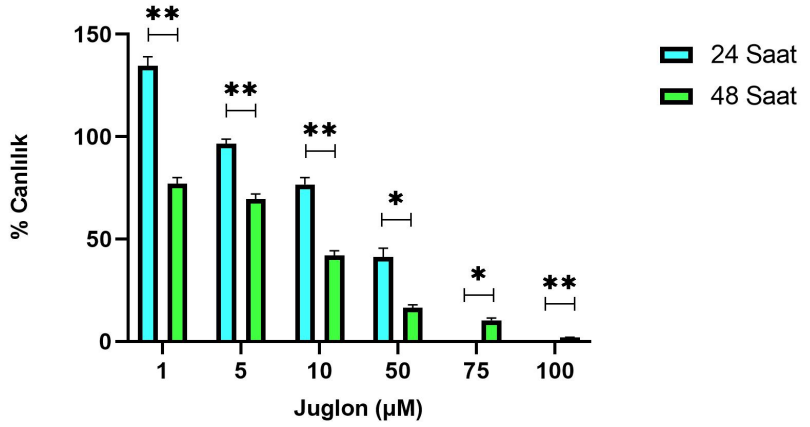


Şekil 4.10 Juglonun 48 saatteki ATP canlılık grafiği

24 saat çeşitli konsantrasyonlarda juglon uygulanmış hücre hatlarında 75 µM ve 100 µM konsantrasyonları arası haricinde tüm dozlar arası ikili karşılaştırmalarda hücre canlılığı bakımından $p<0,05$ düzeyinde istatistiki olarak anlamlı bir fark bulundu. 48

saat juglon uygulanan hücrelerde ise 1 µM ile 5 µM, 50 µM ile 75 µM ve 75µM ile 100 µM konsantrasyonları arası haricinde tüm ikili karşılaştırmalarda hücre canlılığı yönüyle istatistiki anlamlı bir fark bulundu.

24 saat ve 48 saat farklı konsantrasyonlarda juglon uygulanmış hücre hatlarının canlılık düzeyleri arasındaki ilişki Şekil 4.11'de gösterilmiştir. 1 µM, 5 µM, 10 µM ve 50 µM konsantrasyonlarında juglon uygulanmış hücre hatlarında canlılık 24 saatte 48 saate göre önemli ölçüde daha yüksek bulundu. 75 µM ve 100 µM dozlarında ise canlılığın diğer dozların aksine 48 saatte 24 saate göre anlamlı ölçüde daha yüksek olduğu saptandı.

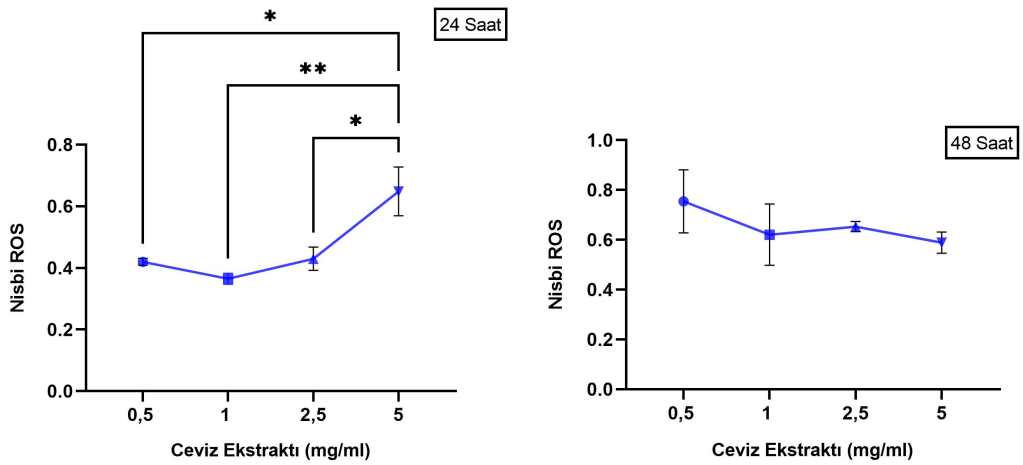


Şekil 4.11 24 ve 48 saat juglon uygulanan hücrelerdeki canlılık

4.6 ROS Düzeyleri

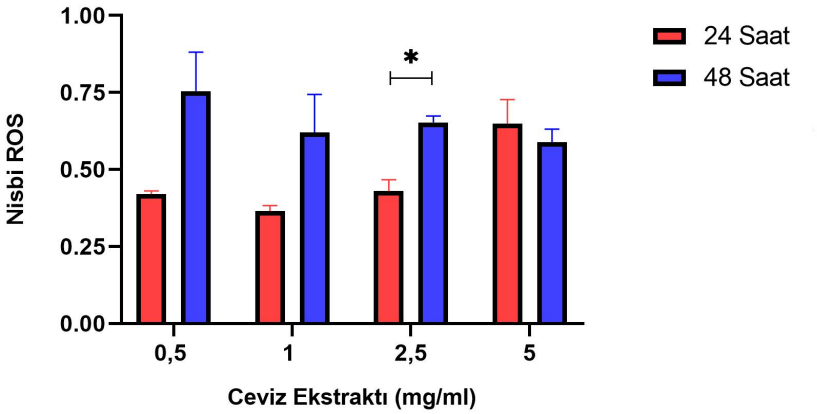
Ceviz ekstraktı (0,5 mg/ml, 1 mg/ml, 2,5 mg/ml, 5 mg/ml) ve juglonun (1 µM, 5 µM, 10 µM, 50 µM) farklı konsantrasyonları L929 hücre hatları üzerine uygulanıp hücre içi ROS üretimi araştırıldı. ROS ölçümü indirgendiğinde floresans özellik gösteren H_2DCFH-DA molekülü kullanılarak belirlendi. Ceviz ekstraktının 24 ve 48 saatlik periyotlarda ROS üretimi Şekil 4.12'de kontrol grubuna göre nisbi olarak ifade edilmiştir. Juglonun farklı konsantrasyonlarının hücre içi ROS üretimine etkisi 24 ve 48 saatlik periyotlarda Şekil 4.14'de gösterilmiştir.

24 saatlik çeşitli konsantrasyonlardaki ceviz ekstraktıyla inkübasyon sonucu hücre içi ROS düzeyinin ceviz ekstraktının artan konsantrasyonuyla arttığı saptandı. Ancak yalnızca 5 mg/ml konsantrasyonunda ceviz ekstraktı uygulanan hücre grubu ile diğer gruplar arasında ROS üretiminde istatistiki anlamlı bir fark meydana geldi. 48 saatlik periyotta ROS üretimi 24 saatin aksine artan ceviz ekstrakt konsantrasyonuyla artış göstermedi. 5 mg/ml ceviz ekstraktı uygulananan hücrelerdeki ROS üretimi diğer gruplara kıyasla daha düşük ölçülse de bu fark istatistiki olarak anlamlı bulunamadı.



Şekil 4.12 Ceviz ekstraktının L929 hücrelerinde ROS'a etkisi

24 saat ve 48 saatlik ROS üretimleri kendi aralarında karşılaştırıldığında yalnızca 5 mg/ml ceviz ekstraktı uygulanan hücrelerdeki ROS üretiminin 48 saatte 24 saate nazaran düşük olduğu tespit edildi. 0,5 mg/ml, 1 mg/ml ve 2,5 mg/ml dozlarında 48 saatteki ROS üretimi 24 saate kıyasla yüksek bulundu (Şekil 4.13).

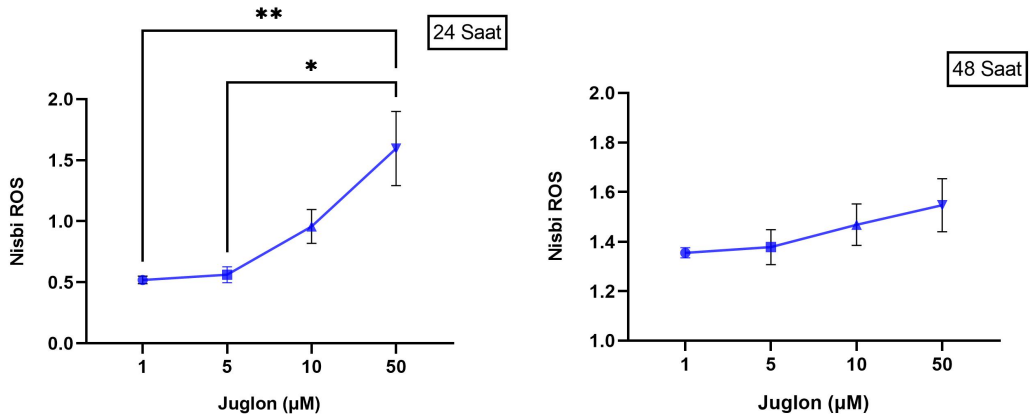


Şekil 4.13 24 ve 48 saat ceviz ekstraktı uygulanan hücrelerdeki ROS düzeyleri

24 saatlik periyotta artan juglon konsantrasyonları ile hücre içi ROS miktarının çeşitlilik gösterdiği belirlendi. 1 µM, 5 µM, 10 µM ve 50 µM juglon uygulanan hücrelerde hücre içi ROS miktarının artan juglon konsantrasyonuyla arttığı tespit edildi. 50 µM juglon uygulanan hücrelerdeki ROS miktarı 1 µM ve 5 µM gruplarına göre anlamlı ölçüde yüksek bulundu.

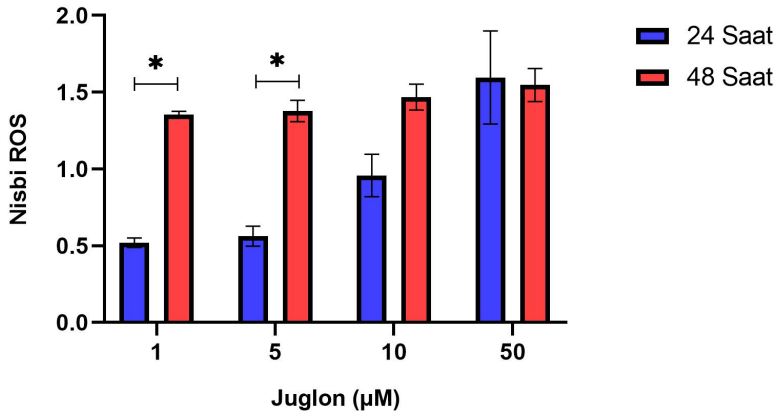
48 saatlik süreçte de ROS üretimi artan juglon konsantrasyonuyla artış gösterdi. Ancak bu fark istatistiksel anlamlı bir fark oluşturmaya yeterli gelmedi.

24 saatlik ve 48 saatlik periyotlardaki ROS üretimleri kendi aralarında karşılaştırıldığında 1 µM ve 5 µM juglon uygulanan hücrelerde ROS üretiminin



Şekil 4.14 Juglonun L929 hücrelerinde ROS'a etkisi

48 saatte 24 saate kıyasla önemli ölçüde daha yüksek olduğu saptandı. 10 µM juglon uygulanan hücrelerde de ROS miktarı 48 saatte 24 saate kıyasla daha yüksek bulundu. Ancak bu farkın istatistiksel olarak önemli olmadığı tespit edildi. 50 µM juglon uygulanan hücrelerde ise 24 ve 48 saatin sonunda üretilen ROS'ların hemen hemen eşit olduğu saptandı (Şekil 4.15).



Şekil 4.15 24 ve 48 saat juglon uygulanan hücrelerdeki ROS düzeyleri

4.7 Doku Total Protein Düzeyleri

Rat beyin ve karaciğer dokusu total protein seviyesini belirlemek için metod kısmında tarif edilen şekilde doku homejenatı elde edildi. BSA protein standartı olarak kullanıldı. Kolorimetrik bir yöntem olan Bradford assay yöntemiyle doku protein miktarları ölçüldü. Ölçülen beyin protein miktarları Tablo 4.1'de, karaciğer protein miktarları ise Tablo 4.2'de belirtilmiştir. Değerler ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir. Doku protein düzeyleri ölçülen parametrelerin miktarlarının mg protein başına ifade edilmesi amacıyla kullanıldı.

Tablo 4.1 Beyin dokusu protein miktarları

	Kontrol	J 0,1 mg/kg	J 1 mg/kg	J 10 mg/kg	CE 300 mg/kg	CE 300 mg/kg + J 1mg/kg
Protein Konsantrasyonu (mg/ml)	10,46 ± 2,29	10,02 ± 0,33	10,19 ± 0,27	10,15 ± 0,41	9,96 ± 0,73	9,67 ± 0,37

Tablo 4.2 Karaciğer dokusu protein miktarları

	Kontrol	J 0,1 mg/kg	J 1 mg/kg	J 10 mg/kg	CE 300 mg/kg	CE 300 mg/kg + J 1mg/kg
Protein Konsantrasyonu (mg/ml)	13,70 ± 0,30	13,83 ± 0,42	13,94 ± 0,57	14,05 ± 0,67	14,70 ± 0,40	14,30 ± 0,58

4.8 Biyokimyasal Kan Parametreleri

Ceviz ekstraktı ve juglonun ratlardaki karaciğer ve böbrek üzerine etkilerini inceleyebilmek amacıyla fonksiyon testleri yapıldı. Karaciğer fonksiyon testi olarak ALT ve AST enzimleri, böbrek fonksiyon testi olarak üre ve kreatinin seviyeleri ölçüldü. Biyokimyasal kan parametreleri değerleri Tablo 4.3'de ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir.

Tablo 4.3 Biyokimyasal kan parametreleri

	Kontrol	J 0,1 mg/kg	J 1 mg/kg	J 10 mg/kg	CE 300 mg/kg	CE 300 mg/kg + J 1mg/kg
ALT(U/L)	48.00 ± 4,60	44,28 ± 3,77	45 ± 6,90	42,71 ± 5,21	43,42 ± 3,77	48,28 ± 5,90
AST(U/L)	99,17 ± 25,38	87,28 ± 12,13	93,28 ± 10,06	81 ± 9*	73,71 ± 12,49**	87,42 ± 14,02
Üre(mg/dL)	36,83 ± 2,64	37,71 ± 2,21	36,14 ± 5,42	35,42 ± 3,69	34,28 ± 5,02	35,85 ± 2,73
Kreatinin(mg/dL)	0,5 ± 0,04	0,47 ± 0,02	0,51 ± 0,05	0,48 ± 0,02	0,51 ± 0,07	0,48 ± 0,02

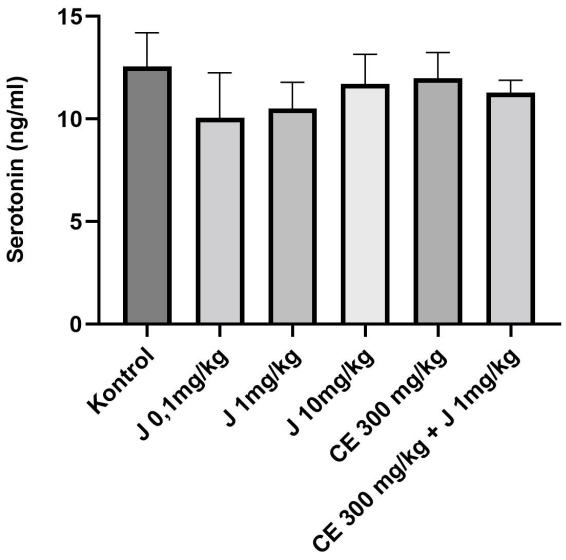
ALT seviyesinin J 10mg/kg ve CE 300mg/kg gruplarında diğer gruplara nazaran bir miktar düşük olduğu belirlendi. Ancak bu fark istatistiksel olarak yeterli büyüklükte bulunamadı. AST seviyesinin gruplar arasında oldukça değişkenlik gösterdiği saptandı. Kontrol grubunda AST 99,17 U/L ölçülürken J 10mg/kg grubunda 81 U/L,

CE 300mg/kg grubunda 73,71 U/L ölçüldü. J 10mg/kg ile CE 300mg/kg gruplarında AST seviyesi istatistiksel olarak anlamlı ölçüde düşük bulundu.

Böbrek fonksiyon testi kapsamında üre ve kreatinin seviyelerine bakıldığında iki parametrede de gruplar arasında belirgin bir fark bulunmadığı belirlendi.

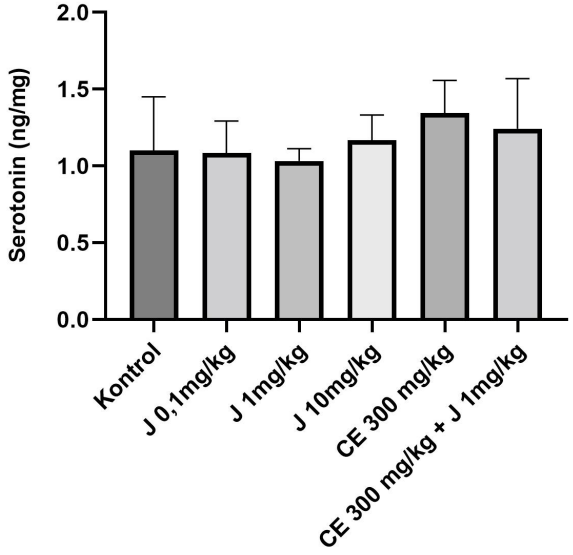
4.9 Serum ve Beyin Serotonin Düzeyleri

Ratlarda serum ve beyin dokusundaki serotonin miktarı çift antikorlu sandviç ELISA ile belirlendi. Serum ve beyin dokusundaki serotonin miktarları Tablo 4.4'te ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir. Serum serotonin ortalama seviyeleri kontrol grubunda 12,56 ng/ml, J 0,1mg/kg grubunda 10,07 ng/ml, J 1mg/kg grubunda 10,50 ng/ml, J 10mg/kg grubunda 11,71 ng/ml, CE 300mg/kg grubunda 11,99 ng/ml ve CE 300mg/kg + J 1mg/kg grubunda 11,29 ng/ml olarak ölçüldü (Şekil 4.16). Gruplar arası serum serotonin düzeyleri karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilmedi. Beyin dokusundaki ortalama serotonin seviyeleri



Şekil 4.16 Serum serotonin seviyeleri

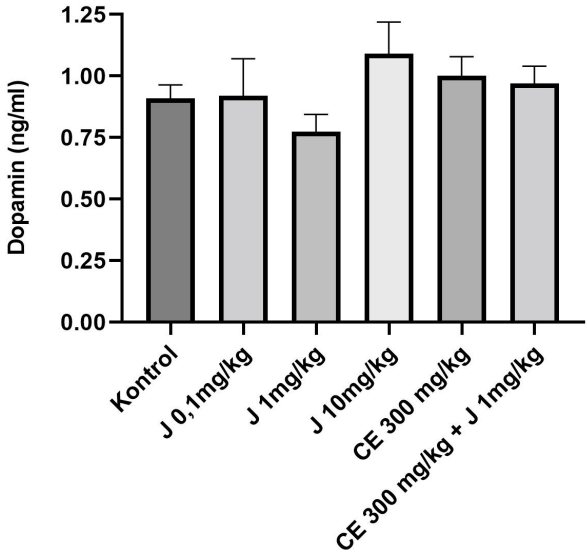
kontrol grubunda 1,10 ng/mg, J 0,1mg/kg grubunda 1,08 ng/mg, J 1mg/kg grubunda 1,03 ng/mg, J 10mg/kg grubunda 1,16 ng/mg, CE 300mg/kg grubunda 1,34 ng/mg ve CE 300mg/kg + J 1mg/kg grubunda 1,24 ng/mg olarak ölçüldü (Şekil 4.17). CE 300mg/kg ve CE 300mg/kg + J 1mg/kg gruplarındaki ratlarda beyin serotonin seviyesi diğer gruplara nazaran daha yüksek olsa da gruplar arasında istatistiksel olarak önemli bir fark saptanmadı.



Şekil 4.17 Beyin serotonin düzeyleri

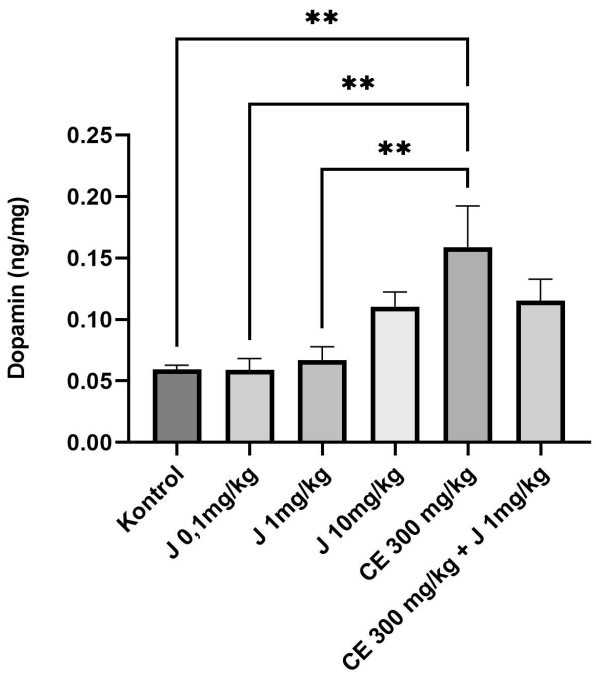
4.10 Serum ve Beyin Dopamin Düzeyleri

Serum ve beyin dokusundaki dopamin miktarı çift antikorlu sandviç ELISA ile ölçüldü. Serum ve beyin dokusundaki dopamin miktarları Tablo 4.4'te ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir. Serum ortalama dopamin seviyeleri kontrol grubunda 0,90 ng/ml, J 0,1mg/kg grubunda 0,91 ng/ml, J 1mg/kg grubunda 0,77 ng/ml, J 10mg/kg grubunda 1,09 ng/ml, CE 300mg/kg grubunda 1,00 ng/ml ve CE 300mg/kg + J 1mg/kg grubunda 0,96 ng/ml olarak tespit edildi (Şekil 4.18). J 10mg/kg grubu ile CE 300mg/kg grubundaki ratlarda serum dopamin düzeyleri bir miktar daha yüksek bulunmasına karşın bu fark istatistiki olarak anlamlı bulunmadı.



Şekil 4.18 Serum dopamin seviyeleri

Beyin ortalama dopamin seviyeleri kontrol grubunda 0,059 ng/mg, J 0,1mg/kg grubunda 0,058 ng/mg, J 1mg/kg grubunda 0,066 ng/mg, J 10mg/kg grubunda 0,110 ng/mg, CE 300mg/kg grubunda 0,158 ng/mg ve CE 300mg/kg + J 1mg/kg grubunda 0,115 ng/mg olarak saptandı (Şekil 4.19). Beyin dopamin seviyeleri J 10mg/kg, CE 300mg/kg ve CE 300mg/kg + J 1mg/kg gruplarında diğer gruplara nazaran önemli ölçüde yüksek bulundu.



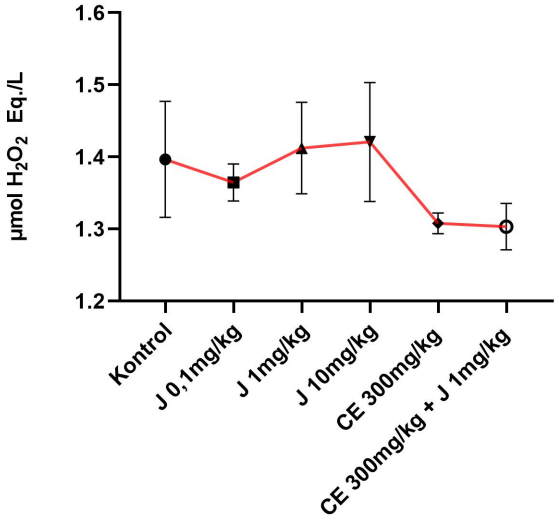
Şekil 4.19 Beyin dopamin seviyeleri

Tablo 4.4 Serum ile beyin dokusu serotonin ve dopamin seviyeleri

	Kontrol	J 0,1 mg/kg	J 1 mg/kg	J 10 mg/kg	CE 300 mg/kg	CE 300 mg/kg + J 1mg/kg
Serum Serotonin (ng/ml)	12,56 ± 3,66	10,07 ± 5,34	10,5 ± 3,14	11,71 ± 3,55	11,99 ± 2,80	11,29 ± 1,46
Beyin Serotonin (ng/mg)	1,10 ± 0,78	1,08 ± 0,51	1,03 ± 0,19	1,16 ± 0,40	1,34 ± 0,47	1,24 ± 0,80
Serum Dopamin (ng/ml)	0,9 ± 0,12	0,91 ± 0,36	0,77 ± 0,17	1,09 ± 0,31	1 ± 0,17	0,96 ± 0,17
Beyin Dopamin (ng/mg)	0,059 ± 0,007	0,058 ± 0,023	0,066 ± 0,026	0,110 ± 0,029	0,158 ± 0,07**	0,115 ± 0,04

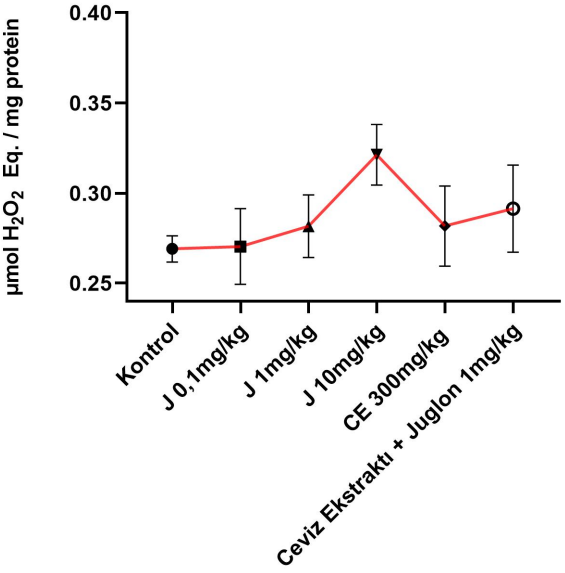
4.11 Total Oksidan Seviye

Serum, beyin ve karaciğer dokularında TAS ve TOS fotometrik olarak ölçüldü. Ölçülen değerler Tablo 4.5'te ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir. Serumda TOS CE 300mg/kg ve CE 300mg/kg + J 1mg/kg gruplarında bir miktar daha düşük ölçülse de genel olarak gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlemlenmedi (Şekil 4.20). Beyin dokusunda TOS J 10mg/kg grubunda diğer gruplara nazaran bir



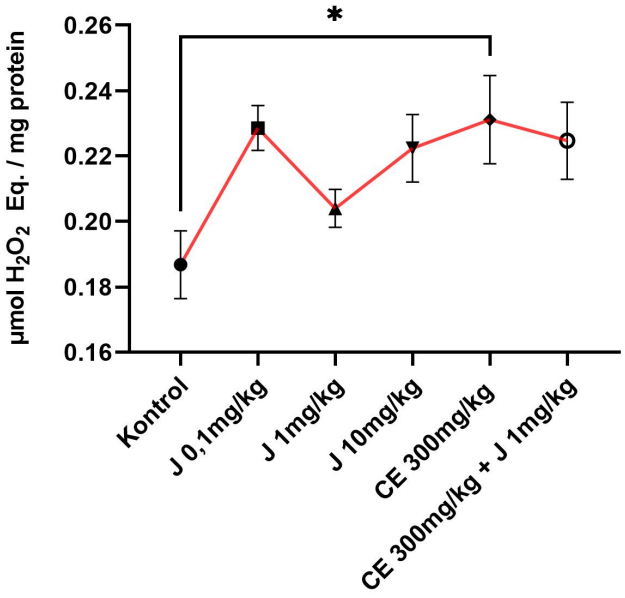
Şekil 4.20 Serum TOS seviyeleri

miktar daha fazla tespit edilse de seruma benzer şekilde beyinde de seruma parelel şekilde TOS seviyeleri arasında gruplar arası istatistiki olarak önemli bir fark oluşmadı (Şekil 4.21). Karaciğer dokularında ise TOS düzeylerinin gruplar arasında çeşitlilik



Şekil 4.21 Beyin TOS seviyeleri

gösterdiği saptandı. CE 300mg/kg grubunda TOS'un kontrol grubuna göre kıyasla önemli ölçüde yüksek olduğu bulundu (Şekil 4.22).



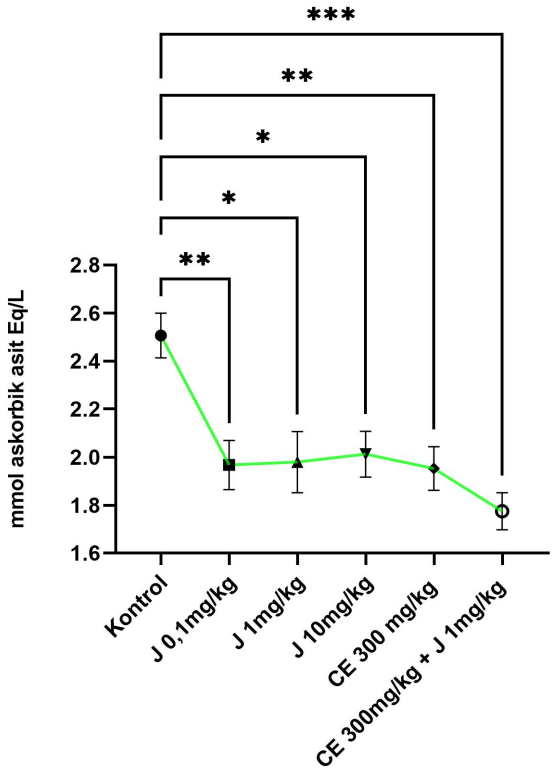
Şekil 4.22 Karaciğer TOS seviyeleri

4.12 Total Antioksidan Seviye

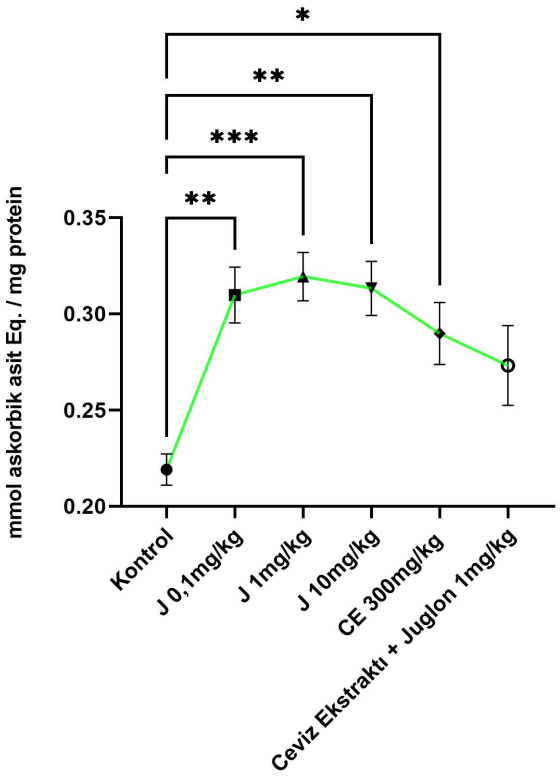
Serum TAS seviyesinin kontrol grubunda juglon ve ceviz ekstraktı uygulanmış gruplara göre istatistiksel olarak önemli ölçüde yüksek olduğu belirlendi (Şekil 4.23). Beyin TAS seviyeleri ise serumun aksine ceviz ekstraktı ve juglon uygulanan tüm gruplarda kontrol grubuna kıyasla yüksek bulundu. Juglonun farklı konsantrasyonlarının uygulandığı gruplar ile kontrol grubu arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu. Juglon uygulanan gruplardaki TAS seviyesinin genel olarak ceviz ekstraktı uygulanan gruplardan daha fazla olduğu belirlendi (Şekil 4.24). Karaciğer TAS seviyeleri ceviz ekstraktı ve juglon uygulanan gruplarda kontrole göre istatistiksel anlamlı olarak %50 daha yüksek bulundu. Karaciğer dokusunda genel olarak juglon uygulanan gruplarda TAS'ın ceviz ekstraktı uygulanan gruplara göre daha fazla olduğu saptandı. J 1mg/kg grubu ile CE 300mg/kg grubu arasında anlamlı bir fark belirlendi (Şekil 4.25).

4.13 Oksidatif Stres İndeksi

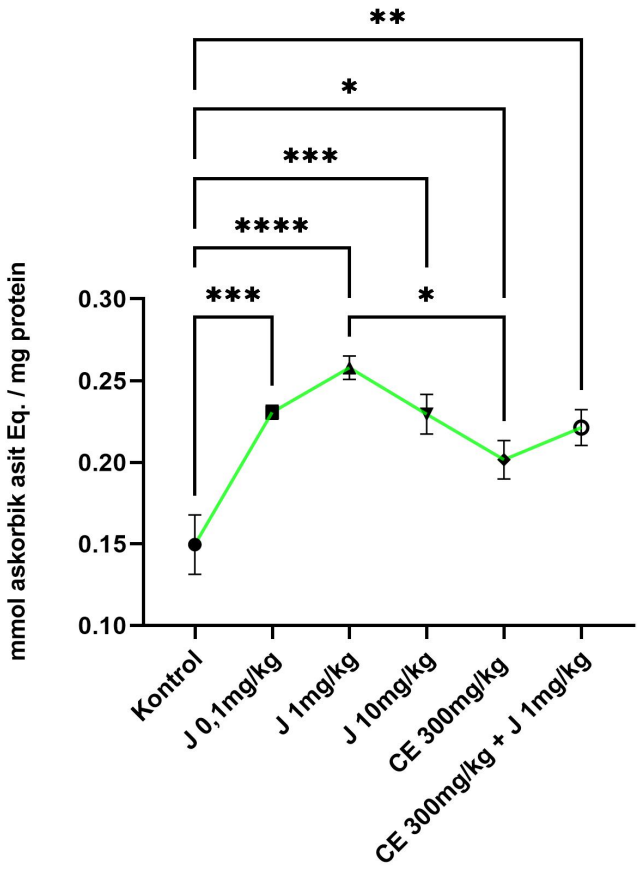
OSI serum, beyin ve karaciğer dokularında ölçülen TOS miktarının TAS miktarına sayısal olarak bölünmesiyle bulundu. Kontrol grubu ile J 0,1mg/kg, J 1mg/kg, J



Şekil 4.23 Serum TAS seviyeleri



Şekil 4.24 Beyin TAS seviyeleri

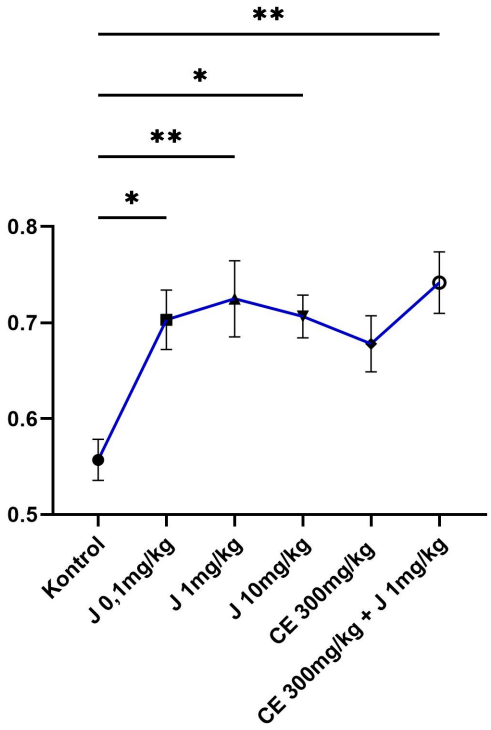


Şekil 4.25 Karaciğer TAS seviyeleri

Tablo 4.5 Serum ve dokuların TAS ile TOS seviyeleri

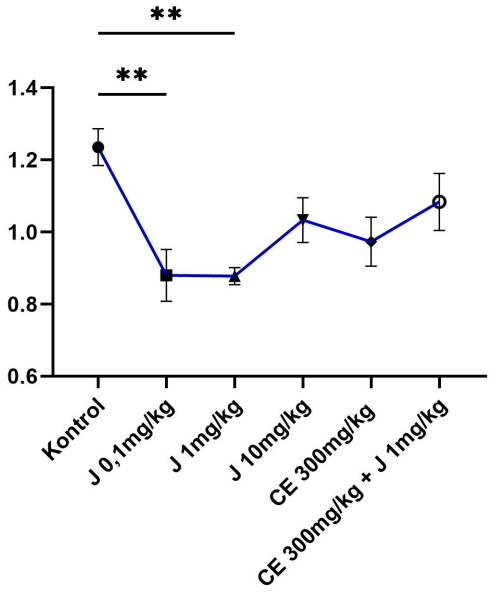
	Kontrol	J 0,1 mg/kg	J 1 mg/kg	J 10 mg/kg	CE 300 mg/kg	CE 300 mg/kg + J 1mg/kg
Serum TAS (mmol askorbik asit Eq/L)	2,50 ± 0,22	1,96 ± 0,27**	1,97 ± 0,33*	2,01 ± 0,25*	1,95 ± 0,24**	1,77 ± 0,20***
Beyin TAS (mmol askorbik asit Eq/mg protein)	0,22 ± 0,02	0,31 ± 0,04**	0,32 ± 0,03***	0,31 ± 0,04**	0,29 ± 0,04*	0,27 ± 0,05
Karaciğer TAS (mmol askorbik asit Eq/mg protein)	0,15 ± 0,04	0,23 ± 0,01***	0,25 ± 0,02****	0,23 ± 0,03****	0,20 ± 0,03*	0,22 ± 0,03**
Serum TOS (μmol H_2O_2 Eq/L)	1,39 ± 0,19	1,36 ± 0,06	1,41 ± 0,16	1,42 ± 0,21	1,30 ± 0,03	1,30 ± 0,08
Beyin TOS (μmol H_2O_2 Eq/mg protein)	0,27 ± 0,02	0,27 ± 0,05	0,28 ± 0,04	0,32 ± 0,04	0,28 ± 0,05	0,29 ± 0,06
Karaciğer TOS (μmol H_2O_2 Eq/mg protein)	0,18 ±0,02	0,23 ± 0,02	0,20 ± 0,01	0,22 ± 0,03	0,23 ± 0,03*	0,23 ± 0,03

10mg/kg ve CE 300mg/kg + J 1mg/kg grupları arasında OSI'nin önemli ölçüde fark gösterdiği belirlendi. Kontrol grubu serumlarında OSI'nin diğer gruplara göre önemli ölçüde düşük olduğu hesaplandı (Şekil 4.26).



Şekil 4.26 Serum TOS/TAS oranları

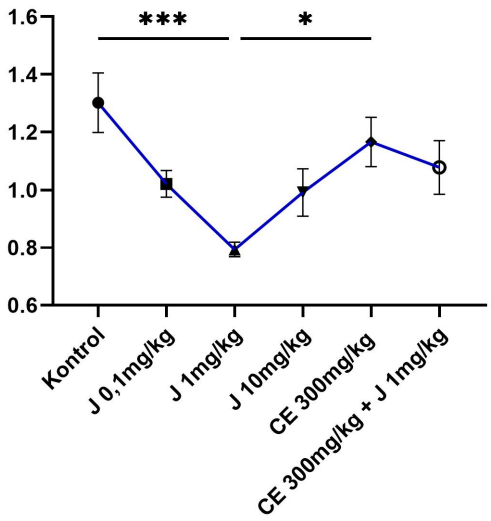
Beyin dokusundaki OSI'nin ceviz ekstraktı ve juglon uygulanan ratlarda daha düşük olduğu tespit edildi. J 0,1mg/kg ve J 1mg/kg gruplarında OSI kontrol grubuyla göre önemli biçimde düşük bulundu (Şekil 4.27). Karaciğer dokusundaki OSI'nin beyin



Şekil 4.27 Beyin dokusu TOS/TAS oranları

dokusuna benzer şekilde ceviz ekstraktı ve juglon uygulanan gruplarda daha düşük olduğu belirlendi. Salt juglon uygulanan gruplardaki OSI ceviz ekstraktı uygulanan

gruplara göre düşük bulundu. J 1mg/kg grubu ile kontrol ve CE 300mg/kg grupları arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu tespit edildi (Şekil 4.28) .



Şekil 4.28 Karaciğer dokusu TOS/TAS oranları

4.14 Tartışma ve Öneriler

Merkezi sinir sisteminde serotonin ve dopaminin dahil olduğu monoaminlerin nörotransmisyonu ruh halinin düzenlenmesi, psikolojik strese tepki, öz kontrol, motivasyon ve bilişsel fonksiyonlar üzerinde önemli etkiler göstermektedir [133]. Depresyonun beyindeki monoaminlerle ilişkili olduğu fikri ilk olarak 1960'lı yıllarda monoamin hipotezi adıyla ortaya atılmıştır. Bu hipotez depresyonun biyolojik temellerini beyindeki monoamin nörotransmitterlerinin eksikliğiyle açıklamaktadır [45][134]. Hipotezi temel alarak sinaptik boşlukta monoaminlerin degradasyonlarını inhibe eden veya geri alımlarını bloke ederek monoamin miktarını arttıran, günümüzde de kullanılan çeşitli türde antidepresanlar geliştirilmiştir. Ancak monoamin hipotezinin günümüzde açıklamakta zorlandığı birkaç durum mevcuttur. Bunlardan biri tüm antidepresan ilaçların ortak özelliği olarak geç etki göstermesidir. Günümüzde kullanılan SSRI'lar serotonin transporterlarını saatler içinde inhibe etmesine rağmen antidepresanın etkisini göstermesi birkaç hafta almaktadır. Buna karşın antidepresanın yan etkileri en geç birkaç günde kendisini göstermektedir [135].

Antidepresanlarla ilgili bir diğer problem ise agonist olarak yaptığı non spesifik bağlanmalardır. Trisiklik antidepresanlar, buspiron ve gepiron gibi antidepresanlar postsinaptik membranda bulunan nörotransmitter reseptörlerini uyaracak şekilde geliştirilmiştir. Ancak bazen nonspesifik bir şekilde özellikle histaminerjik ve muskarinik reseptörlere bağlanabilmektedir [136][137].

Serotonin ve dopamin transmitterleri yalnızca mental süreçlerde değil nörodejeneratif ve nörolojik hastalıkların etiyolojisinde de karşımıza çıkmaktadır. Kronik ve geri döndürülemez bir hastalık olan Parkinson, en yaygın görülen ikinci nörodejeneratif hastalıktır. Parkinson ileri yaşlarla karakterize edilse de artan oranda gençlerde de görülebilmektedir. Dopaminerjik nöronların %50 - %60 oranındaki hasarı striatuma yeterince dopaminerjik sinyalin ulaşamamasına yol açar. Bu aşamadan sonra Parkinson hastalığının motor ve davranışsal semptomları ortaya çıkmaya başlar [138].

Günümüzde Parkinson hastalığının semptomatik tedavisinde dopamin miktarını arttırmak amacıyla çeşitli sınıflarda ilaçlar uygulanmaktadır. Dopamin öncü molekülü olan levodopa kullanılan ilaçlardan biridir. Tedavi levodopanın periferal etkisini inhibe etmek için genellikle benserazit ve karbidopa gibi dopa-dekarboksilaz inhibitörü ile birlikte kombine uygulanır. Bir diğer yaklaşım selegilin gibi MOA-B inhibitörleri kullanarak sinaptik boşluktaki dopaminin yıkılmasını engellemeye yöneliktir. Postsinaptik dopamin reseptörlerini bromokriptin ve lisurid gibi dopamin agonistleriyle uyarmak kullanılan bir başka yöntemdir [139].

Serotonin ve dopaminle ilişkili bir diğer nörolojik hastalığın şizofreni olduğu düşünülmektedir. Şizofreninin sebebi kesin olarak bilinmemekle beraber şizofreniyi tanımlayan çeşitli teoriler geliştirilmiştir. Freud, Jung ve Sullivan'ın psikodinamik teorisi [140], Fromm-Reichmann'ın aile teorisi [141] bu teorilerden bazılarıdır ancak bu teoriler günümüzde popülerliğini kaybetmiştir.

1960'lı yıllarda şizofreninin etiyolojisinde dopaminin etkili olabileceği fikri ortaya atılmıştır. Bu yıllarda kloropromazin gibi antipsikotik ilaçlar geliştirildi ve bu ilaçların antipsikotik etkisinin dopamin reseptörlerini bloke etmesinden kaynaklandığı bildirilmiştir [142]. Amfetamin ve diğer uyarıcı maddelerin kullanımından sonra yaşanan şizofreniye benzer psikozun artan dopamin salınımdan kaynaklı olduğu keşfedilmiştir [143][144].

Şizofreniye dair bir diğer hipotez serotonerjik hipotezdir. Bu hipotez halüsünojen bir molekül olan lizerjik asit dietilamidi ve onun serotoninle olan ilişkisine dayanmaktadır [145]. 2012 yılında yapılan bir çalışmada dorsal rafe çekirdeğinden stres kaynaklı aşırı serotonin salgılanmasının şizofrenide kortikol nöronların aktivitesini bozabileceği gösterilmiştir [146].

Günümüzde şizofreni tedavisi için kabul edilen teori dopamin teorisidir. Tedavi çeşitli antipsikotik ilaçlar ile nörotransmitter reseptörleri arasındaki etkileşim dolayısıyla gerçekleşmektedir. Kullalınlan geleneksel antipsikotik ilaçların (klorpromazin, haloperidol,tioridazin vb.) etkinliği D2 reseptörünün blokajı ile korelasyon gösterir. Ancak D2 reseptörünün blokajı Parkinson hastalığı benzeri ekstraprimidal yan etkilere

sebep olmaktadır [147][139].

Merkezi sinir sistemindeki serotonin ve dopamin miktarıyla ilişkili gerek mental hastalıklar gerekse nörolojik hastalıkların tedavileri semptomatik ve önemli yan etkilere sahip olduğundan bitkisel kaynaklı yeni tedavi yaklaşımları arayışı doğmuştur [148][149][150].

Çalışmamızın *in vitro* safhasında ceviz meyvesinin juglon içeriğinin literatüre uyumlu olarak yaprak ve yeşil kabuktan daha az olduğu belirlendi [151]. Ceviz meyvesi daha önce yapılan çalışmalarda total fenolik içerik ve total antioksidan kapasite bakımından diğer kabuklu yemişlere göre daha zengin bulunmuştur [98][152]. Çalışmada kullandığımız ekstraktın total fenolik bileşik içeriği ve total antioksidan içeriğinin miktar tespiti literatürdeki benzer çalışmalara uyumlu bulundu [153].

Carvalho ve arkadaşları ceviz meyvesi, yaprağı ve yeşil kabuğunun metanolik ekstraktlarının insan böbrek kanseri hücre hatları (A498 ve 769-P) ve kolon kanseri hücre hattı (Caco-2) üzerindeki sitotoksik etkisini araştırmışlardır. Hücreler üzerinde ceviz meyvesinin ekstraktının yaprak ve yeşil kabuğa göre daha yüksek IC_{50} dozuna sahip olduğu belirlenmiştir. Ceviz meyve ekstraktının IC_{50} dozları sırasıyla 0.291 ± 0.018 mg/mL, >0.500 mg/mL ve >0.500 mg/mL olarak hesaplanmıştır [101]. Ceviz meyve ekstraktının IC_{50} dozunun çalışmamızda bulduğumuz değerlerden daha düşük olmasının kullanılan ceviz türü, ekstraksiyon solventi, ekstraksiyon tekniği ve hücre hattının farklılığından kaynaklandığını düşünmekteyiz.

Salimi ve arkadaşları ceviz yaprağının metanol, etil asestat ve kloroform solventlerindeki ekstraktlarının çeşitli kanser hücre hatları üzerindeki sitotoksik etkisini incelemişlerdir. Hücreler üzerinde toksisite kullanılan solvente göre oldukça farklılık göstermiştir. IC_{50} dozu en düşük ekstrakt kloroform (0.36–0.81 mg/mL) olarak tespit edilmiştir [154]. Literatürün genelinde ceviz yaprağı ve yeşil kabuk ekstraktlarının ceviz meyvesi ekstraktına göre hücreler üzerindeki toksik etkisinin daha fazla olduğu görülmektedir. Bu nedenle ceviz yaprak ve yeşil kabuğu daha çok antikanser çalışmalarında kullanılmaktadır [155][156][157]. Bunun sebebi ceviz yaprağı [158] ve yeşil kabuğunun [159] meyveye [83] göre daha yüksek oranda polifenol içermesi olabilir. Polifenolik bileşikler kanser baskılayıcı ajan olarak karsinogenez sürecini önleyerek veya kanser büyüme ve gelişmesini inhibe ederek etkinlik gösterirler [160]. Bu etkinliklerini kanser hücresinin hayatta kalma ve çoğalmasını düzenleyen nükleer faktör kappa-B (NF-kB) ve aktivatör protein 1 (AP-1)'i inhibe etmek başta olmak üzere çeşitli süreçlerle gerçekleştirirler [161].

Ceviz ekstraktı uygulanan hücre hatlarındaki hücre içi ROS üretiminin kontrole göre daha düşük olduğunu tespit edilmiştir. Bunun nedeni cevizin içerdiği yüksek miktarda

fenolik bileşiklerin düşük dozlarda gösterdiği antioksidan özellik olabilir [162]. Artan dozlarda juglon uygulanan hücrelerde ise canlılık, literatüre uyumlu olarak azalırken [163], hücre içi ROS üretimi 24 saataki 1 μM ve 5 μM dozlarında kontrole kıyasla düşüş gösterdi ancak artan juglon dozlarıyla beraber ROS üretimi de arttı.

Çalışmamızın *in vivo* safhasında ceviz ekstraktı ve juglonun gavajla ratlara uygulanmasının beyin ve serumdaki serotonin ve dopamin seviyelerine etkisi incelendi. Gruplar arası beyin ve serum serotonin seviyeleri karşılaştırıldığında beyin serotonin seviyeleri ceviz ekstraktı uygulanan gruplarda bir miktar daha yüksek bulunsa da anlamlı bir fark gözlemlenmedi. Haider ve arkadaşlarının 2011 yılında yaptığı çalışmada ratlarda uzun süreli ceviz tüketiminin beyin serotonin seviyesini arttırdığı gözlemlenmiştir [164]. Çalışmamızda serotonin seviyesinin bu denli artış göstermeme nedeni ceviz ekstraktının kısa süreli uygulanışıyla alakalı olabilir. Pribis ve arkadaşları yaptığı çalışmada genç yetişkinlerde ceviz tüketiminin kısa vadede bilişsel fonksiyonlar ve duygu durum üzerindeki etkilerinin oldukça kısıtlı olduğu sonucuna ulaşmıştır [165]. Günümüzde kullanılan antidepresanların olumlu etkisini gösterme süresi iki hafta ile bir ay arasında değiştiği düşünüldüğünde [166], serotonin seviyesindeki farklılıkların daha iyi tespiti için ceviz ekstraktı ve juglonun uygulanan dozların sıklığı ve çalışmanın süresi arttırılabilir.

Serum dopamin seviyeleri arasında önemli bir fark gözlemlenmezken, beyin dopamin seviyesi ceviz ekstraktı ve yüksek dozda juglon uygulanan gruplarda önemli ölçüde yüksek bulundu. Cevizin sahip olduğu çoklu doymamış yağ asitleri ve çeşitli fitokimyasallar dolayısıyla beyin sağlığı üzerinde olumlu etkileri olduğu bilinmektedir. Ancak literatürde cevizin etanolik ekstraktı ve juglonun beyin ve serum dopamin seviyelerine etkisine dair bir çalışma bulunmamaktadır. Bu yönüyle çalışmamız literatüre yeni bir yön kazandırmıştır.

Ceviz içerdiği polifenol bileşikler beyinde oksidantları azaltır ve enflamasyonu önler ancak bunun yanında nöronlar arası sinyalizasyonu da arttırır ve nörogenezi teşvik eder [102]. Ekstrakt ve juglonun beyin dopamin seviyesini arttırması bu yolla gerçekleşmiş olabilir.

Oksidatif stres reaktif oksijen ve nitrojen türlerinin oluşumu ve detoksifikasyonu arasındaki dengenin bozulması sonucunda ortaya çıkar bir durumdur [167]. ROS, Fenton ve Haber-Weiss reaksiyonlarıyla aktif metaller ile oksijen türleri arasındaki doğrudan etkileşimden veya nitrik oksit sentaz ve NADPH oksidaz gibi enzimlerin aktivasyonuyla dolaylı olarak üretilebilir [168]. Süperoksit anyon radikali (O_2^{-2}), hidroksil radikali (OH^-) ve hidrojen peroksit (H_2O_2) hücre içi ROS'lardan bazılarıdır. Süperoksit anyonu elektron taşıma zincirinde kompleks I ve III tarafından üretilir.

Oldukça reaktif olduğundan kolaylıkla mitokondrinin iç zarından geçebilir ve burada H_2O_2'e indirgenir. Mitokondrinin yanısıra peroksizomlar da H_2O_2 üretir. Peroksizom katalaz enzimi bulundurduğundan H_2O_2 su ve oksijene parçalanarak etkisiz hale getirilir. Ancak peroksizomlar hasar aldığında veya ilgili enzimlerinin aktivasyonu azaldığında H_2O_2 sitoplazmaya geçer. Burada $Fe^{+}2$ gibi indirgenmiş metallerin varlığında Fenton reaksiyonuyla en zararlı ROS olan hidroksil radikaline dönüşür [169]. ROS'un hücre içi birincil kaynağı mitokondriyel elektron taşıma sistemidir. Merkezi sinir sistemi yüksek enerji ihtiyacını karşılayabilmek için oldukça fazla miktarda mitokondri bulundurur [170]. Bunun haricinde sahip olduğu yüksek lipid profili ve antioksidan enzimlerin diğer dokulara göre kıt oluşu merkezi sinir sisteminde ROS miktarını arttıran diğer etmenlerdir [171].

Çalışmamızda ceviz ekstraktı ve farklı konsanstrasyonlarda juglon uygulanmış ratların serum, beyin ve karaciğer oksidatif stres düzeyleri araştırıldı. Ölçümlerimiz neticesinde test gruplarında serumda oksidatif stres artarken, beyin ve karaciğer dokularında azalmıştır. Test gruplarında serumdaki oksidatif stres artışı azalan antioksidan kapasite kaynaklı bulunmuştur. Bu sonuç fenolik bileşiklerin miktarına bağlı olarak ortaya çıkan pro-oksidan etkiden kaynaklanabilir. Uygulanan ceviz ekstraktı ve juglonun seruma beyin ve karaciğerden daha rahat ve yüksek miktarda geçişi burada pro-oksidan etki yaratmış olabilir. McKay ve arkadaşları insanlar üzerinde yapılan bir çalışmada uzun süreli ceviz tüketiminin plazma antioksidan biyomarkerları üzerinde önemli bir etkisi olmadığı sonucuna ulaşmışlardır [172]. Çalışmamızda da parelel şekilde gruplar arasında serum TOS düzeyi açısından önemli bir fark gözlemlenmezken serum TAS düzeyi kontrol grubunda test gruplarına göre yüksek bulundu.

Beyin ve karaciğer dokusu oksidatif stres düzeyleri karşılaştırıldığında test gruplardında oksidatif stresin kontrole kıyasla daha düşük olduğu sonucuna ulaşıldı. Gruplar arasında oksidatif stresi en düşük grup 1 mg/kg juglon uygulanan grup bulundu.

Günümüzde oksidatif stresin nörodejeneratif, serebrovasküler ve kardiyovasküler birçok hastalığın patogenezinde önemli rolü olduğu düşünülmektedir [173]. Bu alanlar arasında nörodejeneratif hastalıklarla oksidatif stres ilişkisi en çok ilgi çeken alan olmuştur. Oksidatif stresin nörodejeneratif hastalıkların bir sebebi mi yoksa sonucumu olduğuna dair kesin bir senaryo bulunmamakla beraber, giderek artan sayıda kanıt oksidatif stresin en azından nöropatolojiye yol açan hücresel hasarın yayılmasında etkili olduğunu göstermektedir [174]. Beyinde kronik oksidatif strese maruziyet koruyucu sinyal yolaklarının kaybına ve toksik proteinlerin birikmesine neden olur. Bu değişimler beyindeki hücreleri bozar veya ölümüne yol açar. Nöronal

hasar hücreler arası iletişimi değiştirerek hafıza,biliş ve motor işlevlerde eksikliklere neden olur. Bu hücresel modifikasyonlar sonunda Alzheimer, Parkinson, Huntington, amyotrofik lateral skleroz ve demans gibi nörodejeneratif hastalıkların patogenezine yol açar [175].

Merkezi sinir sisteminde dopamin metabolizması ile ROS üretimi oldukça ilişkili süreçlerdir. Üretilen hücre içi dopamin hem MAO-A enzimiyle hem de otooksidasyon ile degrade edilir. MAO-A enzimiyle degradasyon sonucunda DOPAC üretilirken yan ürün olarak H_2O_2 de oluşur. Dopaminin hücre içi otooksidasyonu sonucunda ise dopamin-kinon molekülü açığa çıkar. Bu süreçte de yan ürün olarak H_2O_2 oluşur. Dopaminin yıkımı sonucu oluşan H_2O_2 ortamda demir ($Fe^{+}2$) varlığında Fenton reaksiyonu ile OH^{-} radikallerine dönüşür. OH^{-} radikallerinin Parkinson hastalığındaki oksidatif streste önemli bir payı olduğu düşünülmektedir. Parkinson hastalığında dopaminerjik nöronların hasar aldığı substantia nigra kısmında beynin diğer kısmına göre daha fazla demir bulunduğu, sağlıklı insanlarla Parkinsonlu insanlar karşılaştırıldığında ise Parkinsonlu insanların beyninde %35 oranında daha fazla demir bulunmuştur [176]. Nörodejeneratif hastalıklara karşı teröpatik yaklaşımlarda oksidatif stresin inhibe edilmesi hücre ölümlerini durdurmak için hedef olabilir.

Sonuç olarak çalışmamızda ceviz ekstraktı ve juglonun ratlarda serotonin düzeylerini kısa vadede etkilemediğini ancak dopamin düzeylerini önemli ölçüde değiştirdiğini keşfettik. Beyin dopamin artışı ile oksidatif stres ters korelasyon gösterdi. Ceviz ekstraktı beyin dopamin seviyesini juglona göre daha fazla arttırırken juglonun oksidatif stresi azaltmada daha etkili olduğunu belirledik. Yapılan uygulamalarda ceviz esktraktı ve juglonun birlikte uygulanışının sinerjistik bir etki yaratmadığını bulduk. Artan beyin dopamin seviyesinin hücre içi mi yoksa hücreler arası mı olduğu bilinememektedir ancak beyindeki oksidatif stresin azalması artan dopaminin hücreler arası sinaptik boşlukta bulunması olasılığını arttırmaktadır. Ceviz ekstraktı ve juglon dopamin seviyesini bu denli önemli ölçüde değiştirirken karaciğer ve böbrek fonksiyon testlerinde bu organlar üzerinde herhangi bir yan etkisi olmadığını belirledik. Beyindeki dopamin miktarı artarken serum dopamin seviyeleri önemli ölçüde değişmedi bu da günümüzde Parkinson hastalığının tedavisinde kullanılan dopamin arttırma stratejisi ile uyum göstermektedir. Gelecekteki çalışmalarda ceviz ekstraktı gibi bitkisel ekstraktların juglon gibi fenolik karakterli sekonder metabolitlerin beyin sağlığı üzerine etkilerinin moleküler mekanizmasını aydınlatacak çalışmalara ihtiyaç vardır. Bu çalışmalar oksidatif stresle yakından alakalı nörolojik veya nörodejeneratif hastalıklara yeni bir tedavi yaklaşımı ortaya koyabilir.

KAYNAKÇA

[1] R. A. Wise, "Dopamine, learning and motivation," *Nature reviews neuroscience*, vol. 5, no. 6, pp. 483–494, 2004.

[2] P. Gaspar, O. Cases, L. Maroteaux, "The developmental role of serotonin: News from mouse molecular genetics," *Nature Reviews Neuroscience*, vol. 4, no. 12, pp. 1002–1012, 2003.

[3] H. Ritchie, M. Roser, "Mental health," *Our World in Data*, 2018, https://ourworldindata.org/mental-health.

[4] N. Aydın, M. Çetin, E. Kurt, H. Savaş, C. Açıkel, S. Kılıç, C. Başoğlu, H. Türkçapar, "Psikofarmakoloji derneği türkiye'de psikotrop ilaç tüketimi ve mevcut uygulamaların tıbbi, etik ve ekonomik sonuçları raporu," *Klinik Psikofarmakoloji Bülteni*, vol. 23, no. 4, pp. 390–402, 2013.

[5] L. E. Egede, K. G. Bishu, R. J. Walker, C. E. Dismuke, "Impact of diagnosed depression on healthcare costs in adults with and without diabetes: United states, 2004–2011," *Journal of affective disorders*, vol. 195, pp. 119–126, 2016.

[6] R. C. Alexander, S. Preskorn, "Clinical pharmacology in the development of new antidepressants: The challenges," *Current opinion in pharmacology*, vol. 14, pp. 6–10, 2014.

[7] H. Dang, Y. Chen, X. Liu, Q. Wang, L. Wang, W. Jia, Y. Wang, "Antidepressant effects of ginseng total saponins in the forced swimming test and chronic mild stress models of depression," *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, vol. 33, no. 8, pp. 1417–1424, 2009.

[8] H.-T. Li, H.-M. Wu, H.-L. Chen, C.-M. Liu, C.-Y. Chen, "The pharmacological activities of (-)-anonaine," *Molecules*, vol. 18, no. 7, pp. 8257–8263, 2013.

[9] M. Liu, H.-H. Huang, J. Yang, Y.-P. Su, H.-W. Lin, L.-Q. Lin, W.-J. Liao, C.-X. Yu, "The active alkaloids of gelsemium elegans benth. are potent anxiolytics," *Psychopharmacology*, vol. 225, no. 4, pp. 839–851, 2013.

[10] K. Sasaki, A. El Omri, S. Kondo, J. Han, H. Isoda, "Rosmarinus officinalis polyphenols produce anti-depressant like effect through monoaminergic and cholinergic functions modulation," *Behavioural Brain Research*, vol. 238, pp. 86–94, 2013.

[11] D. Machado, V. Neis, G. Balen, A. Colla, M. Cunha, J. Dalmarco, M. Pizzolatti, R. Prediger, A. Rodrigues, "Antidepressant-like effect of ursolic acid isolated from rosmarinus officinalis l. in mice: Evidence for the involvement of the dopaminergic system," *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, vol. 103, no. 2, pp. 204–211, 2012.

[12] P. M. Galdino, M. V. M. Nascimento, I. F. Florentino, R. C. Lino, J. O. Fajemiroye, B. A. Chaibub, J. R. de Paula, T. C. M. de Lima, E. A. Costa, "The anxiolytic-like effect of an essential oil derived from spiranthera odoratissima a. st. hil. leaves and its major component, β-caryophyllene, in male mice," *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, vol. 38, no. 2, pp. 276–284, 2012.

[13] R. Shri, K. Bhutani, A. Sharma, "A new anxiolytic fatty acid from aethusa cynapium," *Fitoterapia*, vol. 81, no. 8, pp. 1053–1057, 2010.

[14] D. Kumar, Z. A. Bhat, "Apigenin 7-glucoside from stachys tibetica vatke and its anxiolytic effect in rats," *Phytomedicine*, vol. 21, no. 7, pp. 1010–1014, 2014.

[15] A. Chauhan, V. Chauhan, "Beneficial effects of walnuts on cognition and brain health," *Nutrients*, vol. 12, no. 2, p. 550, 2020.

[16] F. Gómez-Pinilla, "Brain foods: The effects of nutrients on brain function," *Nature reviews neuroscience*, vol. 9, no. 7, pp. 568–578, 2008.

[17] L. Arab, R. Guo, D. Elashoff, "Lower depression scores among walnut consumers in nhanes," *Nutrients*, vol. 11, no. 2, p. 275, 2019.

[18] A. Sánchez-Villegas, M. A. Martınez-González, R. Estruch, J. Salas-Salvadó, D. Corella, M. I. Covas, F. Arós, D. Romaguera, E. Gómez-Gracia, J. Lapetra, *et al.*, "Mediterranean dietary pattern and depression: The predımed randomized trial," *BMC medicine*, vol. 11, no. 1, pp. 1–12, 2013.

[19] M. D. Pandareesh, V. Chauhan, A. Chauhan, "Walnut supplementation in the diet reduces oxidative damage and improves antioxidant status in transgenic mouse model of alzheimer's disease," *Journal of Alzheimer's Disease*, vol. 64, no. 4, pp. 1295–1305, 2018.

[20] M. Strugstad, S. Despotovski, "A summary of extraction, synthesis, properties, and potential uses of juglone: A literature review," *Journal of ecosystems and management*, vol. 13, no. 3, 2013.

[21] Y.-B. Ji, Z.-Y. Qu, X. Zou, "Juglone-induced apoptosis in human gastric cancer sgc-7901 cells via the mitochondrial pathway," *Experimental and toxicologic pathology*, vol. 63, no. 1-2, pp. 69–78, 2011.

[22] R. M. McCoy, S. M. Utturkar, J. W. Crook, J. Thimmapuram, J. R. Widhalm, "The origin and biosynthesis of the naphthalenoid moiety of juglone in black walnut," *Horticulture research*, vol. 5, no. 1, pp. 1–11, 2018.

[23] M. Leopoldini, T. Marino, N. Russo, M. Toscano, "Antioxidant properties of phenolic compounds: H-atom versus electron transfer mechanism," *The Journal of Physical Chemistry A*, vol. 108, no. 22, pp. 4916–4922, 2004.

[24] M. Leopoldini, N. Russo, S. Chiodo, M. Toscano, "Iron chelation by the powerful antioxidant flavonoid quercetin," *Journal of agricultural and food chemistry*, vol. 54, no. 17, pp. 6343–6351, 2006.

[25] I. Tejero, N. González-Garcıa, À. González-Lafont, J. M. Lluch, "Tunneling in green tea: Understanding the antioxidant activity of catechol-containing compounds. a variational transition-state theory study," *Journal of the American Chemical Society*, vol. 129, no. 18, pp. 5846–5854, 2007.

[26] S. Reese, A. Vidyasagar, L. Jacobson, Z. Acun, S. Esnault, D. Hullett, J. S. Malter, A. Djamali, "The pin 1 inhibitor juglone attenuates kidney fibrogenesis via pin 1-independent mechanisms in the unilateral ureteral occlusion model," *Fibrogenesis & tissue repair*, vol. 3, no. 1, pp. 1–8, 2010.

[27] X.-B. Zhang, C.-L. Zou, Y.-X. Duan, F. Wu, G. Li, "Activity guided isolation and modification of juglone from juglans regia as potent cytotoxic agent against lung cancer cell lines," *BMC complementary and alternative medicine*, vol. 15, no. 1, pp. 1–8, 2015.

[28] H. Parekh, S. Chavan, M. Chitnis, "Modulation of thiol pools by vitamin k3 and its effect on survival of sensitive and resistant murine tumor cells.," *Anti-cancer drugs*, vol. 2, no. 2, pp. 159–168, 1991.

[29] A. M. Clark, T. M. Jurgens, C. D. Hufford, "Antimicrobial activity of juglone," *Phytotherapy Research*, vol. 4, no. 1, pp. 11–14, 1990.

[30] D. Wianowska, S. Garbaczewska, A. Cieniecka-Roslonkiewicz, A. Dawidowicz, A. Jankowska, "Comparison of antifungal activity of extracts from different juglans regia cultivars and juglone," *Microbial pathogenesis*, vol. 100, pp. 263–267, 2016.

[31] T. Arasoglu, S. Derman, B. Mansuroglu, G. Yelkenci, B. Kocyigit, B. Gumus, T. Acar, I. Kocacaliskan, "Synthesis, characterization and antibacterial activity of juglone encapsulated plga nanoparticles," *Journal of applied microbiology*, vol. 123, no. 6, pp. 1407–1419, 2017.

[32] M. Vaváková, Z. Ďuračková, J. Trebatická, "Markers of oxidative stress and neuroprogression in depression disorder," *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, vol. 2015, 2015.

[33] M. M. Rapport, A. Green, I. H. Page, "Serum vasoconstrictor (serotonin)," *J Biol Chem*, vol. 176, pp. 1243–1251, 1949.

[34] C. Jonnakuty, C. Gragnoli, "What do we know about serotonin?" *Journal of cellular physiology*, vol. 217, no. 2, pp. 301–306, 2008.

[35] M. C. Boadle-Biber, "Regulation of serotonin synthesis," *Progress in biophysics and molecular biology*, vol. 60, no. 1, pp. 1–15, 1993.

[36] B. P. Skop, J. A. Finkelstein, T. R. Mareth, M. R. Magoon, T. M. Brown, "The serotonin syndrome associated with paroxetine, an over-the-counter cold remedy, and vascular disease," *The American journal of emergency medicine*, vol. 12, no. 6, pp. 642–644, 1994.

[37] A. J. Kaumann, F. O. Levy, "5-hydroxytryptamine receptors in the human cardiovascular system," *Pharmacology & therapeutics*, vol. 111, no. 3, pp. 674–706, 2006.

[38] F. Côté, C. Fligny, Y. Fromes, J. Mallet, G. Vodjdani, "Recent advances in understanding serotonin regulation of cardiovascular function," *Trends in molecular medicine*, vol. 10, no. 5, pp. 232–238, 2004.

[39] C. Langer, C. Piper, J. Vogt, J. Heintze, T. Butz, O. Lindner, W. Burchert, C. Kersting, D. Horstkotte, "Atrial fibrillation in carcinoid heart disease," *Clinical Research in Cardiology*, vol. 96, no. 2, pp. 114–118, 2007.

[40] M. Berger, J. A. Gray, B. L. Roth, "The expanded biology of serotonin," *Annual review of medicine*, vol. 60, pp. 355–366, 2009.

[41] L. Tamam, T. Zeren, "Depresyonda serotonerjik düzenekler," *Klinik Psikiyatri Dergisi*, vol. 5, no. Supp: 4, pp. 11–18, 2002.

[42] J. Gaddum, Z. Picarelli, "Two kinds of tryptamine receptor," *British journal of pharmacology and chemotherapy*, vol. 12, no. 3, pp. 323–328, 1957.

[43] C. N. Yohn, M. M. Gergues, B. A. Samuels, "The role of 5-ht receptors in depression," *Molecular brain*, vol. 10, no. 1, pp. 1–12, 2017.

[44] N. M. Barnes, T. Sharp, "A review of central 5-ht receptors and their function," *Neuropharmacology*, vol. 38, no. 8, pp. 1083–1152, 1999.

[45] J. J. Schildkraut, "The catecholamine hypothesis of affective disorders: A review of supporting evidence," *American journal of Psychiatry*, vol. 122, no. 5, pp. 509–522, 1965.

[46] A. Coppen, E. Eccleston, M. Peet, "Total and free tryptophan concentration in the plasma of depressive patients," *The Lancet*, vol. 302, no. 7820, pp. 60–63, 1973.

[47] R. W. Lam, A. P. Zis, A. Grewal, P. L. Delgado, D. S. Charney, J. H. Krystal, "Effects of rapid tryptophan depletion in patients with seasonal affective disorder in remission after light therapy," *Archives of General Psychiatry*, vol. 53, no. 1, pp. 41–44, 1996.

[48] C. L. Parks, P. S. Robinson, E. Sibille, T. Shenk, M. Toth, "Increased anxiety of mice lacking the serotonin1a receptor," *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 95, no. 18, pp. 10 734–10 739, 1998.

[49] A. Holmes, D. L. Murphy, J. N. Crawley, "Reduced aggression in mice lacking the serotonin transporter," *Psychopharmacology*, vol. 161, no. 2, pp. 160–167, 2002.

[50] V. Mosienko, B. Bert, D. Beis, S. Matthes, H. Fink, M. Bader, N. Alenina, "Exaggerated aggression and decreased anxiety in mice deficient in brain serotonin," *Translational psychiatry*, vol. 2, no. 5, e122–e122, 2012.

[51] G. Anderson, "Editorial (thematic ıssue: The kynurenine and melatonergic pathways in psychiatric and cns disorders)," *Current pharmaceutical design*, vol. 22, no. 8, pp. 947–948, 2016.

[52] M. Maes, M. Berk, L. Goehler, C. Song, G. Anderson, P. Gałecki, B. Leonard, "Depression and sickness behavior are janus-faced responses to shared inflammatory pathways," *BMC medicine*, vol. 10, no. 1, pp. 1–19, 2012.

[53] T. Liu, S. Zhong, X. Liao, J. Chen, T. He, S. Lai, Y. Jia, "A meta-analysis of oxidative stress markers in depression," *PloS one*, vol. 10, no. 10, e0138904, 2015.

[54] C. N. Black, M. Bot, P. G. Scheffer, P. Cuijpers, B. W. Penninx, "Is depression associated with increased oxidative stress? a systematic review and meta-analysis," *Psychoneuroendocrinology*, vol. 51, pp. 164–175, 2015.

[55] H. Juárez Olguın, D. Calderon Guzman, E. Hernandez Garcia, G. Barragan Mejia, "The role of dopamine and its dysfunction as a consequence of oxidative stress," *Oxidative medicine and cellular longevity*, vol. 2016, 2016.

[56] M. O. Klein, D. S. Battagello, A. R. Cardoso, D. N. Hauser, J. C. Bittencourt, R. G. Correa, "Dopamine: Functions, signaling, and association with neurological diseases," *Cellular and molecular neurobiology*, vol. 39, no. 1, pp. 31–59, 2019.

[57] S. Udenfriend, J. B. Wyngaarden, "Precursors of adrenal epinephrine and norepinephrine in vivo," *Biochimica et biophysica acta*, vol. 20, pp. 48–52, 1956.

[58] R. M. Weinshilboum, N. B. Thoa, D. G. Johnson, I. J. Kopin, J. Axelrod, "Proportional release of norepinephrine and dopamine-β-hydroxylase from sympathetic nerves," *Science*, vol. 174, no. 4016, pp. 1349–1351, 1971.

[59] J. Meiser, D. Weindl, K. Hiller, "Complexity of dopamine metabolism," *Cell Communication and Signaling*, vol. 11, no. 1, pp. 1–18, 2013.

[60] A. Sayın, "Dopamin reseptörleri ve sinyal iletim özellikleri.," *Klinik Psikiyatri Dergisi*, vol. 11, no. 3, 2008.

[61] O. Hikosaka, K. Nakamura, K. Sakai, H. Nakahara, "Central mechanisms of motor skill learning," *Current opinion in neurobiology*, vol. 12, no. 2, pp. 217–222, 2002.

[62] K. T. Demarest, G. D. Riegle, K. E. Moore, "Prolactin-induced activation of tuberoinfundibular dopaminergic neurons: Evidence for both a rapid 'tonic'and a delayed 'induction'component," *Neuroendocrinology*, vol. 38, no. 6, pp. 467–475, 1984.

[63] S. Sveinbjornsdottir, "The clinical symptoms of parkinson's disease," *Journal of neurochemistry*, vol. 139, pp. 318–324, 2016.

[64] O. Guillin, A. Abi-Dargham, M. Laruelle, "Neurobiology of dopamine in schizophrenia," *International review of neurobiology*, vol. 78, pp. 1–39, 2007.

[65] J. Lieberman, J. Kane, J. Alvir, "Provocative tests with psychostimulant drugs in schizophrenia," *Psychopharmacology*, vol. 91, no. 4, pp. 415–433, 1987.

[66] A. L. Arnold, H. Freeman, "Reserpine in hospitalized psychotics: A controlled study on chronically disturbed women," *AMA Archives of Neurology & Psychiatry*, vol. 76, no. 3, pp. 281–285, 1956.

[67] A. Carlsson, B.-E. Roos, J. Wålinder, A. Skott, "Further studies on the mechanism of antipsychotic action: Potentiation by α-methyltyrosine of thioridazine effects in chronic schizophrenics," *Journal of Neural Transmission*, vol. 34, no. 2, pp. 125–132, 1973.

[68] S. H. Snyder, "The dopamine hypothesis of schizophrenia: Focus on the dopamine receptor.," *The American journal of psychiatry*, 1976.

[69] S. Nikolaus, C. Antke, H.-W. Müller, "In vivo imaging of synaptic function in the central nervous system: I. movement disorders and dementia," *Behavioural brain research*, vol. 204, no. 1, pp. 1–31, 2009.

[70] G. Yadid, A. Friedman, "Dynamics of the dopaminergic system as a key component to the understanding of depression," *Progress in brain research*, vol. 172, pp. 265–286, 2008.

[71] B. W. Dunlop, C. B. Nemeroff, "The role of dopamine in the pathophysiology of depression," *Archives of general psychiatry*, vol. 64, no. 3, pp. 327–337, 2007.

[72] P. Willner, A. S. Hale, S. Argyropoulos, "Dopaminergic mechanism of antidepressant action in depressed patients," *Journal of affective disorders*, vol. 86, no. 1, pp. 37–45, 2005.

[73] S. Kapur, J. J. Mann, "Role of the dopaminergic system in depression," *Biological psychiatry*, vol. 32, no. 1, pp. 1–17, 1992.

[74] R. S. El-Mallakh, "An open study of methylphenidate in bipolar depression," *Bipolar disorders*, vol. 2, no. 1, pp. 56–59, 2000.

[75] S. Bayazit, H. TEFEK, O. ÇALIŞKAN, "Türkiye'de ceviz (juglans regia l.) araştırmaları," *Ziraat Fakültesi Dergisi*, vol. 11, no. 1, pp. 169–179, 2016.

[76] G. Savage, P. Dutta, D. McNeil, "Fatty acid and tocopherol contents and oxidative stability of walnut oils," *Journal of the American Oil Chemists' Society*, vol. 76, no. 9, pp. 1059–1063, 1999.

[77] S. M. Şen, T. Karadeniz, "The nutritional value of walnut," *Journal of Hygienic Engineering and Design*, vol. 11, no. 18, pp. 68–71, 2015.

[78] N. A. Taha, M. A. Al-wadaan, "Utility and importance of walnut, juglans regia linn: A review," *African Journal of Microbiology Research*, vol. 5, no. 32, pp. 5796–5805, 2011.

[79] M. I. Tapia, J. R. Sánchez-Morgado, J. Garcıa-Parra, R. Ramırez, T. Hernández, D. González-Gómez, "Comparative study of the nutritional and bioactive compounds content of four walnut (juglans regia l.) cultivars," *Journal of Food Composition and Analysis*, vol. 31, no. 2, pp. 232–237, 2013.

[80] (). "Türkomp, ulusal gıda kompozisyon veri tabanı, versiyon 1.0, www.turkomp.gov.tr," [Online]. Available: `http://www.turkomp.gov.tr/food-400`.

[81] B. Caballero, L. C. Trugo, P. M. Finglas, *Encyclopedia of food sciences and nutrition*. Academic, 2003.

[82] L. Bravo, "Polyphenols: Chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance," *Nutrition reviews*, vol. 56, no. 11, pp. 317–333, 1998.

[83] M. Colaric, R. Veberic, A. Solar, M. Hudina, F. Stampar, "Phenolic acids, syringaldehyde, and juglone in fruits of different cultivars of juglans regia l.," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 53, no. 16, pp. 6390–6396, 2005.

[84] C. Sánchez-González, C. J. Ciudad, V. Noe, M. Izquierdo-Pulido, "Health benefits of walnut polyphenols: An exploration beyond their lipid profile," *Critical reviews in food science and nutrition*, vol. 57, no. 16, pp. 3373–3383, 2017.

[85] M. Lutz, E. Fuentes, F. Ávila, M. Alarcón, I. Palomo, "Roles of phenolic compounds in the reduction of risk factors of cardiovascular diseases," *Molecules*, vol. 24, no. 2, p. 366, 2019.

[86] P. Reboredo-Rodrıguez, A. Varela-López, T. Y. Forbes-Hernández, M. Gasparrini, S. Afrin, D. Cianciosi, J. Zhang, P. P. Manna, S. Bompadre, J. L. Quiles, *et al.*, "Phenolic compounds isolated from olive oil as nutraceutical tools for the prevention and management of cancer and cardiovascular diseases," *International journal of molecular sciences*, vol. 19, no. 8, p. 2305, 2018.

[87] H. Cao, J. Ou, L. Chen, Y. Zhang, T. Szkudelski, D. Delmas, M. Daglia, J. Xiao, "Dietary polyphenols and type 2 diabetes: Human study and clinical trial," *Critical reviews in food science and nutrition*, vol. 59, no. 20, pp. 3371–3379, 2019.

[88] E. T. Callcott, C. L. Blanchard, P. Oli, A. B. Santhakumar, "Pigmented rice-derived phenolic compounds reduce biomarkers of oxidative stress and ınflammation in human umbilical vein endothelial cells," *Molecular nutrition & food research*, vol. 62, no. 24, p. 1 800 840, 2018.

[89] S. A. Vakili, A. George, S. A. Ayatollahi, M. Martorell, E. A. Ostrander, B. Salehi, N. Martins, J. Sharifi-Rad, "Phenolic compounds, saponins and alkaloids on cancer progression: Emphasis on p53 expression and telomere length," *Cellular and Molecular Biology*, vol. 66, no. 4, pp. 110–119, 2020.

[90] M. Han, A. Li, T. Shen, J. Meng, Y. Lei, X. Zhang, P. Liu, L. Gan, L. Ao, H. Li, "Phenolic compounds present in fruit extracts of malus spp. show antioxidative and pro-apoptotic effects on human gastric cancer cell lines," *Journal of food biochemistry*, vol. 43, no. 11, e13028, 2019.

[91] M. Taghouti, C. Martins-Gomes, J. Schäfer, L. M. Félix, J. A. Santos, M. Bunzel, F. M. Nunes, A. M. Silva, "Thymus pulegioides l. as a rich source of antioxidant, anti-proliferative and neuroprotective phenolic compounds," *Food & function*, vol. 9, no. 7, pp. 3617–3629, 2018.

[92] K. Rose, C. Wan, A. Thomas, N. P. Seeram, H. Ma, "Phenolic compounds isolated and identified from amla (phyllanthus emblica) juice powder and their antioxidant and neuroprotective activities," *Natural Product Communications*, vol. 13, no. 10, p. 1934578X1801301019, 2018.

[93] B. Halliwell, A. Zentella, E. O. Gomez, D. Kershenobich, "Antioxidants and human disease: A general introduction," *Nutrition reviews*, vol. 55, no. 1, S44, 1997.

[94] K. J. Anderson, S. S. Teuber, A. Gobeille, P. Cremin, A. L. Waterhouse, F. M. Steinberg, "Walnut polyphenolics inhibit in vitro human plasma and ldl oxidation," *The Journal of nutrition*, vol. 131, no. 11, pp. 2837–2842, 2001.

[95] S. Torabian, E. Haddad, S. Rajaram, J. Banta, J. Sabate, "Acute effect of nut consumption on plasma total polyphenols, antioxidant capacity and lipid peroxidation," *Journal of Human Nutrition and Dietetics*, vol. 22, no. 1, pp. 64–71, 2009.

[96] M. Kornsteiner, K.-H. Wagner, I. Elmadfa, "Tocopherols and total phenolics in 10 different nut types," *Food chemistry*, vol. 98, no. 2, pp. 381–387, 2006.

[97] S. Arranz, J. Pérez-Jiménez, F. Saura-Calixto, "Antioxidant capacity of walnut (juglans regia l.): Contribution of oil and defatted matter," *European Food Research and Technology*, vol. 227, no. 2, pp. 425–431, 2008.

[98] B. L. Halvorsen, K. Holte, M. C. Myhrstad, I. Barikmo, E. Hvattum, S. F. Remberg, A.-B. Wold, K. Haffner, H. Baugerød, L. F. Andersen, *et al.*, "A systematic screening of total antioxidants in dietary plants," *The Journal of nutrition*, vol. 132, no. 3, pp. 461–471, 2002.

[99] N. Mishra, A. Dubey, R. Mishra, N. Barik, "Study on antioxidant activity of common dry fruits," *Food and Chemical Toxicology*, vol. 48, no. 12, pp. 3316–3320, 2010.

[100] C. Hudthagosol, E. Haddad, R. Jongsuwat, "Antioxidant activity comparison of walnuts and fatty fish.," *Journal of the Medical Association of Thailand= Chotmaihet Thangphaet*, vol. 95, S179–88, 2012.

[101] M. Carvalho, P. J. Ferreira, V. S. Mendes, R. Silva, J. A. Pereira, C. Jerónimo, B. M. Silva, "Human cancer cell antiproliferative and antioxidant activities of juglans regia l.," *Food and chemical toxicology*, vol. 48, no. 1, pp. 441–447, 2010.

[102] S. M. Poulose, M. G. Miller, B. Shukitt-Hale, "Role of walnuts in maintaining brain health with age," *The Journal of nutrition*, vol. 144, no. 4, 561S–566S, 2014.

[103] M. E. Rusu, C. Georgiu, A. Pop, A. Mocan, B. Kiss, O. Vostinaru, I. Fizesan, M.-G. Stefan, A.-M. Gheldiu, L. Mates, *et al.*, "Antioxidant effects of walnut (juglans regia l.) kernel and walnut septum extract in a d-galactose-induced aging model and in naturally aged rats," *Antioxidants*, vol. 9, no. 5, p. 424, 2020.

[104] L. M. Willis, B. Shukitt-Hale, V. Cheng, J. A. Joseph, "Dose-dependent effects of walnuts on motor and cognitive function in aged rats," *British journal of nutrition*, vol. 101, no. 8, pp. 1140–1144, 2008.

[105] B. Muthaiyah, M. M. Essa, V. Chauhan, A. Chauhan, "Protective effects of walnut extract against amyloid beta peptide-induced cell death and oxidative stress in pc12 cells," *Neurochemical research*, vol. 36, no. 11, pp. 2096–2103, 2011.

[106] V. Boccardi, M. Baroni, F. Mangialasche, P. Mecocci, "Vitamin e family: Role in the pathogenesis and treatment of alzheimer's disease," *Alzheimer's & Dementia: Translational Research & Clinical Interventions*, vol. 2, no. 3, pp. 182–191, 2016.

[107] A. Vogel, C. Reinschauer, "Ueber einen neuen organischen körper in deu fruchtschalen der juglans regia," *Neues Repertorium für Pharmacie*, vol. 5, pp. 106–110, 1856.

[108] A. Bernthsen, A. Semper, "Ueber die constitution des juglons und seine synthese aus naphtalin," *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft*, vol. 20, no. 1, pp. 934–941, 1887.

[109] E. F. Davis, "The toxic principle of juglans nigra as identified with synthetic juglone and its toxic effects on tomato and alfalfa plants," *Amer. J. Bot*, vol. 15, p. 620, 1928.

[110] W. Rietveld, "Allelopathic effects of juglone on germination and growth of several herbaceous and woody species," *Journal of Chemical Ecology*, vol. 9, no. 2, pp. 295–308, 1983.

[111] İ. Kocaçalışkan, *Allelopati*. Bizim Büro Yayınevi, 2006.

[112] İ. Kocacaliskan, İ. Terzi, "Allelopathic effects of walnut leaf extracts and juglone on seed germination and seedling growth," *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, vol. 76, no. 4, pp. 436–440, 2001.

[113] Q. Li, J. Cai, Z. Jiang, S. Zhang, "Allelopathic effects of walnut leaves leachate on seed germination, seedling growth of medicinal plants.," *Allelopathy Journal*, vol. 26, no. 2, 2010.

[114] R. C. Funt, J. Martin, "Black walnut toxicity to plants, humans and horses," *Ohio State University extension fact sheet HYG-1148-93*, 1993.

[115] V. Chobot, F. Hadacek, "Milieu-dependent pro-and antioxidant activity of juglone may explain linear and nonlinear effects on seedling development," *Journal of chemical ecology*, vol. 35, no. 3, pp. 383–390, 2009.

[116] R. Jin, "A dft study on the radical scavenging activity of juglone and its derivatives," *Journal of Molecular Structure: THEOCHEM*, vol. 939, no. 1-3, pp. 9–13, 2010.

[117] D.-J. Zhou, D. Mu, M.-D. Jiang, S.-M. Zheng, Y. Zhang, S. He, M. Weng, W.-Z. Zeng, "Hepatoprotective effect of juglone on dimethylnitrosamine-induced liver fibrosis and its effect on hepatic antioxidant defence and the expression levels of α-sma and collagen ıı," *Molecular medicine reports*, vol. 12, no. 3, pp. 4095–4102, 2015.

[118] S. Costantino, F. Paneni, T. F. Lüscher, F. Cosentino, "Pin1 inhibitor juglone prevents diabetic vascular dysfunction," *International journal of cardiology*, vol. 203, pp. 702–707, 2016.

[119] K. J. Barnham, C. L. Masters, A. I. Bush, "Neurodegenerative diseases and oxidative stress," *Nature reviews Drug discovery*, vol. 3, no. 3, pp. 205–214, 2004.

[120] A. Ghosh, H. Saminathan, A. Kanthasamy, V. Anantharam, H. Jin, G. Sondarva, D. S. Harischandra, Z. Qian, A. Rana, A. G. Kanthasamy, "The peptidyl-prolyl isomerase pin1 up-regulation and proapoptotic function in dopaminergic neurons: Relevance to the pathogenesis of parkinson disease," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 288, no. 30, pp. 21 955–21 971, 2013.

[121] S.-H. Baik, M. Fane, J. H. Park, Y.-L. Cheng, D. Yang-Wei Fann, U. J. Yun, Y. Choi, J.-S. Park, B. H. Chai, J. S. Park, *et al.*, "P in1 promotes neuronal death in stroke by stabilizing n otch intracellular domain," *Annals of neurology*, vol. 77, no. 3, pp. 504–516, 2015.

[122] X. Peng, Y. Nie, J. Wu, Q. Huang, Y. Cheng, "Juglone prevents metabolic endotoxemia-induced hepatitis and neuroinflammation via suppressing tlr4/nf-κb signaling pathway in high-fat diet rats," *Biochemical and biophysical research communications*, vol. 462, no. 3, pp. 245–250, 2015.

[123] M.-C. Galas, P. Dourlen, S. Bégard, K. Ando, M. Hamdane, L. Buée, "Pin1 modulates oxidative stress-induced dephosphorylation of tau in neurons: Implication of the peptidyl prolyl cis/trans isomerase in a pathological mechanism related to alzheimer's disease," in *Alzheimer's & Dementia: The Journal of the Alzheimer's Association, 3*, Elsevier, 2006, p. 473.

[124] İ. Kocaçalışkan, E. Turan, Ü. Ertürk, Y. Demir, I. Terzi, "Varietal and time dependent differences in juglone and total phenolic contents of the walnut (juglans regia l.) leaves," 2020.

[125] A. Slatnar, M. Mikulic-Petkovsek, F. Stampar, R. Veberic, A. Solar, "Identification and quantification of phenolic compounds in kernels, oil and bagasse pellets of common walnut (juglans regia l.)," *Food Research International*, vol. 67, pp. 255–263, 2015.

[126] K.-V. Ho, K. L. Schreiber, D. C. Vu, S. M. Rottinghaus, D. E. Jackson, C. R. Brown, Z. Lei, L. W. Sumner, M. V. Coggeshall, C.-H. Lin, "Black walnut (juglans nigra) extracts ınhibit proinflammatory cytokine production from lipopolysaccharide-stimulated human promonocytic cell line u-937," *Frontiers in pharmacology*, vol. 10, p. 1059, 2019.

[127] S. Erisen, T. Arasoğlu, B. Mansuroglu, İ. Kocacaliskan, S. Derman, "Cytotoxic and mutagenic potential of juglone: A comparison of free and nano-encapsulated form," *Arhiv za higijenu rada i toksikologiju*, vol. 71, no. 1, pp. 69–77, 2020.

[128] A. Kocyigit, E. M. Guler, E. Karatas, H. Caglar, H. Bulut, "Dose-dependent proliferative and cytotoxic effects of melatonin on human epidermoid carcinoma and normal skin fibroblast cells," *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, vol. 829, pp. 50–60, 2018.

[129] O. Erel, "A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status," *Clinical biochemistry*, vol. 38, no. 12, pp. 1103–1111, 2005.

[130] ——, "A novel automated method to measure total antioxidant response against potent free radical reactions," *Clinical Biochemistry*, vol. 37, no. 2, pp. 112–119, Feb. 2004, ISSN: 00099120. DOI: 10.1016/j.clinbiochem.2003.10.014.

[131] Ö. F. Özer, E. M. Güler, Ş. Selek, G. Çoban, H. M. Türk, A. Koçyiğit, "Akciğer, meme ve kolon kanserli hastalarda oksidatif stres parametrelerinin değişimi," *Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, vol. 16, no. 2, pp. 235–240, 2019.

[132] M. W. Otto, K. S. Tuby, R. A. Gould, R. Y. McLean, M. H. Pollack, "An effect-size analysis of the relative efficacy and tolerability of serotonin selective reuptake inhibitors for panic disorder," *American Journal of Psychiatry*, vol. 158, no. 12, pp. 1989–1992, 2001.

[133] M. Hamon, P. Blier, "Monoamine neurocircuitry in depression and strategies for new treatments," *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, vol. 45, pp. 54–63, 2013.

[134] W. E. Bunney, J. M. Davis, "Norepinephrine in depressive reactions: A review," *Archives of General Psychiatry*, vol. 13, no. 6, pp. 483–494, 1965.

[135] R. M. Hirschfeld, "History and evolution of the monoamine hypothesis of depression," *Journal of clinical psychiatry*, vol. 61, no. 6, pp. 4–6, 2000.

[136] P. Blier, C. De Montigny, "Current advances and trends in the treatment of depression," *Trends in pharmacological sciences*, vol. 15, no. 7, pp. 220–226, 1994.

[137] E. Richelson, "Synaptic effects of antidepressants," *Journal of clinical psychopharmacology*, vol. 16, no. 3, 1S–7S, 1996.

[138] A. D. Andersen, M. Binzer, E. Stenager, J. B. Gramsbergen, "Cerebrospinal fluid biomarkers for p arkinson's disease–a systematic review," *Acta Neurologica Scandinavica*, vol. 135, no. 1, pp. 34–56, 2017.

[139] J. Birtwistle, D. Baldwin, "Role of dopamine in schizophrenia and parkinson's disease," *British journal of nursing*, vol. 7, no. 14, pp. 832–841, 1998.

[140] S. Arieti, "An overview of schizophrenia from a predominantly psychological approach," *American Journal of Psychiatry*, vol. 131, no. 3, pp. 241–249, 1974.

[141] F. Fromm-Reichmann, "Notes on the development of treatment of schizophrenics by psychoanalytic psychotherapy," *Psychiatry*, vol. 11, no. 3, pp. 263–273, 1948.

[142] I. Creese, D. R. Burt, S. H. Snyder, "Dopamine receptor binding predicts clinical and pharmacological potencies of antischizophrenic drugs," *Science*, vol. 192, no. 4238, pp. 481–483, 1976.

[143] D. Bell, "Comparison of amphetamine psychosis and schizophrenia," *The British Journal of Psychiatry*, vol. 111, no. 477, pp. 701–707, 1965.

[144] S. H. Snyder, K. M. Taylor, J. T. Coyle, J. L. Meyerhoff, "The role of brain dopamine in behavioral regulation and the actions of psychotropic drugs," *American Journal of Psychiatry*, vol. 127, no. 2, pp. 199–207, 1970.

[145] G. K. Aghajanian, G. J. Marek, "Serotonin model of schizophrenia: Emerging role of glutamate mechanisms," *Brain research reviews*, vol. 31, no. 2-3, pp. 302–312, 2000.

[146] A. E. Eggers, "Extending david horrobin's membrane phospholipid theory of schizophrenia: Overactivity of cytosolic phospholipase a2 in the brain is caused by overdrive of coupled serotonergic 5ht2a/2c receptors in response to stress," *Medical hypotheses*, vol. 79, no. 6, pp. 740–743, 2012.

[147] P. Stępnicki, M. Kondej, A. A. Kaczor, "Current concepts and treatments of schizophrenia," *Molecules*, vol. 23, no. 8, p. 2087, 2018.

[148] M. S. Farahani, R. Bahramsoltani, M. H. Farzaei, M. Abdollahi, R. Rahimi, "Plant-derived natural medicines for the management of depression: An overview of mechanisms of action," *Reviews in the Neurosciences*, vol. 26, no. 3, pp. 305–321, 2015.

[149] E. Bocharov, I. Ivanova-Smolenskaya, V. Poleshchuk, V. Kucheryanu, V. Il'Enko, O. Bocharova, "Therapeutic efficacy of the neuroprotective plant adaptogen in neurodegenerative disease (parkinson's disease as an example)," *Bulletin of experimental biology and medicine*, vol. 149, no. 6, p. 682, 2010.

[150] K. Umezawa, I. Kojima, S. Simizu, Y. Lin, H. Fukatsu, N. Koide, Y. Nakade, M. Yoneda, "Therapeutic activity of plant-derived alkaloid conophylline on metabolic syndrome and neurodegenerative disease models," *Human cell*, vol. 31, no. 2, pp. 95–101, 2018.

[151] S. N. COSMULESCU, I. Trandafir, G. Achim, A. Baciu, "Juglone content in leaf and green husk of five walnut (juglans regia l.) cultivars," *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, vol. 39, no. 1, pp. 237–240, 2011.

[152] L. T. Abe, F. M. Lajolo, M. I. Genovese, "Comparison of phenol content and antioxidant capacity of nuts," *Food Science and Technology*, vol. 30, pp. 254–259, 2010.

[153] I. Trandafir, S. Cosmulescu, V. Nour, "Phenolic profile and antioxidant capacity of walnut extract as influenced by the extraction method and solvent," *International Journal of Food Engineering*, vol. 13, no. 1, 2017.

[154] M. Salimi, A. Majd, Z. Sepahdar, K. Azadmanesh, S. Irian, M. H. Ardestaniyan, M. H. Hedayati, N. Rastkari, "Cytotoxicity effects of various juglans regia (walnut) leaf extracts in human cancer cell lines," *Pharmaceutical biology*, vol. 50, no. 11, pp. 1416–1422, 2012.

[155] Y. Zhou, B. Yang, Z. Liu, Y. Jiang, Y. Liu, L. Fu, X. Wang, H. Kuang, "Cytotoxicity of triterpenes from green walnut husks of juglans mandshurica maxim in hepg-2 cancer cells," *Molecules*, vol. 20, no. 10, pp. 19 252–19 262, 2015.

[156] S. Sarkar, V. Kotteeswaran, "Green synthesis of silver nanoparticles from aqueous leaf extract of pomegranate (punica granatum) and their anticancer activity on human cervical cancer cells," *Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology*, vol. 9, no. 2, p. 025 014, 2018.

[157] A. A. Alshatwi, T. N. Hasan, G. Shafi, N. A. Syed, A. H. Al-Assaf, M. S. Alamri, A. S. Al-Khalifa, "Validation of the antiproliferative effects of organic extracts from the green husk of juglans regia l. on pc-3 human prostate cancer cells by assessment of apoptosis-related genes," *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, vol. 2012, 2012.

[158] J. A. Pereira, I. Oliveira, A. Sousa, P. Valentão, P. B. Andrade, I. C. Ferreira, F. Ferreres, A. Bento, R. Seabra, L. Estevinho, "Walnut (juglans regia l.) leaves: Phenolic compounds, antibacterial activity and antioxidant potential of different cultivars," *Food and chemical toxicology*, vol. 45, no. 11, pp. 2287–2295, 2007.

[159] F. Stampar, A. Solar, M. Hudina, R. Veberic, M. Colaric, "Traditional walnut liqueur–cocktail of phenolics," *Food chemistry*, vol. 95, no. 4, pp. 627–631, 2006.

[160] M. Kampa, A.-P. Nifli, G. Notas, E. Castanas, "Polyphenols and cancer cell growth," *Reviews of physiology, biochemistry and pharmacology*, pp. 79–113, 2007.

[161] S. C. Forester, J. D. Lambert, "The role of antioxidant versus pro-oxidant effects of green tea polyphenols in cancer prevention," *Molecular nutrition & food research*, vol. 55, no. 6, pp. 844–854, 2011.

[162] Z. Zhang, L. Liao, J. Moore, T. Wu, Z. Wang, "Antioxidant phenolic compounds from walnut kernels (juglans regia l.)," *Food chemistry*, vol. 113, no. 1, pp. 160–165, 2009.

[163] F. Fang, Y. Qin, L. Qi, Q. Fang, L. Zhao, S. Chen, Q. Li, D. Zhang, L. Wang, "Juglone exerts antitumor effect in ovarian cancer cells," *Iranian journal of basic medical sciences*, vol. 18, no. 6, p. 544, 2015.

[164] S. Haider, Z. Batool, S. Tabassum, T. Perveen, S. Saleem, F. Naqvi, H. Javed, D. J. Haleem, "Effects of walnuts (juglans regia) on learning and memory functions," *Plant foods for human nutrition*, vol. 66, no. 4, pp. 335–340, 2011.

[165] P. Pribis, R. N. Bailey, A. A. Russell, M. A. Kilsby, M. Hernandez, W. J. Craig, T. Grajales, D. J. Shavlik, J. Sabate, "Effects of walnut consumption on cognitive performance in young adults," *British journal of nutrition*, vol. 107, no. 9, pp. 1393–1401, 2012.

[166] R. Machado-Vieira, J. Baumann, C. Wheeler-Castillo, D. Latov, I. D. Henter, G. Salvadore, C. A. Zarate, "The timing of antidepressant effects: A comparison of diverse pharmacological and somatic treatments," *Pharmaceuticals*, vol. 3, no. 1, pp. 19–41, 2010.

[167] X. Wang, E. K. Michaelis, "Selective neuronal vulnerability to oxidative stress in the brain," *Frontiers in aging neuroscience*, vol. 2, p. 12, 2010.

[168] D. G. Smith, R. Cappai, K. J. Barnham, "The redox chemistry of the alzheimer's disease amyloid β peptide," *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, vol. 1768, no. 8, pp. 1976–1990, 2007.

[169] V. Dias, E. Junn, M. M. Mouradian, "The role of oxidative stress in parkinson's disease," *Journal of Parkinson's disease*, vol. 3, no. 4, pp. 461–491, 2013.

[170] J.-D. Guo, X. Zhao, Y. Li, G.-R. Li, X.-L. Liu, "Damage to dopaminergic neurons by oxidative stress in parkinson's disease," *International journal of molecular medicine*, vol. 41, no. 4, pp. 1817–1825, 2018.

[171] S. Leutner, A. Eckert, W. Müller, "Ros generation, lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities in the aging brain," *Journal of neural transmission*, vol. 108, no. 8-9, pp. 955–967, 2001.

[172] D. L. McKay, C. O. Chen, K.-J. Yeum, N. R. Matthan, A. H. Lichtenstein, J. B. Blumberg, "Chronic and acute effects of walnuts on antioxidant capacity and nutritional status in humans: A randomized, cross-over pilot study," *Nutrition journal*, vol. 9, no. 1, pp. 1–10, 2010.

[173] E. Mariani, M. Polidori, A. Cherubini, P. Mecocci, "Oxidative stress in brain aging, neurodegenerative and vascular diseases: An overview," *Journal of Chromatography B*, vol. 827, no. 1, pp. 65–75, 2005.

[174] J. K. Andersen, "Oxidative stress in neurodegeneration: Cause or consequence?" *Nature medicine*, vol. 10, no. 7, S18–S25, 2004.

[175] R. A. Floyd, K. Hensley, "Oxidative stress in brain aging: İmplications for therapeutics of neurodegenerative diseases," *Neurobiology of aging*, vol. 23, no. 5, pp. 795–807, 2002.

[176] A. Hald, J. Lotharius, "Oxidative stress and inflammation in parkinson's disease: İs there a causal link?" *Experimental neurology*, vol. 193, no. 2, pp. 279–290, 2005.

TEZDEN ÜRETİLMİŞ YAYINLAR

Konferans Bildirisi

1. Çintesun Ş., Özman Z. , Koçyiğit A. , Mansuroğlu B., Kocaçalışkan İ. ”Ceviz (Juglans regia L.) ekstraktı ve juglonun ratlarda dopamin seviyesi üzerine etkileri”, 4TH INTERNATIONAL EURASIAN CONFERENCE ON BIOLOGICAL AND CHEMICAL SCIENCES, Ankara, Türkiye, 24 - 26 Kasım 2021, ss.389

Proje

1. Yürütücü: Prof. Dr. İsmail Kocaçalışkan, Bursiyer: Şener Çintesun, ”Juglon ve Ceviz Ekstraktının Ratlarda Serotonin ve Dopamin Seviyeleri Üzerine Etkilerinin Araştırılması”, TÜBİTAK 1002 Projesi, Proje No:220S443, 01/12/2020-01/09/2021