



T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ-CERRAHPAŞA
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ



YÜKSEK LİSANS TEZİ

ANKSİYETELİ KÖPEKLERDE *HERİCIUM ERİNACEUS* ve *VALERİANA OFFİCİNALİS* KULLANIMININ ETKİLERİNİN ELEKTROENSEFALOGRAFİ YÖNTEMİ İLE ARAŞTIRILMASI

Çağın ÇEVİK

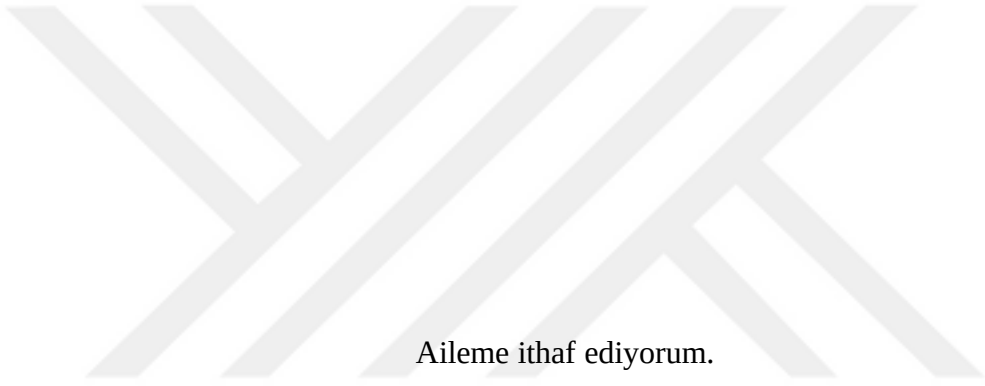
DANIŞMAN
Prof. Dr. Alev Meltem ERCAN

II. DANIŞMAN
Prof. Dr. Mehmet Erman OR

Biyofizik Anabilim Dalı

Biyofizik Programı

Aralık, 2022



Aileme ithaf ediyorum.

BÜTÇE DESTEKLERİ

ANKSİYETELİ KÖPEKLERDE *HERİCIUM ERINACEUS* ve *VALERIANA OFFICINALIS* KULLANIMININ ETKİLERİNİN ELEKTROENSEFALOGRAFİ YÖNTEMİ İLE ARAŞTIRILMASI

Bu çalışma İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje numarası: 36121

TEŞEKKÜR

İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Biyofizik Anabilim Dalı'nda Lisansüstü eğitim sürecimde bilgi ve deneyimlerini esirgemeyen danışman hocam sayın Prof. Dr. Alev Meltem Ercan'a,

Tez sürecimde ilgi ve yardımlarını eksik etmeyen İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa, Veteriner Fakültesi, İç Hastalıklar Anabilim Dalı'ndan ikinci danışman hocam sayın Prof. Dr. Mehmet Erman Or'a,

Lisansüstü eğitim çalışmalarımda büyük bir özveriyle beni destekleyen ve yanımda olan Ar. Gör. Dr. Duygu Tarhan'a,

Çalışmaya ait örneklerin sağlanmasında destek veren Dr. Ezgi Kaya ve Bikem Turanoğlu'na,

Alana yönelmemdeki ve süreç boyunca destekleri için Can Kayacılar'a,

Sürekli desteklerini hissettiğim kız arkadaşım Rüveyda Halıcı'ya,

Hayatım boyunca her anlamda yanımda olan annem Sevim Çevik, babam İrfan Çevik ve ablam Peren Çevik'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Destek ve iş birlikleri sebebiyle Sankara Beyin ve Biyoteknoloji Araştırma Merkezi'ne teşekkür ederim.

Aralık 2022

Çağın ÇEVİK

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

TEZ KABUL VE ONAYI	ii
BEYAN	iii
BÜTÇE DESTEKLERİ	v
TEŞEKKÜR	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ŞEKİL LİSTESİ	x
TABLO LİSTESİ	xiii
SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ	xiv
ÖZET	xvii
ABSTRACT	xix
1. GİRİŞ	1
2. KAVRAMSAL ÇERÇEVE	3
2.1. Beyin Yapısı ve Fonksiyonları	3
2.2. Nöronlar ve Beyin Sinyalleri	4
2.3. Nörogörüntüleme Çalışmaları	6
2.3.1. Elektroensefalografi	7
2.3.2. EEG ile Beyin Aktivitesinin Analizi	10
2.4. Anksiyete Kavramı ve Bozuklukları	12
2.4.1. Anksiyetenin Sınıflandırılması	13
2.4.2. Epidemiyoloji	16
2.4.3. Etiyoloji	17
2.4.4. Tanı	18
2.4.5. Tedavi	19
2.5. EEG ve Anksiyete	20
2.6. Nörotransmitter ve Hormonlar ile Anksiyete İlişkisi	24
2.6.1. Kortizol	26
2.6.2. Dopamin	26
2.6.3. Serotonin	27

2.7. Bitkisel İlaçlar ve Anksiyete	28
2.7.1. Hericium Erinaceus	28
2.7.2. Valeriana Officinalis	30
2.8. Toplam Fenolik Madde Miktarı	32
3. YÖNTEM	33
3.1. Araştırmanın Yeri, Örneklem Grubu ve Süresi	33
3.2. Deneysel Dizayn	34
3.3. Örneklem Grubuna ait Davranışsal Verilerin Toplanması	36
3.4. Kan Örneklerinin Toplanması ve Serum Eldesi	37
3.5. Kan Serumlarından Serotonin, Kortizol ve Dopamin Ölçülmesi	39
3.5.1. ELISA Yöntemi.....	41
3.5.2. ELISA Yönteminin Uygulanması	43
3.5.3. ELISA Verilerinin Analizi	50
3.6. EEG Kayıtlarının Alınması.....	51
3.6.1. Hayvanın Hazırlanması ve Sedasyon İşlemi	52
3.6.2. EEG İşlemi ile İlgili Cihazlar	53
3.6.3. Kayıt Elektrotlarının Yerleştirilmesi ve Montaj Düzeni	54
3.7. EEG Sinyallerinin İşlenmesi ve Analizi	57
3.7.1. Ön İşleme	58
3.7.2. Zaman-Frekans Analizi ve Özellik Çıkarımı	61
3.8. Bitkisel Gıda Takviyelerinin Hazırlanması ve Analizi	64
3.8.1. Bitkilere ait Ekstraktların Tedariği ve Analiz Raporları	64
3.8.2. UV-Vis Spektroskopisi ile Toplam Fenolik Madde Miktarları Analizi	64
3.8.3. Ekstraktların Kapsüllenmesi ve Kullanıma Hazır Hale Getirilmesi	67
3.9. İstatistiksel Analiz.....	68
4. BULGULAR.....	70
4.1. Demografik Bulgular	70
4.2. Genel Muayene Bulguları	72
4.3. Davranış Anketi Bulguları	72
4.4. Nörokimyasal Seviyelere ait Bulgular	74
4.4.1. Kortizol.....	74
4.4.2. Dopamin	75
4.4.3. Serotonin	75
4.5. EEG Bulguları.....	75

4.5.1. Delta Frekansı	76
4.5.2. Teta Frekansı	77
4.5.3. Alfa Frekansı	79
4.5.4. Beta Frekansı	81
4.6. Bulgulara ait Korelasyon Analizleri	83
5. TARTIŞMA.....	93
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	100
KAYNAKLAR.....	102
EKLER	120
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI	131
ETİK KURUL İZİN YAZISI	132
KURUM İZNİ YAZILARI	133
ÖZGEÇMİŞ	134

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

Şekil 2-1 Dorsal serebral korteks, beyincik ve beyin sapı çizimi [26]	3
Şekil 2-2 Biyolojik nöron ve sinaps yapısı [32]	5
Şekil 2-3 Aksiyon potansiyeli karakteristiği ve oluşum döngüsü [33].....	6
Şekil 2-4 Nöronlardan elektrotlara EEG sinyal aktarımı [38]	8
Şekil 2-5 Çift kutuplu (üstte) ve tek kutuplu (altta) tek kanal EEG düzeni [39]	8
Şekil 2-6 10-20 Uluslararası EEG elektrot yerleştirme sistemi [41]	9
Şekil 2-7 Mental ve madde kullanım bozukluğu prevalansı [51].....	16
Şekil 2-8 EEG ve anksiyete çalışmalarının birlikte yürütüldüğü literatür eğilimi	21
Şekil 2-9 Hericium erinaceus çalışmalarına ait literatür eğilimi	30
Şekil 2-10 Valeriana officinalis çalışmalarına ait literatür eğilimi.....	32
Şekil 3-1 DeneySEL dizayna ait genel akış şeması	36
Şekil 3-2 Vena cephalica antebrachium'dan kan alımı	37
Şekil 3-3 Sarı kapaklı jelli tüplere alınan kan örnekleri	38
Şekil 3-4 Santrifüj cihazı	38
Şekil 3-5 – 80 °C dondurucu (a), ependorf içerisindeki serumların saklanması (b)	39
Şekil 3-6 Soğuk zincir taşıma uygulaması	40
Şekil 3-7 Sandviç ELISA yöntemi [123].....	42
Şekil 3-8 Rekabetçi ELISA yöntemi	43
Şekil 3-9 Dopamin, serotonin ve kortizol kit içerikleri	44
Şekil 3-10 Serum örneklerinin düzenlenmesi.....	45
Şekil 3-11 Yüksek hızlı santrifüj cihazı	45
Şekil 3-12 Plate düzeni ve numaralandırılması	46

Şekil 3-13 Çok pipetli aktarım uygulaması	47
Şekil 3-14 Yıkama işlemi	48
Şekil 3-15 Aktivasyon işlemi sonrası görünüm.....	49
Şekil 3-16 İnhibitör eklenmesi sonrası renk değişimi	49
Şekil 3-17 ELISA Okuyucu kullanımı	50
Şekil 3-18 Absorpsiyon ile konsantrasyon değerlerinin ilişkisi ve oluşturulan eğriler	51
Şekil 3-19 EEG çekim işlemi	52
Şekil 3-20 Deri altı iğne elektrotlar	53
Şekil 3-21 EEG sistemi (a), junction box (b), kayıt monitörü (c)	54
Şekil 3-22 EEG kayıt elektrotlarının yerleşimini gösteren bir mezosefalik köpek kafatasının dorsal (a) ve brakisefalik köpek kafatasının sol tarafının yan görünümleri (b), (c) [149]	54
Şekil 3-23 Mezasefalik köpek kafası dorsal (a) ve sağ tarafı (b) [153]	55
Şekil 3-24 EEG elektrotlarının yerleşimi	55
Şekil 3-25 Monopolar montaj düzeni [149]	56
Şekil 3-26 Kayıt işlemi sırasında EEG monitörü ve hasta	56
Şekil 3-27 Ham EEG sinyalinin bir kesit.....	57
Şekil 3-28 Çalışmamıza ait FIR filtre uygulaması	59
Şekil 3-29 Bant geçiren filtre uygulamalarından elde edilen EEG frekans bantları [154]	60
Şekil 3-30 Kayıt sırasında oluşan çeşitli artifaktlar	60
Şekil 3-31 Welch Metodu prosedürü [154]	63
Şekil 3-32 Farklı EEG veri kanallarına ait aktivite spektrumu	63
Şekil 3-33 UV-Vis spektrofotometresindeki ana bileşenleri [147]	65
Şekil 3-34 Tipik bir absorpsiyon spektrumu grafiği örneği [148]	65
Şekil 3-35 UV-Vis spektrofotometre cihazı	66
Şekil 3-36 Ekstraktların kapsüllenmesi ve kapsüllerin kutuları	67
Şekil 3-37 Hassas terazi.....	68
Şekil 4-1 HE grubuna ait cinsiyet, ağırlık ve yaş dağılımı	71

Şekil 4-2 VO grubuna ait cinsiyet, ağırlık ve yaş dağılımı	71
Şekil 4-3 Irk çeşitliliği	72
Şekil 4-4 HO ve VO öncesi ile sonrası Delta PSD topografik haritası	77
Şekil 4-5 HO ve VO öncesi ile sonrası Teta PSD topografik haritası	79
Şekil 4-6 HO ve VO öncesi ile sonrası Alfa PSD topografik haritası	81
Şekil 4-7 HO ve VO öncesi ile sonrası Beta PSD topografik haritası	83



TABLO LİSTESİ

Sayfa No

Tablo 2-1 Beyin ile ilişkili frekans bantlarına ait özellikler [60]	11
Tablo 2-2 Yaygın anksiyete bozukluklarının türleri ve özellikleri [98]	15
Tablo 4-1 Anket verilerinin değerlendirilmesi	73
Tablo 4-2 Nörokimyasal seviyelere ait bulgular	74
Tablo 4-3 Delta frekansına ait bulgular	76
Tablo 4-4 Teta frekansına ait bulgular	78
Tablo 4-5 Alfa Frekansına ait bulgular.....	80
Tablo 4-6 Beta frekansına ait bulgular	82
Tablo 4-7 Anket-EEG Delta bandı PSD korelasyonu	84
Tablo 4-8 Anket-EEG Teta bandı PSD korelasyonu.....	85
Tablo 4-9 Anket-EEG Alfa bandı PSD korelasyonu.....	86
Tablo 4-10 Anket-EEG Beta bandı PSD korelasyonu.....	87
Tablo 4-11 EEG Delta PSD-Nörokimyasal korelasyon	88
Tablo 4-12 EEG Teta PSD-Nörokimyasal korelasyon.....	88
Tablo 4-13 EEG Alfa PSD-Nörokimyasal korelasyon.....	89
Tablo 4-14 EEG Beta PSD-Nörokimyasal korelasyon.....	89
Tablo 4-15 Nörokimyasal-Anket verileri korelasyonu.....	90
Tablo 4-16 Demografik veriler ile Anket korelasyonu (dişi)	91
Tablo 4-17 Demografik veriler ile Anket korelasyonu (erkek)	92

SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

Simgeler	Açıklama
----------	----------

μV	: Mikrovolt
Hz	: Hertz
β	: Beta
$^{\circ}\text{C}$	: Santigrat Derece
μL	: Mikrolitre
Σ	: Toplama İşareti
Δ	: Delta
Π	: Pi

Kısaltmalar	Açıklama
-------------	----------

EEG	: Elektroensefalografi
HE	: Hericium Erinaceus
VO	: Valeriana Officinalis
BT	: Bilgisayarlı Tomografi
MRI	: Manyetik Rezonans Görüntüleme
fMRI	: Fonksiyonel Manyetik Rezonans Görüntüleme
PET	: Pozitron Emisyon Tomografisi
MEG	: Manyetoensefalografi
fNIRS	: Functional Near-Infrared Spectroscopy
SSRI	: Selektif Serotonin Gerilim İnhibitörü
SNRI	: Serotonin-Noradrenalin Gerilim İnhibitörleri
rTMS	: Tekrarlayan Transkraniyal Manyetik Stimülasyon
tDCS	: Transkraniyal Doğru Akım Stimülasyonu
HPA	: Hipotalamik-Hipofiz-Adrenal
sAA	: Tükürük Alfa Amilaz
sC	: Tükürük Kortizolü
SAD	: Sosyal Anksiyete Bozukluğu
CBT	: Bilişsel Davranış Terapisi

5-HT	: 5-Hidroksitriptamin (Serotonin)
ELISA	: Enzim Bağlantılı Immünosorbent Deneyi
UV-Vis	: Ultraviyole ve Görünür ışık
Na	: Sodyum
K	: Potasyum
Fp	: Pre-Frontal
ERP	: Olayla İlgili Potansiyeller
DSM-5	: Mental Bozuklukların Tanısal ve Sayımsal El Kitabı IV
rTMS	: Tekrarlayan Transkraniyal Manyetik Stimülasyon
tDCS	: Transkraniyal Doğru Akım Stimülasyonu
ACT	: Kabul ve Kararlılık Terapisi
YAB	: Yaygın Anksiyete Bozukluğu
PB	: Panik Bozukluğu
WHO	: Dünya Sağlık Örgütü
rpm	: Dakikadaki Devir Sayısı
GABA	: Gama-Aminobütirik Asit
HPA	: Hipotalamik-Tipofiz-Adrenal
sAA	: Tükürük Alfa Amilazı
CBT	: Bilişsel Davranış Terapisi
DA	: Dopamin
SAD	: Sosyal Anksiyete Bozukluğu
EIA	: Enzim İmmünolojik Tahlili
NREM	: Hızlı Olmayan Göz Hareketi Uykusu
cc	: Santimetreküüp
TST	: Karanlık Dönemde Toplam Uyku Süresinin
NGF	: Sinir Büyüme Faktörü
ACTH	: Adrenokortikotropik Hormon
CRH	: Kortikotropik Salgılatıcı Hormon
NPY	: Nöropeptid-Y
CCK	: Kolesistokinin
EMA	: Avrupa İlaç Ajansı
FDA	: Amerikan Gıda ve İlaç İdaresi
HRP	: Horseradish Peroxidase
OD	: Optik Yoğunluk

ICA	: Bağımsız Bileşen Analizi
FIR	: Lineer Finite Impulse Response
EMG	: Elektromiyografi
EOG	: Elektrookülografi
PSD	: Güç Spektral Yoğunluğu
FFT	: Hızlı Fourier Dönüşümü
DFT	: Ayrık Fourier Dönüşümünü



ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ANKSİYETELİ KÖPEKLERDE *HERICIUM ERINACEUS* ve *VALERIANA OFFICINALIS* KULLANIMININ ETKİLERİNİN ELEKTROENSEFALOGRAFI YÖNTEMİ İLE ARAŞTIRILMASI

Çağın ÇEVİK

İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü

Biyofizik Anabilim Dalı

Biyofizik Programı

Danışman: Prof. Dr. Alev Meltem ERCAN

II. Danışman: Prof. Dr. Mehmet Erman OR

Bu çalışma anksiyete rahatsızlığında, doğal bir iyileştirici potansiyeli taşıyan ve piyasada bu amaca yönelik çeşitli formlarda satışı olan Kedi Otu (*Valeriana officinalis*) ve Aslan Yelesi Mantarı (*Hericum erinaceus*) ekstraktlarının belirlenen dozlarda dört haftalık tüketim sonrası anksiyete ile ilişkili davranışsal ve fizyolojik parametrelere odaklanılarak etkinliğinin araştırılmasını kapsamaktadır. Belirlenen örneklem grubu üzerinde etkinliği araştırılacak olan ekstraktlar ve uygulanan örneklem grubu ile aynı olan herhangi bir çalışmaya literatür araştırmasında rast gelinmemiştir. Gerçekleştirilen çalışma, amaç, materyal ve metodu kapsamında özgün yapıdadır. Çalışma materyali olarak anksiyete rahatsızlığı konusunda insanlar ile oldukça fazla ortak özellik taşıyan köpekler tercih edilmiştir. Belirtilen bitkilerin ayrı olarak kullanımının ileriki dönemde çalışılması planlanan sinerjik etki araştırmasına alt yapı oluşturması hedeflenmektedir. Bu kapsamda bitkisel ekstraktlar sertifika onaylı üreticilerden temin edilerek ultraviyole ve görünür ışık (UV-Vis) absorpsiyon spektroskopisi ile içerdikleri toplam fenolik madde belirlenmiş, standardizasyon sağlanmıştır. Çalışmaya katılması planlanan köpeklerin sahiplerine çalışma başlangıcında uygulanan anket ile hastaların uygunlukları belirlenmiş ve bu kapsamda değerlendirme yapılmıştır. Aynı anket uygulaması çalışma bitiminde de tekrarlanmıştır. Ardından eliminasyon kriterleri doğrultusunda uygun olan köpeklere genel muayene yapılmıştır. Devamında davranışsal sorunların araştırılmasında etkin bir yol olan Elektroensefalografi (EEG) uygulaması ile frontal ve temporal bölgeler olmak üzere ekstraktların kullanımı öncesi ve sonrasında her bir

hastanın kafatası üzerinden beyinlerine ait elektriksel aktivite kaydı alınmıştır. EEG sinyallerinin işlenmesi gerçekleştirilerek beyin bölgelerinin elektriksel delta, teta, alfa ve beta frekans bantlarına ait güç spektrum farklılıkları tespit edilmiştir. Nörokimyasallar olarak bilinen dopamin, serotonin ve kortizol hormonlarının da düzeyleri yine ekstrakt kullanımı öncesi ve sonrasında serum örnekleri üzerinden ticari kitler kullanılarak ölçülmüştür. Elde edilen verilerin özelliklerine göre uygun hipotez ve korelasyon testleri uygulanmıştır. Ekstraktların kullanımı ile birlikte iki grupta birbirinden farklı bulgular elde edilmiş ve ilgili literatür tarafından desteklenir nitelikte anksiyete durumunun azaldığına dair çalışma bulguları raporlanmıştır.

Aralık 2022 , 154 sayfa.

Anahtar kelimeler: Anksiyete, Köpek, Elektroensefalografi, Hericium Erinaceus, Valeriana Officinalis



ABSTRACT

M.Sc. THESIS

INVESTIGATION OF THE EFFECTS OF *HERICIUM ERINACEUS* AND *VALERIANA OFFICINALIS* USE IN ANXIOUS DOGS BY ELECTROENCEPHALOGRAPHY METHOD

Çağın ÇEVİK

İstanbul University-Cerrahpaşa

Institute of Graduate Studies

Department of Biophysics

Biophysics Program

Supervisor: Prof. Dr. Alev Meltem ERCAN

Co-Supervisor: Prof. Dr. Mehmet Erman OR

The present study focuses on the behavioral and physiological parameters associated with anxiety after consumption of *Valeriana officinalis* and *Heridium erinaceus* extracts. These herbs have anxiety-healing potential and available on the market for this purpose. In the literature search, no study was found that is the same as the extracts and the method, the effectiveness of which will be investigated on the determined sample group. The work carried out has a unique structure within the scope of its purpose, material and method. Dogs, which have a lot in common with humans in terms of anxiety, were preferred as study material. In this study, it is aimed to create a basis for the synergistic effect of these plants. Herbal extracts were obtained from certified producers. Total phenolic content was determined by UV-Vis spectroscopy and standardization was achieved. Patients was determined by the questionnaire applied to the owners of the dog. Questionnaire repeated at the end of the study. The dogs that were suitable in accordance with the elimination criteria were clinically examined. With the Electroencephalography (EEG), which is an effective way to investigate behavioral problems, electrical activity of the brains of each patient were taken over the skull before and after the use of extracts, especially in the frontal and temporal regions. By processing the signals, the power spectrum differences of the delta, theta, alpha and beta frequency bands of the brain regions were determined. The levels of dopamine, serotonin and cortisol, known as neurochemicals, were measured using commercial kits on serum samples before and after. According to data, appropriate hypothesis and correlation tests were applied. With the use of

extracts, different findings were obtained in the two groups, and the findings of the study, which were supported by the relevant literature, were reported to reduce the anxiety state.

December 2022, 154 pages.

Keywords: Anxiety, Dog, Electroencephalography, *Hericium Erinaceus*, *Valeriana Officinalis*



1. GİRİŞ

Evcil köpekler (*Canis familiaris*) insanlara benzer şekilde yaygın olarak korku ve kaygı ile ilgili davranış sorunları yaşamaktadırlar [1]. Son 25 yılda, evcil köpeklerde davranış problemleri ile karşılaşılması giderek yaygınlaşmakta ve davranış tıbbı hızla gelişen bir alan haline gelmektedir [2]. Köpekler ile insanların ortak özellikleri sebebiyle çalışma kapsamındaki deneysel uygulamaların insanlarda da başarısının gözlemlenmesi öncesi ön çalışma materyali olarak anksiyeteli köpeklerin tercih edilmesi uygun bir yöntem olarak görülmektedir. Böylelikle aynı zamanda evcil köpeklerdeki anksiyete durumunun iyileştirilmesine yönelik katkı sağlamakta amaçlanılmaktadır. Deneysel ön materyal olarak tercih edilecek köpeklerin çalışma kapsamında uygun anksiyete rahatsızlığı olanlarının tespitinin, çeşitli davranışların aşırılığına yönelik anket formatında puanlanması ile mümkün olduğunu gösteren çok sayıda yayın mevcuttur [3-7].

Anksiyete bozukluklarının birden çok etiyolojik faktörü vardır ve son zamanlarda anksiyete bozukluklarının etiyolojisinde biyopsikososyal faktörlerin önemli olduğu kabul edilmektedir [8,9]. Günümüzde anksiyete araştırmalarında yoğun olarak nörogörüntüleme araştırmalarına odaklanılmıştır. Bu yaklaşım biyolojik yapının anksiyete ile ilişkisini şekillendirmede yeni ve kapsamlı bir anlayışa duyulan ihtiyaca dayanmaktadır [10].

Nörogörüntüleme çalışmaları, anksiyete ile ilgili olaylar sırasında beynin hangi alanlarının aktive edildiğini öğrenmeye çalışmaktadır [11]. Geçmiş çalışmalarda, değişen dikkat kontrolünün anksiyete bozukluklarında mevcut olduğu ve beyin aktivitesindeki elektroensefalogram (EEG) ile kaydedilebilen spesifik değişikliklerle ilişkili olduğu gösterilmiştir [12]. Beynin elektriksel aktivitelerinin incelenmesi amacıyla EEG mükemmel zamansal çözünürlüğe sahiptir. EEG aynı zamanda teknik olarak uygulanabilmesi adına yaygın olarak bulunabilmesi ve ucuzluğu ile diğer nörogörüntüleme yöntemlerinden ayrılmaktadır [13].

EEG kayıtları kaygıyla ilişkili beyin aktivitelerinin değerlendirilmesinde de önem taşımaktadır [14]. Beyin aktivitesi ile ilişkili olarak gerçekleştirilen EEG ölçümlerine ait sinyal analizleri sonrası farklı frekans aralıklarındaki güç spektrum yoğunluklarının anksiyete ile ilişkilendirildiği pek çok araştırma tarafından bildirilmiştir [15-20]. Bu nedenle EEG,

anksiyete bozukluklarının biyolojik özelliklerini incelemek için öncelikli tercih edilebilecek bir yöntemdir.

Nörotransmitterler ise anksiyete süreci boyunca sinirler arası iletişime ve kontrole yardımcı olan kimyasallardır. Nörotransmitterlerin eylem veya duyarlılığındaki varyasyonlar farklı tipteki anksiyete bozukluklarından sorumlu olabilmektedir [11].

Serotonerjik ve dopaminerjik sistemlerin çeşitli hayvan modellerinde ve insanlarda anksiyete ile stres gelişiminde rol oynadığı ve beyinde serotonin sisteminin kaygının düzenlenmesinde etkili olduğu tespit edilmiştir [21,22]. Farklı hayvan modellerindeki çalışmalarda ise kortizol seviyesindeki dalgalanmaların stres mekanizmasındaki etkin rolü ortaya koyulmuştur [23].

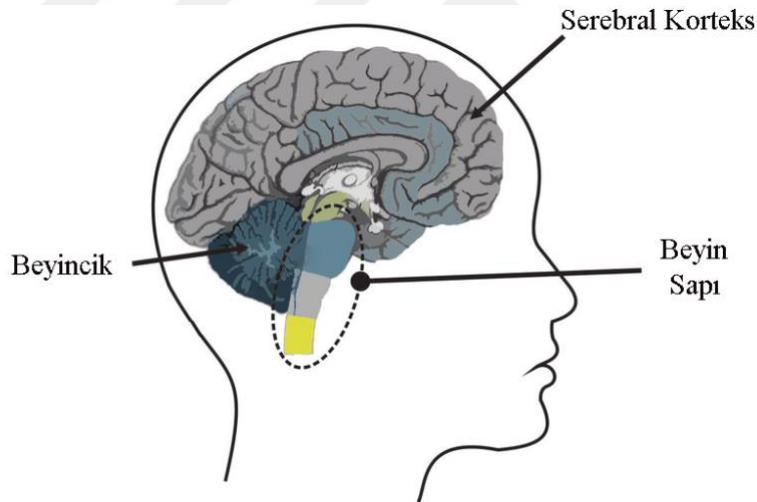
Yaygın olarak görülen anksiyete/korku, gürültü fobisi, saldırganlık gibi durumların tedavisinde genellikle kullanılan sentetik ilaçların yan etkileri olduğu bilinmektedir. Anksiyetenin tedavisinde, olumsuz yan etkilerden korunmak açısından bitkisel kaynaklı gıda takviyeleri, sentetik ilaçlara kıyasla daha fazla tercih edilmektedir. Bu doğrultuda özellikle Amerika ve Avrupa’da piyasada yaygın olarak bulunan, hekimler tarafından doğal sakinleştirici, anksiyete giderici ve sinir hücrelerinin sağlığını destekleyici özelliklerinden yararlanmak amacıyla Kedi Otu (*Valeriana officinalis*) ve Aslan Yelesi Mantarı (*Hericium erinaceus*) gıda takviyesi olarak önerilmektedir. Hali hazırda kullanılmakta olan bu içeriklere ait kullanım sonrası etkinlik belirteçleri bilimsel metodlar ile köpekler üzerinde gözlemlenerek araştırmanın sürdürülmesi ve olumlu/olumsuz sonuçlar elde edilmesi durumunda bilimsel kanıtlara sahip olunması hedeflenmektedir.

Çalışmada nöropsikiyatrik hastalık çalışmalarında önemli bir araştırma yöntemi olan EEG uygulaması ile birlikte elde edilecek sinyaller, delta, teta, alfa ve beta frekans bantlarına ayrıştırılarak güç spektrumları oluşturulmuştur. Seviyelerindeki değişimlerin anksiyete üzerinde önemli ilişkileri olduğuna yönelik çeşitli çalışmanın mevcut olduğu dopamin, serotonin ve kortizol’ün ölçümleri yapılmıştır. Tüm bunların yanında demografik ve davranış anketi verileri toplanmıştır. Toplanan tüm bu veriler aracılığıyla uygulanan hipotez testleri ve korelasyon analizleri üzerinden, elde edilen bulguların yorumlanarak çalışma kapsamında kullanılan tüm materyal ve metodun etkinliğinin ve literatüre katkısının bulunup bulunmayacağı sorusu ele alınmıştır. Çalışmaya ait amaç, materyal ve metod, literatür taraması sonucu daha önce bu yapıda çalışmaya denk gelinmemesi sebebiyle eksikliği olduğu düşünülen alana katkı yapmak amacıyla özgün yapıda tasarlanmıştır.

2. KAVRAMSAL ÇERÇEVE

2.1. Beyin Yapısı ve Fonksiyonları

Beyin, Şekil 2-1’de görülmekte olan serebrum, beyincik ve beyin sapı olmak üzere üç bölümden oluşur [24]. Hareketleri koordine etmek, duruşu korumak ve dengeyi sağlamak gibi işlevler, serebrumun altında bulunan beyincikte işlenir [24]. Orta beyin, pons ve medulladan oluşan beyin sapı, serebrum ve beyinciği omuriliğe bağlayan bir röle merkezi görevi görür. Beyin sapı, solunum, kalp atış hızı, vücut ısısı, uyanma ve uyku döngüleri, sindirim gibi birçok otomatik vücut fonksiyonunu yerine getirir [24].



Şekil 2-1 Dorsal serebral korteks, beyincik ve beyin sapı çizimi [26]

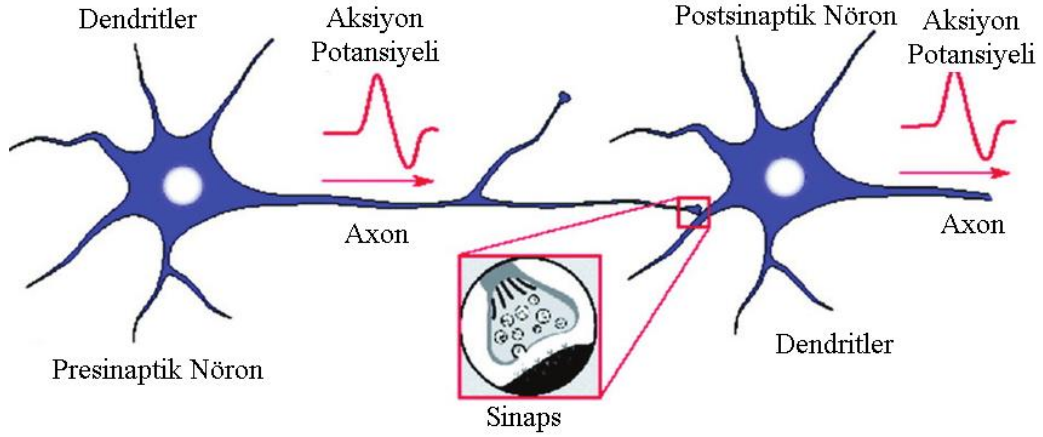
Evrin sürecinde omurgalı beyni değişikliğe uğramış ve daha etkin hale gelmiştir. Tüm omurgalı beyinlerinin yapısı temelde aynıdır. Sözde 'az gelişmiş' hayvanlarda, beyin yapısının çoğu veya tamamı kalıtsaldır ve bu nedenle davranışları çoğunlukla içgüdüselidir. Memelilerde ve özellikle insanda beyin, yaşam boyunca öğrenerek daha da gelişimini sürdürmektedir. Böylelikle, çevreye daha iyi uyum sağlamalarına yönelik avantaja sahip olmaktadır. Öğrenme kapasitesi en iyi serebrumun dış tabakası olan serebral kortekste görülmektedir [27].

Sol ve sağ yarım küre yapısına sahip, beynin en büyük ve en önemli kısmı olan serebrum, dokunma, görme ve duyma, konuşma, akıl yürütme, duygular, hafıza ve hareketin hassas kontrolü gibi daha yüksek işlevleri yerine getirir [24]. Serebrumun korteks adı verilen yüzeyi, girus adı verilen sırtlar ve sulkus veya çatlak adı verilen oluklar halinde katlanır. İki serebral hemisfer, dört loba (frontal, temporal, parietal ve oksipital) ayrılır. Frontal lob en önde bulunur ve en büyük lobdur. Bu lob, motor sistemin bir bölümünü barındırır ve dil, motivasyon, davranış konularında yürütücü işleve sahiptir. Temporal loblar dilin anlaşılmasını sağlarken, hafızayı, duyguyu destekler ve birincil işitsel girdiyi alır. Parietal loblar dokunsal girdileri alır ve görsel-uzaysal işlemenin yanı sıra okuma ve hesaplama becerilerine dahil olur. En arkada bulunan en küçük olan lob ise birincil görsel girdiyi alan ve görsel algıyı işleyen oksipital lobdur [46].

Korteks, insan beyinde bulunan ve gri maddeyi oluşturan nöronlar olarak adlandırılan 100 milyar sinir hücresinin yaklaşık %70'ini içerir [25]. Korteksin altında ve yarım küre arasında, bu nöronlara bağlanan yaklaşık 300 milyar akson bulunur ve bunlar, beynin derinlerinde bulunan yapılarla hemisferler arası bilgi alışverişini, iletişimi sağlar [46].

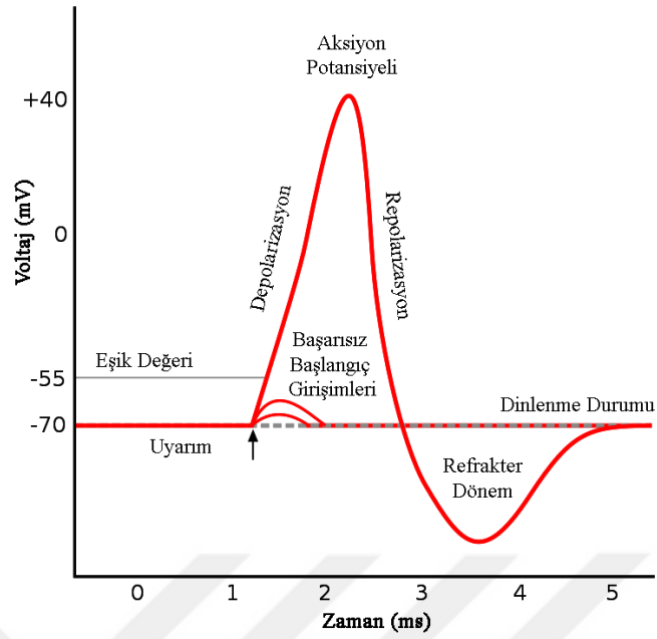
2.2. Nöronlar ve Beyin Sinyalleri

Nöron, bir hücre gövdesi, bir dendrit, bir akson ve bir sinapstan oluşur [29]. Hücre gövdesi, çekirdek gibi hücre yapısının ve hücre fonksiyonunun korunmasından sorumlu organelleri içerir. Hücre gövdesinin (soma) bir ucunda, nöronun alıcı yüzeyini artıran dendritler bulunur. Akson karşı taraftan çıkar ve nöronu başka bir nöronun dendritine bağlayan sinapsta son bulur [30]. Bir nöronun ana işlevi, dendritlerin reseptörleri ile nöral bilgileri almak ve akson yoluyla sinapsa iletmektir. İletim süreci Şekil 2-2'de görselleştirilmiştir. Sinirsel bilgi, bir nöronun zar potansiyelinde hızlı bir değişiklik olan aksiyon potansiyelleri olarak adlandırılan elektriksel impulslarda kodlanır. Bir nöronun dinlenme potansiyelinin büyüklüğü, hücre içi ve hücre dışı sıvıdaki spesifik iyon konsantrasyonlarındaki farklılıklara ve ayrıca çeşitli iyonlara yönelik membran geçirgenliğindeki farklılıklara bağlıdır [31].



Şekil 2-2 Biyolojik nöron ve sinaps yapısı [32]

Dinlenme potansiyeline en fazla katkıda bulunan iyonlar sodyum (Na^+) ve potasyumdur (K^+). Hücre içi ve hücre dışı sıvıdaki Na ve K konsantrasyonları, -70mV'lık bir dinlenme potansiyelini tanımlar. Nöron zarındaki voltaj kapılı kanallar, dinlenme potansiyelinden aksiyon potansiyeline geçişe izin verir. Aksiyon potansiyeli, voltaj kapılı Na^+ kanallarının açılmasına yönelik uyarımı sağlayan dendritlerde bir ilk depolarizasyon tarafından indüklenir. Na iyonlarının sinir hücresine akışı zar potansiyelinin artmasına neden olur. Kritik bir eşik potansiyeline ulaşılır ulaşılmaz, pozitif bir geri besleme döngüsü indüklenir, bu da membran potansiyelinin hızlı bir şekilde depolarizasyonuna neden olur, böylece membran içeride pozitif ve dışarıda negatif olur. Pozitif geri besleme döngüsü, Na^+ kanallarının inaktivasyonu ile bozulur. Bu noktada aksiyon potansiyeli, +30mV'de zirveye ulaşır ve bu arada açılan voltaj kapılı K^+ kanallarından potasyum akışı membran potansiyelini dinlenme potansiyeline geri getirir. Bu işleme repolarizasyon denir ve voltaj kapılı K^+ kanallarının negatif bir geri besleme ile kapanması ile sonlandırılır. Aksiyon potansiyelinin karakteristik yapısı ve açıklanan süreçler Şekil 2-3'te görülmektedir [32].



Şekil 2-3 Aksiyon potansiyeli karakteristiği ve oluşum döngüsü [33]

Bir uyarının başka bir aksiyon potansiyeli oluşturabilmesi için sinir hücreleri yaklaşık 2 ms'lik bir refrakter periyoda ihtiyaç duyar. Nöronun ilk segmentindeki aksiyon potansiyeli, aksonun zarının bitişik bölgesini depolarize eder, bu da zarı eşik potansiyeline getirir ve başka bir aksiyon potansiyelini indükler. Bu, aksiyon potansiyelinin dendritten akson boyunca akson terminaline gitmesine neden olur. Aksiyon potansiyelinin bir beyin hücresi (nöron) yoluyla hareketi, manyetoensefalografi (MEG) ile ölçülebilen bir manyetik alan ve elektroensefalogram (EEG) ile ölçülebilen, kafa derisi üzerinde ikincil bir elektrik alan oluşturan bir akım üretir [31].

2.3. Nörogörüntüleme Çalışmaları

Nörogörüntüleme, bilimsel beyin çalışmaları için nesnel bir yol olarak geliştirilen, merkezi sinir sisteminin yapısını ve işlevini incelemek amacıyla nicel (hesaplamalı) tekniklerin kullanılmasıdır. Bu çok disiplinli araştırma alanı, beyin hastalıkları ve psikiyatrik hastalıklar ile ilgili çalışmalar için de giderek artan bir şekilde kullanılmaktadır.

Nörogörüntüleme, beyin bozuklukları veya zihinsel sağlık koşulları olan kişilerde beyin farklılıklarını tanımlayabilmek için, ayrıca psikolojide beynin belirli alanlarının nelerden sorumlu olduğunun derinlemesine araştırılmasına imkan vermesi sebebiyle önemlidir. Mevcut

nörogörüntüleme teknikleri tipik olarak beynin hem yapısını hem de işlevlerini gösterebilmektedirler.

Günümüzde yaygın olarak kullanılan nörogörüntüleme teknikleri olan bilgisayarlı tomografi (BT), manyetik rezonans görüntüleme (MRI), fonksiyonel MRI (fMRI) ve pozitron emisyon tomografisi (PET) sinir sisteminin hem anatomik hem de fonksiyonel görselleştirmelerini sağlamaktadır. Bu imkanlar ile modern tıp, sinirbilim ve psikoloji alanlarının ilerleyişine büyük ölçüde katkı sağlanmıştır [34].

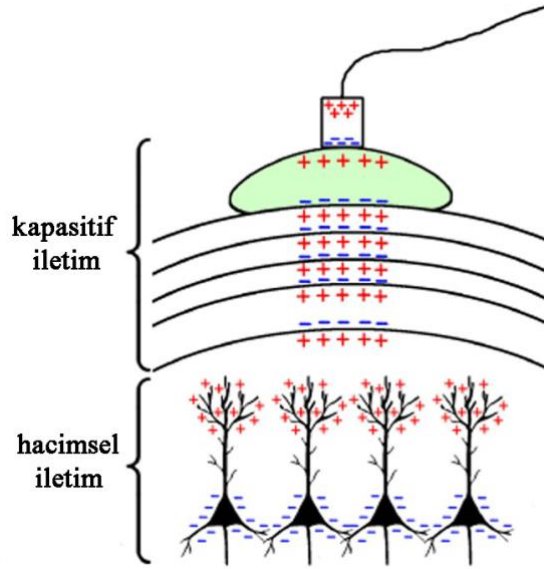
EEG, fMRI, MEG, fonksiyonel yakın kızılötesi görüntüleme yöntemi (fNIRS) gibi gelişmiş nörogörüntüleme teknikleri, denekler çeşitli algısal, motor ve/veya bilişsel görevleri gerçekleştirirken, araştırmacıların beyin aktivitelerini doğrudan gözlemlemelerine olanak tanır. Hızlı gelişimi ve geniş uygulamaları ile beyin görüntüleme teknikleri, bilişsel sinirbilim araştırmalarının manzarasını derinden değiştirmiştir. İşlevsel beyin görüntülemeyi sofistike deneysel tasarımlar ve veri analiz yöntemleriyle birleştirerek beyin bölgelerinin işlevleri ve etkileşimleri incelenebilmektedir [35].

Beynin elektriksel aktivitelerini kaydetmek için kullanılan EEG ise mükemmel zamansal çözünürlüğe sahip olmasının yanında teknik olarak uygulanabilmesi adına yaygın olarak bulunabilmesi ve ucuzluğu ile diğer yöntemlerden ayrılmaktadır [13].

2.3.1. Elektroensefalografi

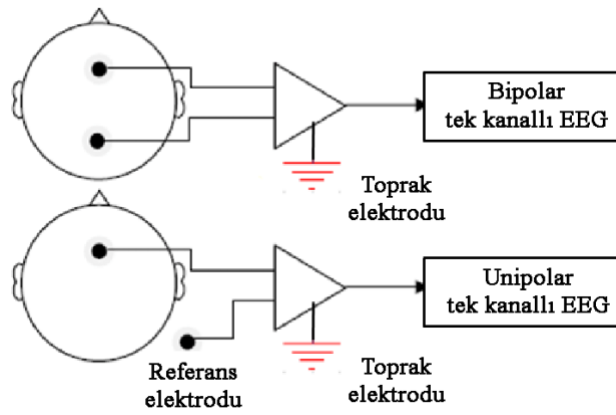
İlk insan EEG kaydı 1924 yılında Alman psikiyatrist Hans Berger tarafından alınmış ve günümüze kadar, nöroloji ve klinik nörofizyoloji alanında önemli bir araç haline gelmiştir [12, 14]. EEG günümüzde sinirbilimde bilişsel süreçleri incelemek için yaygın olarak kullanılan bir araçtır [36].

EEG sistemi, beyindeki nöronların elektrik sinyallerini alan kafaya bağlı çoklu elektrotlardan ve bu sinyalleri elektroensefalogram olarak kaydeden bir makineden oluşur [32]. Beyin elektriksel aktivitesi, kafa derisinin yüzeyindeki elektrotlar (invaziv olmayan) veya intrakraniyal (invaziv) elektrotlar kullanılarak algılanabilir. Bu elektrotlar, binlerce nöronun aktivasyonları ile üretilen lokal iyonik akımlar olduğunda meydana gelen voltaj dalgalanmalarını algılamaktadırlar [37]. Nöron aktivasyonunun senkronize şekilde, nöronal potansiyel kapasitif bir etki ile üst katman üzerinde hareketi Şekil 2-4'te görselleştirilmiştir.



Şekil 2-4 Nöronlardan elektrotlara EEG sinyal aktarımı [38]

EEG işlemi belirli kanallar arasındaki elektriksel potansiyel farkının ölçülerek sunulmasıdır. Bu sebeple farkın alınacağı elektrotlar belirlenmelidir. Tek kutuplu (monopolar) montaj yönteminde ortak bir elektrot yada bir değer referans alınırken, çift kutuplu (bipolar) montaj yönteminde ise her elektrot için farklı bir elektrot referans alınır [38,19]. Şekil 2-5'te tek kanallı EEG yapısına yönelik bipolar ve monopolar düzen görülmektedir.

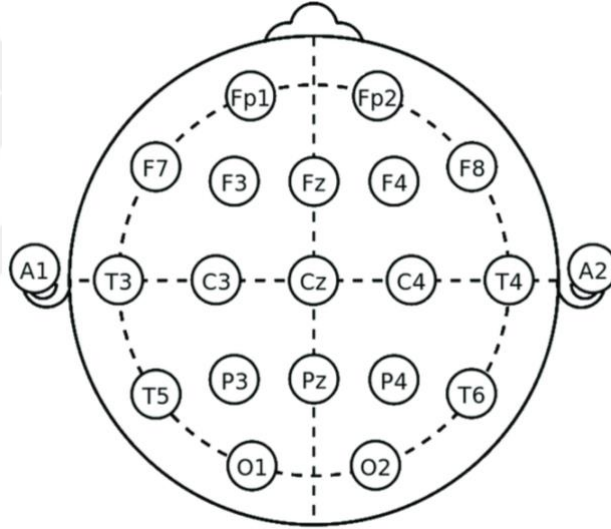


Şekil 2-5 Çift kutuplu (üstte) ve tek kutuplu (altta) tek kanal EEG düzeni [39]

Yaygın olarak yüzey EEG'si çalışmalarında elektrotlar uluslararası 10-20 elektrot ayarına göre konumlandırılmaktadır [40]. Şekil 2-6'da görülen standart olan 10-20 elektrot

düzeni 21 elektrodu dikkate alırken, 74 elektrot için 10-10 sistemi ve 345 elektrota kadar 10-5 sistemi gibi daha yüksek elektrot yoğunluğuna yönelik diğer sistemler kullanılır [36].

Elektrot etiketlerine gelince, her elektrot kişinin kafa derisindeki konumuna göre isimlendirilir: ilk harf beynin ait olduğu bölgeye göre tanımlanır (Pre-Frontal – “Fp”, Frontal – “F”, Temporal – “T”, Merkez – “C”, Parietal – “P” ve Oksipital – “O”) veya bölgeler arası (Pre-Frontal ve Frontal – “AF”, Frontal ve Central – “FC”, Frontal ve Temporal – “FT”, Merkez ve Parietal – “CP” ve Parietal ve Oksipital arasında ise “PO”). Ayrıca, elektrot beynin orta hat sagital düzleminde yer alıyorsa, ek bir “z” harfine sahip olmaktadır (Fpz, Fz, Pz, Cz, Oz). Belirli bir elektrot sol yarım kürede bulunuyorsa tek bir sayı ile ilişkilendirilir (Fp1, F7, P3, C1, O1), sağ yarım kürede yer alıyorsa çift sayı olarak kabul edilir (Fp2, F8, P4, C2, O2) [93].



Şekil 2-6 10-20 Uluslararası EEG elektrot yerleştirme sistemi [41]

Sinyaller tipik olarak mikrovolt (μV) cinsinden ölçülür, yaklaşık 10-100 μV genlik sunar ve genellikle 5 ana frekans bandına (Delta, Teta, Alfa, Beta ve Gama) bölünür [46].

Tek bir nöronun akımı EEG veya MEG ile ölçülemeyecek kadar zayıf olduğundan, tespit edilen sinyal daha çok bir nöronal popülasyonun senkron aktivitesini temsil eder [55]. Ateşleme gerçekleşen nöronların konumu, bu sinyallerin yorumlanması için çok önemlidir [155]. Ancak bu konumların tahmini EEG ve MEG'de temel bir problemdir. Kafa derisi üzerinde kaydedilen elektriksel potansiyellerin veya manyetik alanların dağılımına dayalı nöronal kaynakların tahmini ters problem olarak adlandırılır [156]. Bu problem için tek bir

özüm bulunmadığından, mevcut kaynağın yerini tahmin etmek için çeşitli yöntemler kullanılmaktadır [54].

2.3.2. EEG ile Beyin Aktivitesinin Analizi

Beyin aktivitesi olayla ilgili potansiyel ölçümleri ve sürekli deneysel yaklaşımlarla incelenebilir. Olayla ilgili deneylerde tipik olarak duyusal uyaranlar tarafından indüklenen aktivitedeki değişiklikler incelenir [41]. Yalnızca zaman alanında çalışılan bu değişikliklere olayla ilgili potansiyeller (ERP) denir ve uyarana nispeten sabit bir zaman gecikmesiyle meydana geldiği varsayılır [95].

Olayla ilgili deneylerin aksine sürekli deneyler, beyin aktivitesindeki zamana bağlı olmayan değişiklikleri inceler [96,97]. Böyle bir deney tasarımı seçmenin birkaç nedeni vardır. Belirli görevler veya kontrollü uyaranlar olmadığı durumda, beynin “dinlenme durumunun araştırılması yapılabilir. Sürekli paradigmaların analizi ile tipik olarak, frekans alanında veya beyin bölgeleri arasındaki bağlantıda baskın kalıplar belirlenilmeye çalışılabilir [41].

EEG sinyalleri, 0,5 Hz ile 40 Hz veya daha yüksek değerler arasında değişen oldukça geniş bir frekans spektrumuna sahiptir [60]. Bu aralık, delta (0,5-4Hz), teta (4-7,5Hz), alfa (8-13Hz), beta (14-26Hz) ve gama (>30Hz) ritimleri olarak adlandırılan beş farklı frekans bandına bölünebilir. Bu frekans bantlarına ait çeşitli özellikler Tablo 2-1’de açıklanmıştır.

Tablo 2-1 Beyin ile ilişkili frekans bantlarına ait özellikler [60]

	<i>Delta</i>	<i>Teta</i>	<i>Alfa</i>	<i>Beta</i>	<i>Gama</i>
Frekans	0.5-4 Hz	4-7.5 Hz	8-13 Hz	14-30 Hz	> 30 Hz
<i>Bilinç Durumu</i>	Derin Uyku	Bilinç / Uyuşukluk	Dikkat veya konsantrasyon olmadan rahat farkındalık	Uyanık durum	Uyanık durum
<i>İlişki</i>	Uyku	Bilinçsiz zihin durumu, yaratıcı ilham, derin meditasyon	Gözlerin açılması, yabancı sesler duyma, kaygı, zihinsel konsantrasyon veya dikkat ile ortadan kalkar.	Aktif düşünme, aktif dikkat, dış dünyaya odaklanma, problem çözme	Aktif düşünme, aktif dikkat, dış dünyaya odaklanma, problem çözme
<i>Beyin Bölgesi</i>		Ön bölgeler	Başın arka yarısı, oksipital bölge	Ön ve orta bölgeler	Ön ve orta bölgeler
<i>Diğer Faktörler</i>	Kas aktivitesi nedeniyle artefakt sinyalleriyle karıştırılması muhtemeldir	Bebeklik ve çocuklukta önemli rol, yetişkinlerde patolojik olabilir	En belirgin ritim	Normal yetişkinlerde bulunur, motor aktivite veya dokunsal uyarı ile bloke edilebilir.	Aktif düşünme, aktif dikkat, dış dünyaya odaklanma, problem çözme

Daha düşük frekanslar daha az tepki verilen durumları gösterirken, daha yüksek frekanslar artan uyanıklığı gösterir. Bu nedenle, delta ritmi öncelikle derin uyku ile ilişkilidir, ancak uyanıklık durumunda da mevcut olabilir. Delta dalgalarını boyun ve çene kaslarının aktivasyonundan kaynaklanan miyojenik artefaktlardan ayırt etmek zordur. Teta ritminin talamik kökenli olduğu varsayılır ve uyuşukluktan bilince geçiş sırasında ortaya çıkar. Teta salınımları tipik olarak bilinçsiz zihin durumu, yaratıcı ilham ve derin meditasyon ile ilişkilendirilirken, aynı zamanda duyuşal olarak uyarılma düzeyi ile de ilişkili görünmektedir. Ayrıca, teta dalgaları bebeklik ve çocuklukta önemli bir rol oynarken, yetişkinlerde baskın görünüm patolojik olarak kabul edilir. Alfa salınımları beynin arka yarısında, özellikle oksipital bölgelerde görülür. Alfa dalgası en belirgin ritimdir ve herhangi bir dikkat veya konsantrasyon olmaksızın rahatlamış farkındalığın bir göstergesi olarak düşünülmektedir. Tipik olarak ön ve merkezi bölgelerde bulunan beta ritmi olağan uyanıklık durumunu gösterir [60]. Beta bandı, aktif düşünme, aktif dikkat, dış dünyaya odaklanma veya somut problemleri çözme ile ilişkilidir. Gama salınımı nadiren meydana gelir ve çok düşük genliğe sahiptir,

ancak beynin olayla ilgili senkronizasyonunu gösterdiği kanıtlanmıştır [60]. Genel olarak, genlik artan frekansla azalır, yani örneğin alfa ritmi, beta veya gama ritminden daha yüksek bir genliğe sahiptir [61]. Bu aynı zamanda frekans bandı içinde de geçerlidir, öyle ki düşük alfa bileşeni, yüksek alfa bileşeninden daha yüksek bir genliğe sahiptir [60].

Çalışmalar, alfa gücünün bilişsel süreçlerde ve hafızada da yer aldığını göstermektedir [62,90,73]. Alfa gücü ve farkındalığın pozitif korelasyonunun gözlemlenmesi, asıl görevin performansını kolaylaştırmak veya çalışan bellek süreçlerini desteklemek için gerekli olmayan işlemlerin engellendiği teorisine yol açmaktadır [62]. Son on yılda elde edilen bulgular, bilişsel ve hafıza performansı bağlamında alfa ve alt teta aktivitesi arasında karşılıklı bir ilişki tespit etmektedir [74].

2.4. Anksiyete Kavramı ve Bozuklukları

Anksiyete bozukluğu olan hastalar, tehditle ilgili durumlara aşırı artan ilgiye sahiptirler. Bununla birlikte, belirsiz uyaranların tehdit edici olarak yanlış yorumlanmasına yol açan bilişsel önyargı durumu da mevcuttur. Kaygı, hayvanlar aleminde doğal olarak karşılanan normal bir insani duygudur; bir dereceye kadar kaygı canlılara biyolojik avantaj katmaktadır. Kadınlarda anksiyete bozukluklarındaki neredeyse erkeklerin iki katı olan yüksek prevalansın, çocukların korunmasında büyük avantajı olduğu düşünülmektedir. [76].

Anksiyete bozukluğu, hastada belirli ani stresli durumlar sebebiyle ağırlaşabilmektedir. Ancak bunun haricinde, son zamanlardaki yaşanan stresli olaylarla bağlantılı olmayarak gerçekleşen anksiyete durumu da yaygındır. Yaygın anksiyete bozukluğu, tehdit, huzursuzluk, sinirlilik, uyku bozukluğu, gerginlik duyguları, çarpıntı, ağz kuruluğu ve terleme gibi semptomlarla karakterizedir [38]. Bu semptomlar, bağımsız şikayetlerden ziyade anksiyete sendromunun bir parçası olarak kabul edilir. Anksiyete durumundaki semptomlar diğer yaygın ruhsal bozukluklarınkilerle büyük ölçüde örtüşmektedir. Yaygın anksiyete bozukluğunun tekrarlayan bir seyri vardır ve müdahale nadiren semptomların tamamen çözülmesiyle sonuçlanır. Kısa ve orta vadede etkili tedaviler arasında bilişsel davranışçı terapi gibi psikolojik terapiler; bilişsel davranışçı terapi ilkelerine dayalı kendi kendine yardım yaklaşımları; ve özellikle seçici serotonin geri alım inhibitörleri olan farmakolojik tedaviler mevcuttur [76,82,92].

Anksiyete bozuklukları hiperventilasyona, bağışıklık fonksiyonunun bozulmasına veya sindirim fonksiyonunun değişmesi gibi ciddi sorunlara neden olabildiği gibi koroner kalp hastalıklarına veya intihar gibi şiddetli davranışlara da neden olabilir [42,43,100].

Korku ve kaygı, tehlikeli veya zararlı durumlarda hayatta kalmak veya bunlarla başa çıkmak için gerekli olan en temel duygular arasındadır [44]. Bu evrimsel önemli ve yüksek oranda korunan duygusal durumlar, doğada hayvanlarda zindelik ve hayatta kalma için çok önemlidir. Bununla birlikte, korku gibi temel bir duygu, uzun süreli ve genelleştiğinde patolojik özelliklere dönüşebilir. Anksiyete bozuklukları, %28 prevalansı ile insanlarda en sık görülen bozukluklar arasındadır ve bu tez konusunun örneklem grubu olan evcil köpeklerde sıklıkla gözlenen davranış problemlerinin bir parçasıdır [45].

Korku ya da kaygı uyandıran bir uyarana maruz kalındığı durumda fizyolojik bir stres tepkisi oluşmaktadır. Stres iki ana kategoriye ayrılabilir: Eustres ve negatif stres. Negatif stres ayrıca sıkıntı veya aşırı stres olarak da adlandırılır. Eustress, hayvanın çevreye uyum sağlamak için gösterdiği çabanın normallik sınırları içinde olduğunu belirtir [1, 47].

Eustress örnekleri arasında evlat edinildikten sonra yeni bir eve uyum sağlamaya çalışan bir köpek ve sıcak bir günde dinlenmek için gölge arayan bir köpek sayılabilir. Aşırı stres ve sıkıntı terimleri, stres etkenine uyum sağlamak için gereken çaba ve enerji miktarı, yalnızca hayvanın farkında olabileceği veya olmayabileceği diğer önemli biyolojik işlevlerin (örneğin, büyüme ve üreme) zararına olduğunda kullanılır. Buna bir örnek, yeni bir ortamın stresi veya orijinal sahiplerinden ayrılması nedeniyle normal fizyolojik ve endokrin işlevi değiştiği için artık çoğalamayan bir köpek olabilir. Bir sıkıntı örneği, köpeğin, sahibinin evden ayrılmasıyla ilgili o kadar şiddetli bir kaygıya sahip olması, şiddetle sallanması ve sahibi dönene kadar yemek yememesi veya dinlenmemesi olabilir. Köpeklerde strese neden olabilecek birçok şey/olay vardır. Bir barınağa teslim olmak, yol kenarına terk edilmek, sahiplenilmek, yeni bir eve alışmak, köpek ilk sahibiyle birlikte olsa bile yeni bir eve taşınmak ve doğal afetler bunlara örnek verilebilir [47].

2.4.1. Anksiyetenin Sınıflandırılması

Tıbbi bir duruma bağlı kaygı bozukluğu, doğrudan fiziksel bir sağlık sorununun neden olduğu yoğun kaygı veya panik belirtilerini içerir. Yaygın anksiyete bozukluğu, sürekli ve aşırı kaygıyı, etkinlikler veya olaylar hakkında hatta sıradan, rutin sorunlar ve endişeyi içerir. Endişe, gerçek durumla orantısızdır, kontrol edilmesi zordur ve fiziksel olarak ta olumsuz etkiye sahiptir. Genellikle diğer anksiyete bozuklukları veya depresyon ile birlikte ortaya

çıkar. Panik bozukluğu, dakikalar içinde zirveye ulaşan (panik ataklar) ani yoğun endişe ve korku veya terör duygularının tekrarlayan bölümlerini içerir. Nefes darlığı, göğüs ağrısı veya hızlı çarpan bir kalp (kalp çarpıntısı) gibi hisler olabilir. Bu panik ataklar, tekrar olmalarından endişe duyulmasına veya meydana geldikleri durumlardan kaçınılmasına neden olabilir. Seçici mutizm, çocuklar evde yakın aile üyeleriyle olduğu gibi çeşitli durumlarda konuşabilseler bile, okul gibi belirli ortamlarda tutarlı bir şekilde konuşamamalarıdır. Bu durum okul, iş ve sosyal işlevselliğe müdahale edebilir. Ayrılık kaygısı bozukluğu, çocuğun gelişim düzeyine göre, anne-babadan ya da anne-baba rolüne sahip diğer kişilerden ayrılmasıyla ilgili kaygı ile karakterize bir çocukluk çağı bozukluğudur. Sosyal anksiyete bozukluğu (sosyal fobi), utanç, öz bilinç ve başkaları tarafından yargılanma veya olumsuz olarak görülme endişesi nedeniyle yüksek düzeyde kaygı, korku ve sosyal durumlardan kaçınmayı içerir. Spesifik fobiler, belirli bir nesneye veya duruma maruz kalındığında ve bundan kaçınma arzusuyla karşılaşıldığında büyük endişe ile karakterize edilir. Fobiler bazı insanlarda panik ataklara neden olur. Maddeye bağlı anksiyete bozukluğu, ilaçların kötüye kullanılması, ilaç alınması, toksik bir maddeye maruz kalma veya uyuşturucuyu bırakmanın doğrudan bir sonucu olan yoğun anksiyete veya panik belirtileri ile karakterizedir. Agorafobi, paniklemeye ve kapana kısılmış, çaresiz veya mahcup hissetmeye neden olabilecek yerlerden veya durumlardan korkulan ve sıklıkla kaçınılan bir tür anksiyete bozukluğudur. Diğer tanımlanmış anksiyete bozukluğu ve belirtilmemiş anksiyete bozukluğu, anksiyete bozuklukları için kesin ölçütleri karşılamayan ancak sıkıntılı ve yıkıcı olacak kadar önemli olan anksiyete veya fobiler için kullanılan terimlerdir [48]. Yaygın görülen anksiyete türleri ile karakteristik özellikleri Tablo 2-2’de sıralanmıştır.

Tablo 2-2 Yaygın anksiyete bozukluklarının türleri ve özellikleri [98]

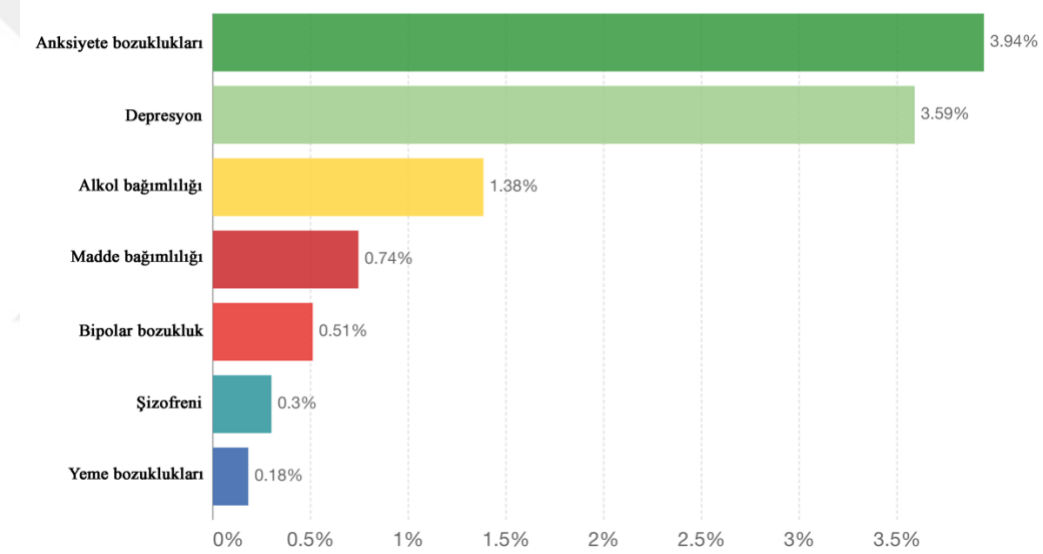
Anksiyete Bozuklukları	Karakteristikleri
<i>Ayrılık Anksiyetesi</i>	Genellikle çocuklukta gelişir, ancak yetişkinliğe kadar devam edebilir. Ayrılma konusunda aşırı korku ve/veya kaygı durumudur.
<i>Seçici Dilsizlik Durumu</i>	Konuşma beklentisinin olduğu sosyal durumlarda tutarlı bir şekilde konuşamama durumudur.
<i>Özel Fobi</i>	Korku, endişe, belirli nesnelerden veya durumlardan kaçınma.
<i>Sosyal Anksiyete Bozukluğu</i>	Korku, kaygı, belirli nesnelerden veya etkileşimlerden kaçınma. Başkaları tarafından olumsuz değerlendirilmeye yönelik düşünceye sahip olma.
<i>Panik Atak</i>	Tekrarlayan beklenmedik panik ataklar yaşanır ve daha fazla atak geçirme konusunda ısrarlı bir şekilde endişelenilir. Hasta panik ataklardan kaçınmak için davranışlarını değiştirebilir.
<i>Agorafobi</i>	Toplu taşıma, açık alanlar, kapalı yerler, sırada beklemek, kalabalıkta olmak ve/veya evin dışında yalnız kalmak konusunda korku ve endişe durumu.
<i>Yaygın Anksiyete Bozukluğu</i>	Çeşitli olaylar ve etkinlikler hakkında sürekli ve aşırı endişe durumu. Fiziksel belirtiler arasında huzursuzluk, gergin hissetme, kolayca yorulma, konsantrasyon güçlüğü, sinirlilik, kas gerginliği ve uyku bozukluğu yer alır.
<i>İlaç Kaynaklı Anksiyete Bozukluğu</i>	Bir madde veya ilacın varlığı veya yokluğu nedeniyle oluşan anksiyete durumu.
<i>Başka Bir Tıbbi Duruma Bağlı Kaygı</i>	Anksiyete belirtileri başka bir tıbbi durumun fizyolojik etkisi ile oluşur.

Köpeklerde paralel şekilde anksiyete, nesne ve duruma göre sosyal ve sosyal olmayan şekilde sınıflandırılabilir. Sosyal kategori, tanıdık olmayan insanlardan ve köpeklerden korkmayı içerirken, sosyal olmayan korku kategorisi, yeni durumlardan, yüksek seslerden, yüksekliklerden veya parlak veya kaygan zeminlerden korkma gibi farklı nesnelerden/durumlardan korkmayı içerir [49].

Köpeklerde kaygının en yaygın biçimleri olan genel korku, gürültü duyarlılığı ve ayrılık kaygısı, davranış problemlerinin büyük bir kısmından sorumludur. Bu sorunlar ayrılık kaygısı, gürültü fobileri ve korkuya bağlı saldırganlığı içerir [1].

2.4.2. Epidemiyoloji

Agorafobi, kaçışın zor olabileceği veya işler ters giderse yardımın sağlanamayacağı durumlarda bulunma korkusudur. Agorafobili veya agorafobisiz panik bozukluğu, yaygın anksiyete bozukluğu, sosyal anksiyete bozukluğu, spesifik fobiler ve ayrılık anksiyetesi bozukluğu dahil olmak üzere anksiyete bozuklukları, en yaygın zihinsel bozukluklardır ve muazzam sağlık bakım maliyetleri ve yüksek hastalık yükü ile ilişkilidir. Geniş anket çalışmalarına göre, nüfusun %33,7'si yaşamları boyunca bir kaygı bozukluğundan etkilenmektedir. Bu bozuklukların önemli ölçüde yeterince tanınmadığı ve yetersiz tedavi edildiği gösterilmiştir. Anksiyete bozuklukları kronik bir seyir izler; ancak ileri yaşla birlikte yaygınlık oranlarında doğal bir azalma vardır. Farklı türlerdeki anksiyete bozuklukları kendi aralarında ve diğer ruhsal bozukluklarla yüksek oranda komorbiditedir [50].



Şekil 2-7 Mental ve madde kullanım bozukluğu prevalansı [51]

Şekil 2-7’de 2019 yılına ait olarak belirli bir akıl sağlığı veya madde kullanım bozukluğu olan toplam dünya nüfusun payı gösterilmektedir. Şekildeki rakamlar, tıbbi, epidemiyolojik verilere, anketlere ve meta-regresyon modellemesine dayalı olarak belirlenmiştir [51].

Toplumumuz için: Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından sağlanan istatistiklere göre, anksiyete bozuklukları, dünya genelinde ölümcül olmayan sağlık kayıplarına en büyük altıncı kayıptır ve bu da küresel olarak toplam 24,6 milyon yıl engelli yaşama (YLD) neden

olmaktadır [52]. Anksiyete bozukluklarının ekonomik ve sosyal maliyeti de önemlidir, bu da toplum ve devlet üzerinde büyük bir yük oluşturur [53,28].

İnsanlarla benzer şekilde son yıllarda, veteriner hekimlerin hayvanları davranış problemleri nedeniyle görmeleri giderek daha yaygınlaşmakta ve davranış tıbbı çalışmalarındaki yoğunluk hızla artmaktadır. Davranış sorunlarının türleri ve ciddiyet dereceleri büyük ölçüde değişim göstermektedir [2]. Saldırgan davranış ve/veya korkunun (agonistik davranış) köpeklerin en sık görülen davranış sorunları olduğu bildirilmiştir. Saldırganlık en yaygın başvuru şikayeti olmakla birlikte [56] potansiyel olarak evcil hayvan sahibi ve küçük hayvan pratisyenlerinin karşılaştığı en ciddi davranış sorunudur [57].

Bir cinste davranışsal problemin göreceli insidansı bölgeye göre değişebilmek ile birlikte Bursa, Türkiye bölgesinde gerçekleştirilen çalışmada en sık görülen davranış sorunlarının saldırganlık, ayrılık kaygısı ve fobi olduğu yönündeki bulgular desteklenmiştir [58].

Sonuç olarak köpeklerde davranış sorunlarının yaygın olduğu ve davranış sorunlarının ilk sırasını saldırganlığın aldığı, bunu ayrılık kaygısı, fobi ve kuyruk kovalamanın takip ettiği tespit edildi. Türkiye'de köpeklerde davranış sorunlarına yaklaşım yeni bir konudur ve bu çalışma ileride yapılacak çalışmalara ışık tutacaktır [59].

2.4.3. Etiyoloji

Günümüzde biyopsikososyal faktörlerin anksiyete bozukluklarındaki öneminin öncelikli olarak kabul edilmesiyle birlikte, anksiyete durumu aynı zamanda çok sayıda etiyolojik faktör ile ilişkilidir. Anksiyete bozuklukları aile içerisinde görülme eğilimindedir. Aile ve ikiz kardeş çalışmaları bu konuda kanıtlar sunmaktadır [8,9]. Genetik faktörler beyin gelişimini (nörotrofik faktörler) etkileyebilir ve nörotransmisyonu değiştirebilir. Genetik araştırmalar, hedef reseptörler, reseptör alt birimleri ve nörotransmitterler için genlere odaklanmıştır [9]. Anksiyete bozukluklarında genetik faktörlerin orta düzeyde genetik etkiye sahip olduğu düşünülmektedir [8].

Serotonerjik sistem, GABAA-benzodiazepin reseptör sistemi ve noradrenerjik sistem gibi nörotransmitter reseptör sistemlerin anksiyete bozuklukları ile ilişkili olduğu da öne sürülmüştür [9]. Ayrıca dopamin (DA), glutamat, ve bazı nöropeptid anormalliklerinin anksiyete ile ilişkili olabileceği gösterilmiştir [8,9].

Anksiyete bozukluklarının (nevroz) ilk açıklamaları psikodinamik teorilerle ilgilenmiştir. Psikodinamik kurama göre kaygı, bilinçdışı çatışmalar (özellikle cinsel ve saldırganlık) sonucunda ortaya çıkar. Freud'a göre (yapısal teoride), kaygı egoda yaşanır ve egoyu içsel tehditlere karşı uyaran bir sinyal olarak işlev görür. Dolayısıyla libidinal enerji anksiyetenin fizyolojik belirtilerinden somatik belirtilerine dönüşmektedir [8,9]. Bu açıdan bakıldığında, savunma mekanizmalarının aşırı kullanılması durumunda anksiyete ve anksiyete bozuklukları ortaya çıkmaktadır. Freud'dan sonra Melanie Klein, Joachim Flescher gibi psikanalitik teorisyenler, kaygı ve kaygı bozukluklarının anlaşılmasına önemli katkılarda bulunmuşlardır. Psikanalitik teori, anksiyete bozuklukları olan hastaların anlaşılmasına ve tedavisine bir yere kadar yardımcı olmaktadır [8].

Biliş bilginin nasıl yorumlandığı, saklandığı ve geri çağrıldığı ile ilgilidir. Anksiyete bozukluklarının etiolojisinde ve anksiyete yaşantılarının yorumlanmasında bilişsel faktörler önemlidir. Panik bozukluğu, bilişsel faktörlerin rolüne iyi bir örnektir: 'iyi huylu bedensel duyumlar, yaşamı tehdit eden bir hastalığın kanıtı olarak feci şekilde yanlış yorumlanır ve kaygıya, daha fazla bedensel duyumlara ve daha yıkıcı bilişlere yol açar'. Nörobilişsel modeller, amigdala-prefrontal devrenin tehdide karşı seçici dikkat, koşullu korkunun kazanılması ve yok edilmesi, belirsiz duygusal uyaranların olumsuz bir şekilde yorumlanması gibi duygusal bilgilerin işlenmesinde önemlidir [9].

Kaygı bozuklukları için sosyal faktörler arasında sosyal izolasyon, destek eksikliği, işsizlik, yoksulluk, önemli olumsuz yaşam olayları, çocuklukta istismar ve ihmalin olduğu söylenebilir [9].

Köpeklerde de faktörler paralellik göstermektedir. Bir köpekte kaygının en yaygın nedenleri terk edilme, evde yalnız kalma korkusu, yüksek sesler, seyahat etme ve/veya yabancı insanlar, çocuklar veya diğer evcil hayvanların yanında bulunmalarıdır. Ayrıca istismara uğramış veya ihmal edilmiş köpeklerde de kaygı görülmektedir. Köpeklerde tedavinin en iyi yolu, kaygının sebebini belirlemektir. Anksiyete genellikle belirgindir ve kolayca tanımlanabilir. Nedeni tam olarak belirlendikten sonra tedavi yönetimine geçilmektedir.

2.4.4. Tanı

Anksiyete bozuklukları en yaygın ruh sağlığı durumlarındanıdır. Şizofreni, depresyon ve bipolar bozukluktan daha az hissedilir olmalarına rağmen, aynı derecede engelleyici olabilirler. Anksiyete bozukluklarının tanıları sürekli revize edilmektedir. Zihinsel hastalıklara

tanı koymak için standart ölçütlere kaynak olan mental bozuklukların tanısı ve sayımsal el kitabı IV (DSM-5), Amerikan Psikiyatri Birliği tarafından yayınlanmakta ve bu konuda dünyada kabul görmektedir. Klinik tedavi ve araştırmalarda tanıya yönelik hem boyutsal hem de yapısal metodlar kullanılmış ve DSM-5'teki yeni sınıflandırma için iki yöntem önerilmiştir. Ancak, bu yaklaşımların her birinin sınırlamaları vardır. Günümüzde tanıdaki vurguda, nörogörüntüleme ve genetik araştırmalara odaklanılmıştır. Bu yaklaşım kısmen biyoloji, stres ve genetiğin kaygı semptomlarını şekillendirmek için nasıl etkileşime girdiğine dair daha kapsamlı bir anlayışa duyulan ihtiyaçtan kaynaklanmaktadır [10].

Köpeklerde anksiyete tanısı genellikle sahibi tarafından bildirilen davranış öyküsüne dayanarak ve diğer olası tıbbi ve davranışsal sorunların ekarte edilerek konmasına rağmen, kesin bir tanı yöntemi oluşturulmamıştır. Klinik belirtiler spesifik değilse veya sahibi tarafından bildirilmediyse, bazı vakaların teşhis edilmeden kalması mümkündür. Bu nedenle, köpeklerde kaygı durumu için klinik olarak uygulanabilir ve objektif bir tanı yönteminin bulunmasına ihtiyaç duyulmaktadır.

2.4.5. Tedavi

Anksiyete bozukluklarının psikofarmakolojik ve bilişsel-davranışçı (psikoterapi) müdahalelerle etkili bir şekilde tedavi edilmesi mümkündür. Tedavi ile ilgili kararlar, bozukluğun şiddeti, bilgilendirilmiş hastanın tercihi, tedavi etkisinin beklenen gecikmesi ve kalıcılığı, beklenen yan etkiler ve söz konusu tedavinin kullanılabilirliği ışığında verilmelidir. Bir tedavi şekli etkisiz kalırsa, diğeri (veya her ikisinin bir kombinasyonu) denenmelidir. Yalnızca belirli fobiler için çok sağlam kanıtlar vardır ve bu nedenle tek başına psikoterapi için çok güçlü bir öneri vardır; Spesifik fobilerin tedavisinde ilaçlar endike değildir [63].

Bu müdahalelerin farklı semptom hedefleri vardır; bu nedenle, gelecekteki sonuçları iyileştirmek için bu stratejilerin mantıksal kombinasyonlarının daha fazla araştırılması gerekir. Anksiyete yönetimi ve tedaviye dirençli vakalar için alternatif stratejiler alanında yeni gelişmeler yaşanmaktadır. Ek tedavi iyileştirmeleri, birinci basamakta kolayca kullanılabilen ve anksiyetesi olan hastalarda işlevsel bozulmayı yönetmeye daha fazla odaklanan algoritmaların geliştirilmesini içermelidir.

Tüm anksiyete bozukluğu türleri için bilişsel davranışçı terapi, en güçlü kanıtın bulunduğu ve en üst düzeyde tavsiye alan psikoterapi türüdür. İlk randomize kontrollü çalışmalar, örneğin sosyal fobide psikodinamik terapilerin klinik etkinliğini doğrulamıştır [68]. Bilişsel davranışçı terapinin özellikleri, tedavi edilen belirli anksiyete bozukluğuna bağlı

olarak değişir; ortak unsur, hastanın durumsal olarak tetiklenen anksiyetesinin temelsiz olduğu ve durumun aslında zararsız olduğu deneyimini yaşaması gerektiğidir. Bu, en iyi şekilde, bir terapistin gözetimi altında maruz bırakma yoluyla elde edilir; bu süreçte, hastanın anksiyete tepkisini alışkanlık haline getirmesi gerekir, böylece bunun altında yatan merkezi korku çürütölür. Günümüzde ise modern yöntemlerden olan sanal gerçeklikte maruz kalma artık giderek artan bir şekilde bilişsel-davranışçı terapötik müdahalelerin bir parçası haline gelmektedir [64].

Klinik pratikte sık sorulan bir soru, anksiyetenin nüksetmesini önlemek için ilaç tedavisine ne kadar yönelmek gerektiğidir. Yanıt oranları genellikle yüksektir (yaklaşık %80), ancak ilacın çok erken kesilmesi ihmal edilemeyen nüks oranları ile ilişkilidir. Örneğin panik bozukluğu olan hastalarda, trisiklik antidepressanlar, Selektif Serotonin Gerilim İnhibitörü (SSRI) veya venlafaksin kesilmesinden sonraki 6-12 ay içinde %15-50'sinde bir nüks görülür. Bu nedenle, SSRI veya Serotonin-Noradrenalin Gerilim İnhibitörleri (SNRI) ile idame tedavisine, ulaşılan etkili son dozda, akut fazın bitiminden sonra en az 6-12 ay devam edilmesi önerilir.

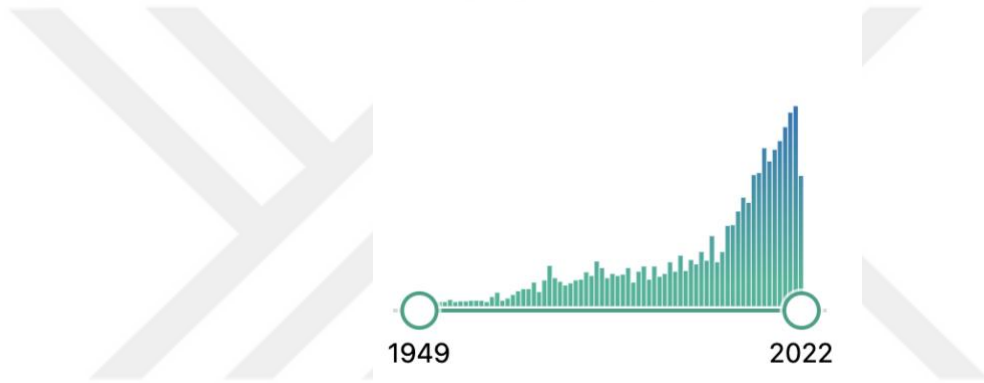
Bilişsel davranışçı terapi ve psikofarmakoterapi, anksiyete bozuklukları için birinci basamak tedaviler olarak kabul edilirken, son yıllarda rutin klinik uygulamada aşağıdakiler gibi daha ileri tedavi stratejileri araştırılmış ve uygulanmıştır [63]:

- Üstbilişsel terapi
- Kabul ve kararlılık terapisi (ACT)
- Farkındalık temelli teknikler
- Tekrarlayan transkraniyal manyetik stimölasyon (rTMS) veya transkraniyal doğru akım stimölasyonu (tDCS) gibi noninvaziv stimölasyon teknikleri
- Fiziksel aktivite ve egzersiz

2.5. EEG ve Anksiyete

Oldukça yüksek prevalansa sahip olup önemli kişisel, sosyal ve ekonomik yüke neden olan anksiyete bozuklukları ile ilgili klinik çalışmalardaki pratik yöntemlerin gerekliliği her geçen gün artmaktadır.

Değişen dikkat kontrolünün anksiyete bozuklukları ile ilişkisi bulunduğu ve beyin aktivitesindeki elektroensefalogram (EEG) ile kaydedilebilen spesifik değişikliklerle korelasyona sahip olduğu geçmiş çalışmalarda tespit edilmiştir [12]. EEG, insan beyninin elektriksel aktiviteleri tarafından üretilen elektrofizyolojik kayıtlardır. EEG tabanlı biyolojik özellik analizi konusunda alzheimer hastalığı tanıma [67], epileptik nöbet tespiti [68] ve parkinson hastalığı analizi gibi birçok çalışma yapılmıştır [69]. EEG verileri beyin aktivitelerinin kaygı ile ilişkisinin değerlendirilmesinde de önemlidir [14]. Bu nedenle EEG, anksiyete bozukluklarının biyolojik özelliklerini incelemek için olası bir ortamdır. Şekil 2-8'de Pubmed veritabanı üzerindeki tarama sonucu, EEG ve anksiyete çalışmalarının birlikte yürütüldüğü literatür içeriğine ait eğilim görülmektedir.



Şekil 2-8 EEG ve anksiyete çalışmalarının birlikte yürütüldüğü literatür eğilimi

Belirli psikoloji, sinirbilim veya sinyal işleme teorilerinin rehberliğinde uzamsal, zamansal veya frekans alanında EEG özellikleri çıkarılması aracılığıyla anksiyete gibi vakalar üzerinden klinik çalışmalar artarak tercih edilmektedir. Bu yöntemler ile birlikte modern makine öğrenmesi gibi çalışmalar aracılığıyla da veri analizi gerçekleştirilmesiyle umut verici sonuçlar elde edilmektedir [71,72].

13-21 Hz'de (düşük beta) normal, orta derecede aktif, sağlıklı bir salınım ağı ile ilişkilendirilirken, stresli bir duruma karşı; yüksek beta (22-30 Hz) yetersiz dikkat; kaygıyla ilgili; ve enerji tüketen durum ile ilişkilendirilmiştir [15].

Modern bir yöntem olan sanal egzersiz terapisi, stresi azaltmak için yaygın anksiyete bozukluğu (YAB) olan hastaları aerobik egzersiz yapmaya teşvik etmek için yararlı bir yöntem olarak kabul edilmektedir. YAB'li yetmiş yedi katılımcının dahil edildiği çalışmada rastgele bir sanal doğa ve sanal bir soyut resim grubu oluşturuldu. Elektroensefalogram alfa

aktiviteleri, algılanan stres ve onarıcı kalite ve memnuniyet seviyeleri, başlangıçta ve 20 dakikalık orta yoğunlukta aerobik egzersizden oluşan akut bir nöbetten sonra değerlendirildi. Sonuçlar, hem sanal doğa hem de resim gruplarının, egzersiz öncesi ile karşılaştırıldığında egzersiz sonrasında önemli ölçüde daha yüksek alfa aktivitesi görüldüğü tespit edildi. Sanal soyut resim grubuna göre sanal doğa grubu, daha yüksek düzeyde stres giderme, onarıcı kalite ve kişisel memnuniyet sergiledi [16].

Bir diğer çalışma, sınav öncesi ve sınav sonrası olmak üzere iki deneysel koşulla sınav süresi boyunca öğrenciler arasındaki stresi analiz etmiştir. Çalışmada, sınavdan önce öğrencilerde teta enerji bandının yüksek olduğu sonucuna varılmıştır; bu, öğrencilerin sınav sonrası ile karşılaştırıldığında oldukça stresli olduklarını ve daha yüksek bilişsel aktiviteye sahip olduklarını göstermektedir. Cinsiyet karşılaştırmalarında, kalp atış hızı indeksi daha düşük ve muayene sonrası nöral aktivite oranı daha yüksek olan erkek öğrencilerin, kız öğrencilere göre daha rahat ve zihinsel göreve daha güçlü katıldıkları görülmektedir [17].

Bir diğer referans çalışmada spesifik olarak, denekler arası delta-beta genlik korelasyonunun hipotetik olarak bazı anksiyojenik koşullarda arttığı bulunmuştur. Dinlenme anksiyetesinde denekler arası delta-beta arasında anlamlı bir pozitif korelasyon gözlenmiş ve bu ilişkinin gevşeme grubunda gözlenenden anlamlı derecede yüksek olduğu tespit edilmiştir. Anksiyete grubunda, ancak gevşeme halinde, düşük delta aktivitesi için bir delta-beta eşleşmesi gözlemlenmiştir [18].

Panik Bozukluğu (PB) hasta grubu ve sağlıklı kontroller arasında, oddball görevi süresince frontal korteks altındaki EEG alfa dinamiklerinin tepki süresi farklılıkları araştırılmıştır. Araştırmadaki bulgular, PB hastalarının sağlıklı kontrollerden daha düşük bir EEG alfa gücü sunduğunu ve anksiyeteyi tetikleyen uyarının anksiyojenik durum tarafından kortikal salınımlar üzerindeki etkisini doğrulamaktadır [77].

Anksiyete ve depresyonun psikometrik ölçümleri ile dinlenme durumunda ve deneysel ortamlarda kaydedilen bireysel olarak ayarlanmış EEG spektral güç ölçümleri arasındaki ilişkilerin araştırıldığı çalışma 18-25 yaş arası 30 erkek üzerinde yürütülmüştür. Kaygı puanları, kortikal bölgeden bağımsız olmak üzere, alfa ile pozitif, delta nispi gücü ile negatif ilişkili olarak tespit edilmiştir [78].

26 kişilik yetişkin deney grubu ve 24 kişilik kontrol grubu ile masaj terapisinin kaygıyı azaltması, EEG uyanıklık modeli ve matematik hesaplamalarını geliştirmesi üzerine yapılan araştırmada, frontal delta gücü artması, gevşeme ile ilişkilendirilmiştir. Frontal alfa ve

beta gücünde azalma ise artmış uyanıklık ve bilişsel performans şeklinde yorumlanmıştır. Ayrıca tükürük kortizol seviyelerindeki düşüş te rahatlama ile ilişkilendirilmiştir [79].

Beyin aktivitesinin araştırılmasına yönelik elektroensefalografi (EEG) evcil köpekler üzerinde de anksiyete ve nörolojik hastalıkların değerlendirilmesinde etkin bir yöntemdir [80]. Köpeklerde antioksidan takviyeli gıda tüketiminin yaşa bağlı nöron kaybını azaltacağı, antioksidanca zenginleştirilmiş gıda tüketen köpeklerin, kontrollere kıyasla daha fazla nörona (~%18) sahip oldukları belirlenmiştir. Bu sonuçlar, anksiyete ile de ilişkilendirilebilecek Hipokampus ve Entorinal korteksteki nöron kaybının gıdasal zenginleştirme ile azaltılabileceğini ve değişimin EEG yönteminden yararlanılarak takibinin yapılabileceğini düşündürmektedir [19]. Merkezi sinir sistemi sağlığının incelenmesine yönelik çalışmada, beyin aktivitesi ile ilişkili olarak ölçülen köpek EEG'sinin yararlılığı belirtilmiştir [20].

EEG, sedasyon veya anestezinin değerlendirilmesinde de etkili bir yöntemdir. Akupunkturun sedatif etkisi elektroensefalografik spektral yoğunluk frekansı ile incelenmiştir. Çalışmada kullanılan EEG yöntemi ve akupunktur uygulamasının sedasyonun indüklenmesi ve gözlemlenmesi için değerli yöntemler olacağı sonucuna varılmıştır [83].

Bununla birlikte, uyku ile bilişsel performans iyileşmesinin araştırıldığı çalışmada başarılı bir tespit yöntemi olan performans verileri ile EEG spektrum gücü arasında bir korelasyon olduğuna dair kanıtlar bulunmuştur [84]. Farklı yöntemlerle indüklenen hipnozun, EEG sayesinde beyin aktivitesindeki etkileri gözlemlenmiştir. Güç spektrumu analizinin yanı sıra kayıtların görsel incelenmesi ile hayvanlarda farklı yöntemler ile indüklenen hipnozdan yönteme özel dalgalar ortaya çıkmış ve bunların aktivitesi izlenerek farklı uygulamalara yönelik pratik ancak önemli çıkarımlar sağlanmıştır [85].

İki farklı bileşiğin EEG üzerindeki etkisini karakterize etmek, sedasyon seviyelerini değerlendirmek için kantitatif EEG kullanımını değerlendirmek ve bileşiklerin konsantrasyonu ile kantitatif EEG arasındaki ilişkiyi keşfetmek için tasarım yapılmıştır. EEG analizlerinin her ikisi de konsantrasyon ile önemli ölçüde ilişkilendirilmiştir. Ek olarak, kantitatif EEG analizinin, sedasyon derinliğini değerlendirmede ve ilgili daha ileri çalışmalarda yararlı olabileceği sonucuna varılmıştır [86].

İlgili referans çalışmada, davranışsal, duygusal, fiziksel ve sosyal ihtiyaçları evde arkadaş olarak veya insanlarla günlük yakın temas halinde kolayca karşılayabilen evcilleştirilmiş hayvanların, diğer bir deyişle refakatçi hayvan olarak tanımladığımız hayvanların nörolojik çalışmalara başarılı şekilde dahil edilmesi üzerinde durulmuştur [87].

Beyini hedef alan bitkisel özler, farmakoloji için sürekli bir araştırma konusu olmaya devam etmektedir. Genellikle, potansiyel bir klinik kullanım bulmak için bir dizi farklı hayvan testinin gerçekleştirilmesi gerekmektedir. Muhtemel aktif içerik maddelerinin çokluğu nedeniyle biyokimyasal yaklaşımlar zordur. Sentetik ilaçları karakterize etmek için nörofizyolojik bir teknik kullanılarak daha bütünsel bir yaklaşım geliştirilmiştir. Dört yarı mikroeletrodun frontal korteks, hipokampus, striatum ve farelerin retiküler formasyonuna stereotaktik implantasyonu, madde alımından önce ve sonra alan potansiyellerinin (EEG) sürekli izlenmesi sağlanmıştır. Beynin EEG frekans modelinin kantitatif analizi, ilaç etkilerinin bilinen klinik endikasyonlarına göre ayırt edilmesinde başarılı olmuştur [88]. EEG dalgalarının anksiyete ve depresyon ile ilişkisinin araştırıldığı diğer çalışmada, katılımcıları hem negatif duygudurum hem de alfa EEG bandında kategorize ederek klinik olmayan depresyon/anksiyete ile lateralize frontal/parietotemporal aktivite arasındaki ilişkileri başarılı şekilde incelenmiş ve sonuca ulaşılmıştır [89].

2.6. Nörotransmitter ve Hormonlar ile Anksiyete İlişkisi

Korkunun temel hayatta kalma mekanizması ters gittiğinde, sonuç genellikle bir kaygı bozukluğudur. Hayvanlarda ve insanlarda korku sisteminin aktivasyonu ve modülasyonu bu nedenle aktif bir araştırma konusu olmuştur. Nörogörüntüleme çalışmaları, anksiyete ile ilgili fenomenler sırasında beynin hangi alanlarının aktive edildiğini özetlemeye çalışmaktadır. Duyguları işlemesiyle bilinen amigdala, sözde korku devresi için merkezi geçiş noktası olarak kabul edilmiştir. Nörotransmitterler, bu korku süreci boyunca iletişime ve kontrole yardımcı olur. Anatomik aktivasyon ve/veya nörotransmitter eylem/duyarlılığındaki varyasyonlar, farklı tipteki anksiyete bozukluklarından sorumlu olabilir ve bu varyasyonlar kısmen genetik fenotiplerden ve/veya travmadan kaynaklanan nöroendokrin stresörlerden kaynaklanabilir [11].

Birçok türde nörotransmitter (serotonin (5-HT), dopamin (DA) ve gama-aminobütirik asit (GABA) gibi) nöronların davranışları yönetmesi ve eylemleri için önemlidir [91]. GABAerjik sistem, serotonerjik, dopaminerjik ve noradrenerjik sistemler çeşitli hayvan modellerinde ve insanlarda anksiyete ve stres gelişiminde rol oynar [21]. Beyinde 5-HT sisteminin duygudurum ve kaygının düzenlenmesinde rol oynadığı tespit edilmiştir [22]. Dopamin, omurgalılarda motor programlama, motivasyonel davranışlar, öğrenme ve hafızadan sorumlu nörotransmitterdir [94].

Beyindeki gizli nörotransmitter sistemlerinin keşifleri, daha keskin bir teorik ve pratik odak ile farmakoloji araştırmalarına izin verir. Çeşitli araştırmalar, stresin etkilerinin, nörotransmitter sistemlerindeki global değişikliklerden ziyade lokalize olanlarla daha iyi ilişkili olabileceğini göstermektedir. Ayrıca ilaçların aynı nörotransmitteri beynin çeşitli bölgelerinde farklı şekilde etkilediği de gösterilmiştir.

Aynı sinir hücresi içinde iki veya daha fazla nörotransmitterin bir arada varolduğuna ilişkin son zamanlardaki gösterimler, bu tür kombinasyonların belirli bir alan içindeki bir nörotransmitterin işlevini modüle edebileceğini düşündürmektedir. Bu nedenle ilaçların anksiyolitik etkilerinin, yine diğer verici sistemlerin belirli işlevsel birimleriyle etkileşime giren, beynin belirli alanlarındaki değişikliklerle ilgili olması mümkündür. Bununla birlikte, anksiyeteyi etkileyen ilaçlar, anksiyetenin patogeneğinde rol oynayanlardan uzak bölgelerde çalışabilir ve nörotransmitterlerdeki veya tezahürlerinden birincil olarak sorumlu beyin bölgelerindeki değişiklikleri göstermeyebilir [157].

Majör depresif bozukluk ve anksiyete bozukluklarının biyolojik etiyojisi, nörotransmitter eksikliği ve nörotransmitter reseptörlerinin anormal işlevi ile yakından ilişkilidir. Genel olarak, nörotransmitter sistemi karşılıklı olarak etkileşir ve her biri çeşitli insan duygularının düzenlenmesinde rol oynar. Depresyon ve anksiyete, hipokampus, amigdala ve prefrontal korteks dahil olmak üzere beyin bölgelerindeki işlev bozukluğundan veya mono-amin nörotransmitter tarafından modüle edilen nöral sistemlerden doğrudan kaynaklanabilir [158]. Depresif ve anksiyete belirtilerinin bir kısmı belirli bir nörotransmitter sistemi ile ilgili olabilirken, diğer semptomlar çeşitli diğer nörotransmitter sistemleri ile ilgili olabilir [159].

Anksiyete ve depresyonlu hayvanlar için nörokimyasal profil çıkarımların amaçlandığı çalışmada, stresin neden olduğu depresif bozukluk geliştirmeye eğilimli sıçan gruplarında nöroendokrin sistem ve davranışsal tepkilerin ilişkili olduğu sonucuna varılmıştır [169]. İnsanlara yakın benzer özellikleri sebebiyle köpeklere ait farklı gözlem gruplarının biyokimyasal seviyede farklılıklara sahip olup olmadığını belirlemek araştırmalarda başarıyı destekleyicidir [99].

Balıklerde kaygı durumu, endokrin sistem ve merkezi sinir sistemi tarafından düzenlenir. Baş böbreğinin interrenal dokusundan salınan kortizolün ani yükselme seviyeleri, stres faktörlerine yanıt niteliğinde evrimsel olarak korunan faktörlerden biri şeklinde kabul edilmiştir [23].

Sinir sistemi ve nöroendokrin arasındaki etkileşimlerle ilgili temel kavramların gözden geçirildiği referans çalışmada, ilgili spesifik nörokimyasallar ile immün sistem ilişkisinin, sinir sistemi hastalıklarının önlenmesi ve tedavisi için kritik bir bileşen olduğu sonucu çıkarılmıştır [101].

Pek çok araştırma bünyesinde serotonin, dopamin ve kortizol seviye ölçümleri enzim bağlantılı immünosorbent deneyi (ELISA) aracılığıyla pratik şekilde ve yüksek doğruluk oranında elde edilmiştir [167, 168].

2.6.1. Kortizol

Kortizol, glukokortikoid hormon sınıfında bir steroid hormondur. Birçok hayvanda, esas olarak adrenal bezdeki adrenal korteksin zona fasciculata'sı tarafından üretilir [102]. Diğer dokularda daha düşük miktarlarda üretilir. Günlük bir döngü ile salınır ve strese, düşük kan-glikoz konsantrasyonuna yanıt olarak salınımı artar [103]. Glukoneogenez yoluyla kan şekerini artırma, bağışıklık sistemini baskılama ve yağ, protein ve karbonhidrat metabolizmasına yardımcı olma işlevi görür [104].

Strese maruz kalma, adrenal korteks tarafından kortizol salgılanmasına neden olan hipotalamik-hipofiz-adrenal (HPA) eksenini aktive eder. HPA ekseninin hem aşırı hem de yetersiz aktivasyonu, anksiyete bozukluklarının gelişimi ile ilişkilendirilmiştir. Kortizol seviyeleri, hem çocuk hem de ergenler arasında anksiyete bozukluğu ile ilişkilendirilmiştir [105,106].

2.6.2. Dopamin

Temel olarak, nöronlar arasında kimyasal bir haberci görevi gören dopamin, önemli rol oynayan nöromodülatör bir moleküldür. Bilişsel davranış terapisi (CBT) ile tedaviden sonra sosyal anksiyete bozukluğu (SAD) hastalarında azalan anksiyete semptomlarının altında dopamin sistemindeki değişiklikler yatabilmektedir. Çalışma, SAD'de dopamin sisteminin rolünü desteklemekte ve bireyler arası karşılaştırmaların psikiyatrik bozukluklar için beyin biyobelirteçlerini belirlemede umut verici bir yaklaşım olabileceğini göstermektedir [108].

Anksiyete ile ilgili olarak beyin görüntüleme çalışmaları, öncelikle bazal ganglionlara veya striatal patolojiye odaklanmakta ve bu bölgelerde bozulmuş dopaminerjik işleyişin ön kanıtlarını göstermektedir. Bu spesifik beyin bölgelerine olan ilgi, sosyal anksiyete bozukluğunda dopaminerjik eksikliklerin klinik temelli kanıtlarının birikmesini sağlamıştır. Düşük dopamin geri alım bölgesi yoğunluğunun, sosyal anksiyete bozukluğu olan hastaların

striatumundaki genel olarak daha az sayıda dopaminerjik sinaps ve nöronu yansıttığı öne sürülmüştür [109].

Nörogörüntüleme tekniklerindeki ilerlemeler, belirli beyin yapılarının, reseptör yoğunluğunun ve beyin reseptör ligandlarının derinlemesine araştırılmasına izin vererek, SAD'nin fizyopatolojisi hakkında önemli bilgiler sağlamaktadır. Bu alanda, SAD'nin dopaminerjik disfonksiyon ile ilişkili olduğu hipotezi özellikle araştırılmış ve bunu destekleyen olumlu bulgular elde edilmiştir [110].

Amigdala, hipokampus ve frontal korteks dahil olmak üzere kaygının modülasyonu ve ekspresyonunda farklı beyin bölgelerinin dahil olduğu belirtilmiştir. Nörotransmitterlerin ve reseptörlerinin işlev bozukluğu, anksiyete gibi birçok ruh hali bozukluğuna yol açmaktadır. Dopaminin beynin farklı bölümlerinde kaygı modülasyonunda önemli bir rol oynadığına dair bazı kanıtlar, mezolimbik, mezokortikal ve nigrostriatal dopaminerjik sistemin kaygıya dahil olduğunu göstermiştir. Hem dopamin D1 hem de D2 reseptör mekanizmalarının, kaygıya aracılık etmede önemli olduğu anlaşılmaktadır [111].

Dopaminin normal ve patolojik anksiyete durumlarındaki rolü karmaşıktır ve dopaminerjik yollar anksiyete durumlarını çeşitli şekillerde etkileyebilir. Antipsikotik ilaçların karakteristik mekanizması olan dopamin D2 blokajının da anksiyolitik olduğu iyi bilinmektedir [112]. Bu ilaç sınıfı, anksiyete tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Bununla birlikte, bir katekolamin olarak dopamin, kaygı durumlarında norepinefrin ile yukarı regüle edilirken, dopaminerjik sinyalleşmedeki artışların da öz-yeterlik ve güven duygularına aracılık ettiği görülmekte ve bu da kaygıyı azaltmak için hareket edebilmektedir [113,114].

2.6.3. Serotonin

Serotonin (5-hidroksitriptamin (5-HT)), duyguların düzenlenmesinde önemli bir rolü olan nörotransmitterdir. Serotonin uyku, iştah ve ruh hali gibi birçok fizyolojik süreci düzenler. Bu nedenle serotonerjik sistem, majör depresyon ve anksiyete gibi psikiyatrik bozuklukların tedavisinde önemli bir hedeftir. Bu doğal nörotransmitter, çeşitli farmakolojik etkilere neden olan 7 reseptör ailesi (5-HT1-7) ile etkileşime girer. Genetiği değiştirilmiş hayvanlar ve seçici veya tercihlili agonistler ve antagonistler kullanılarak yapılan çok sayıda çalışma, hemen hemen tüm serotonin reseptör alt tiplerinin antidepresan veya anksiyolitik benzeri etkilere dahil olduğu görülmüştür [115,116].

Bu biyolojik sistemlerdeki anormallikler, panik atak ve travma sonrası stres bozuklukları gibi yanlış düzenlenmiş korku ve kaygı davranışlarına yol açar. Bu davranışlar genellikle sinapslarda serotonin seviyelerinin arttırılmasıyla tedavi edilir, bu da hem korku hem de kaygıyı iyileştirmede serotonin sinyallemesinin bir rolü olduğunu düşündürür [117].

Son araştırmalar, serotonerjik fonksiyondaki çeşitli anormalliklerin, depresyon ve anksiyetenin patogeneğinde rol oynadığını ve böylece seçici serotonin geri alım inhibitörleri dahil olmak üzere büyük terapötik potansiyele sahip farmakolojik ajanların gelişimini kolaylaştırdığını belirlemiştir. Bu ajanlar birçok anksiyete durumunun tedavisinde etkili görünmektedir ve belirli duygudurum bozukluklarının tedavisinde diğerlerinden daha fazla etkinliğe sahip olabilmektedir [118].

2.7. Bitkisel İlaçlar ve Anksiyete

Prevalansı ve komorbiditesi çok yaygın olan anksiyete, depresyon ve uykusuzluk gibi psikiyatrik bozukluklar için günümüzde modern ilaç tedavilerinin yanı sıra tek başına bitkisel çözümler de kullanılmaktadır. Birçok hasta, ilaç tedavisine sıklıkla eşlik eden davranışsal ve fiziksel yan etkilerden muzdariptir. İlaçların çeşitli yan etkileri mevcut olduğundan, bitkileri sağlıklarına fayda sağlamak için kullananların sayısı gün geçtikçe artmaktadır. Son on yıldır, bitkisel psikofarmakoloji alanındaki araştırmalar büyük ilgi görmektedir [124].

Birçok hasta, sınırlı etkinlik/yan etkileri olan geleneksel ilaçlara göre semptomları hafifletmek için şifalı bitkileri tercih etme eğilimindedir. Bu gibi sebepler ile bitkisel ilaç kullanımı yaygınlaşmakta ve anksiyete bozukluğu olan kişilerde kullanım %21 gibi yüksek bir orana ulaşmaktadır [125].

Reçeteli ilaçların istenmeyen yan etkilerinin ortaya çıkmasının yanında artan maliyet nedeniyle de hastalar, psikolojik durumların yönetimi ve tedavisi için bitkisel ve diğer doğal ilaçları araştırmaktadır. Bu sebeplerle, etkili doğal anksiyolitik (anti-anksiyete) tedaviler bulma konusunda evrensel bir ilgi olması şaşırtıcı değildir. Mevcut kanıtlara dayanarak, bitkisel takviyenin, kaygı ve kaygı ile ilgili durumları tedavi etmek için etkili bir yöntem olduğu görülmektedir [126].

2.7.1. Hericium Erinaceus

En yaygın olarak aslan yelesi olarak bilinen HE, Geleneksel Çin Tıbbında uzun bir kullanım geçmişi olan yenilebilir bir mantardır. Mantarda, β -glukan polisakaritler dahil olmak

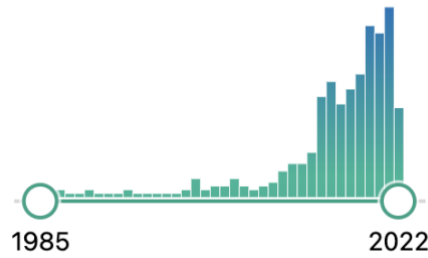
üzere biyoaktif bileşikler bol miktarda bulunur; hericenones, erinasin ve terpenoidler; izoindolinonlar; steroller; ve potansiyel olarak nöroprotektif ve nörorejeneratif özelliklere sahip olan mikobesinler. Anti-inflamatuar özellikleri ve sinir büyüme faktörü, gen ekspresyonunu ve nörit (akson veya dendrit) büyümesini desteklemektedir [127].

Bu nedenle HE mycelium, anksiyolitik etkileri sürdürürken uyku bozukluğunun iyileştirilmesi için çift işlevli bir takviye olabilir. Son in vivo raporlar, erinasin A ile zenginleştirilmiş HE miselyumun, antidepresan benzeri bir etki oluşturmak için BDNF/TrkB/PI3K/Akt/GSK-3 β yollarını modüle edebileceğini göstermiştir. Çok sayıda kanıt, erinasinin kan-beyin bariyerini geçebileceğini ve hem periferik hem de merkezi sinir sistemlerinde nöroprotektif işlevini önerdiğini göstermektedir. Sonuçlar, 150 mg/kg'da HE miselyum ile uygulamanın kemirgen kaygısını iyileştirdiğini ($p < 0.05$) ve karanlık dönemde toplam uyku süresinin (TST) ilişkili olduğu NREM uyku bozukluğunu tersine çevirdiğini göstermiştir. HE mycelium ayrıca anksiyeteyi azaltmada ve uykuyu iyileştirmede ikili potansiyel rollerini göstermiştir [128].

Depresif bozukluk için HE'nin terapötik potansiyeli üzerine yapılan çalışmada HE'nin antioksidatif, antidiyabetik, antikanser, anti-inflamatuar, antimikrobiyal, antihiperglisemik ve hipolipidemik etkiler dahil olmak üzere sağlık açısından çeşitli faydalara sahip olduğu gösterilmiştir. HE'nin misellerinden ve meyve veren gövdesinden ham ve ekstrakte edilen biyoaktif bileşiklerin, sinir büyüme faktörleri gibi hücre proliferasyonu ile ilişkili nörotrofik faktörlerin ekspresyonunu teşvik ettiği bulunmuştur. Bu doğrultuda HE depresyon tedavisi için bir alternatif ilaç potansiyeli taşımaktadır. Klinik öncesi ve klinik çalışmalar, H. erinaceus'un monoaminerjik modülasyon, nörojenik/nörotrofik ve antienflamatuar yollarla depresif bozukluğu önemli ölçüde iyileştirdiğini göstermiştir. Dolayısıyla bu durum, çeşitli firmaların köpeklerde anksiyete giderici amaç ile farklı formlarda, 1000mg/10kg dozunda kullanıma sunmuş oldukları HE'nin potansiyel rolünü göstermektedir [129].

İzole edilen hericenon ve erinacinler, HE'nin beyin fonksiyonları ve otonom sinir sistemi üzerinde bazı etkileri olmasının beklendiği sinir büyüme faktörü (NGF) sentezini uyarmaktadır. Gerçekleştirilen çalışmada otuz kadın rastgele olarak HE grubuna veya plasebo grubuna atanmış ve 4 hafta boyunca HE tozu eklenen kurabiye veya plasebo kurabiyesi tüketmişlerdir. Sonuçlar, HE alımının, depresyon ve anksiyeteyi azaltma olasılığına sahip olduğunu göstermektedir. Çalışma, HE'nin NGF'yi arttıran etkisinden farklı bir mekanizma önermektedir [130].

Sonuçlar birlikte ele alındığında, kronik HE uygulamasının, muhtemelen yetişkin hipokampal nörojenezini artırarak, anksiyolitik ve antidepresan benzeri etkiler oluşturabildiğini göstermektedir [131]. HE kullanmış olan grup ve kontrol grupları arasında idrar tahlili, hematoloji ve serum biyokimya parametrelerinde olumsuz veya istatistiksel anlamlı bir fark bulunmamış, mantıksal bulgu ve histopatolojik farklılıklar görülmemiştir. Bu nedenle, HE'nin yan etkisi gözlenmemiştir [132]. HE, birçok beyin hastalığında iyileştirici etki göstermiştir [133]. Şekil 2-9'da Pubmed veritabanı üzerindeki tarama sonucu, HE konulu çalışmalarının yürütüldüğü literatür içeriğine ait eğilim görülmektedir.



Şekil 2-9 Hericium erinaceus çalışmalarına ait literatür eğilimi

2.7.2. Valeriana Officinalis

Valeriana officinalis (VO) yani kedi otu, modern fitoterapi ve geleneksel tıpta kullanılan en tanınmış antik şifalı bitkilerden biridir. Valerianaceae familyası çok yıllık bir bitkidir ve anksiyete ve stres bozukluklarının tedavisinde en çok kullanılan besin takviyeleri arasındadır. En etkili bitkisel sakinleştiricilerden biri olan kedi otunun kök özü, mide-bağırsak spazmlarının tedavisinde de kullanılmaktadır. Valerenik asit, bitkinin kök ekstraktlarının standardizasyonu için bir işaretleyici bileşiktir ve birçok in vitro/in vivo çalışmada bitkinin anksiyolitik etkisinden sorumlu olduğu rapor edilmiştir. Valerenik asitin yanı sıra izovalerik asit, didrovaltrat, borneol ve bazı lignanların da bitkinin anksiyolitik etkisine katkıda bulunduğu öne sürülmüştür [134,135].

VO'nun köklerinde terpenler, valepotriatlar ve lignanlar dahil olmak üzere çeşitli kimyasal bileşik sınıfları sebebiyle, kedi otunun ekstraktlarındaki yüksek miktarda biyoaktif kimyasal bileşen, uyku bozuklukları, kardiyovasküler hastalıklar, anksiyete ve depresyon gibi farklı patolojik durumlarda potansiyel tıbbi uygulamalar sağlar. Kedi otu özütünün en yaygın

tıbbi kullanımı, uykusuzluğun tedavisi ve uyku kalitesinin iyileştirilmesi içindir. Ekstraktın hafif yatıştırıcı etkilerinin yanı sıra herhangi bir önemli yan etkisinin olmaması, kedi otunu genellikle istenmeyen yan etkilerle ilişkilendirilen sentetik yatıştırıcı ilaçlara popüler bir alternatif haline getirir [136].

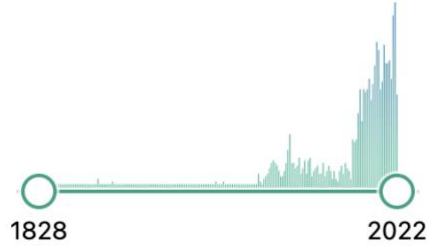
VO'nun yakın zamana kadar, etki mekanizması bilinmemektedir. Nörobiyolojik araştırmalar, aktif valerenik asidi ile bitkinin, benzodiazepin ilaçlarına benzer bir etki mekanizması olan GABAA-ergic sistemi ile etkileşime girdiğini göstermektedir [137]. Çalışmalar kedi otu özütü veya valerenik aside maruz kalan deneklerin kontrol grubuyla karşılaştırıldığında endişeli davranışlarında önemli bir azalma olduğunu göstermiştir. Sıçanlar ile yapılan yükseltilmiş artı labirent testlerinde sonuçlar kedi otunu, geleneksel anksiyolitiklere potansiyel bir alternatif olarak desteklemektedir [138].

VO konulu çalışmalar geleneksel anksiyolitiklere potansiyel bir alternatif olarak uykusuzluk ve anksiyete tedavisinde en sık kullanılan bitkisel ilaçlardan biri olan kedi otunu desteklemektedir [139]. Farklı çalışmalar, Kedi otunun ham hali ve ekstraktının anksiyolitik aktivitesinin daha çok valerenik asit ile ilişkili olduğunu savunmaktadır, bu sebeple biyoaktif madde analizi önemlidir [140].

Farelerin kaygıyla ilgili davranışlarının incelendiği çalışmada, kediotu ekstraktının farelerde anksiyete ile ilgili davranışların azaltılması üzerinde merkezi adrenerjik mekanizmalar aracılığıyla etkisi tespit edilmiştir [141].

Anksiyete ve strese bağlı bozukluklar, ortak olarak önemli beyin devrelerinde aşırı veya uygunsuz uyarılabilirliğe sahip bir grup hastalıktır. Birkaç nörotransmitter (serotonin ve norepinefrin ve GABA) ve nöropeptitler [adrenokortikotropik hormon (ACTH), kortikotropik salgılatıcı hormon (CRH), nöropeptid-Y (NPY) ve kolesistokinin (CCK) anksiyetenin patogeneğinde yer almıştır. Bununla birlikte, insanlarda strese bağlı bozuklukların ve kaygının biyolojik mekanizmaları son derece karmaşıktır ve iyi anlaşılmamıştır [135].

Kediotu ve valerenik asidin zebra balığında da anksiyolitik özelliklere sahip olduğunu görülmüştür. Önceki araştırmalar, VO'nun GABA reseptörleri ile etkileşime girdiğini ve modüle ettiğini, 5-HT(5a) reseptörünün kısmi bir agonisti olduğunu ve adenosin reseptörlerinin aktivasyonuna aracılık ettiğini ortaya koymaktadır ancak kediotu etk mekanizması tam olarak hala bilinmemektedir [135] . Şekil 2-10'da Pubmed veritabanı üzerindeki tarama sonucu, VO konulu çalışmalarının yürütüldüğü literatür içeriğine ait eğilim görülmektedir.



Şekil 2-10 Valeriana officinalis çalışmalarına ait literatür eğilimi

2.8. Toplam Fenolik Madde Miktarı

Fenolik bileşikler, antioksidan aktiviteden sorumlu redoks özelliklerine sahip önemli bitki bileşenleridir. Fenolik ve flavonoid moleküller, hidrojen atomlarını serbest radikallere bağışlama yeteneklerine bağlı olarak serbest radikalleri deaktif etmekten sorumlu olan önemli antioksidan bileşenlerdir. Ayrıca serbest radikal süpürme için ideal yapısal özelliklere sahiptirler. Farklı literatür raporları, toplam fenolik ve flavonoid içeriği ile antioksidan kapasite arasında doğrusal bir korelasyon olduğunu göstermektedir [142,143].

Halk hekimliğinde ve/veya gıda ürünlerinde kullanılmakta olan bitkilerin toplam fenolik ve antioksidan aktivitelerinin araştırılması günümüzde önem taşımaktadır. Bitki ve bunlara ait ekstraktların fenolik bileşenleri ve toplam fenolik miktarlarının UV-Vis Spektroskopisi kullanılarak belirlenmesi mümkündür [144,145].

3. YÖNTEM

3.1. Araştırmanın Yeri, Örneklem Grubu ve Süresi

Çalışma kapsamındaki örneklem grubu üzerindeki muayene ve materyallerin toplanmasına yönelik işlemler, uygun vakaların bulunma durumları kapsamında İstanbul Üniversitesi – Cerrahpaşa, Veteriner Fakültesi İç hastalıklar Ana Bilim Dalı'ndaki Elektroensefalografi Laboratuvarı, çeşitli özel veteriner klinikleri ve hayvan bakım çiftliklerinde gerçekleştirilmiştir. Çalışmaya, kliniğe anksiyete şikayeti ile gelen toplam 16 köpek dahil edilmiştir.

Araştırmamızda birden fazla değişken incelenmektedir, bu sebeple çalışmanın ana amacıyla ilişkili olan değişken için örneklem büyüklüğünün hesaplanması gerçekleştirilmektedir. Güvenilir istatistiksel sonuçları sağlayabilecek en uygun örneklem büyüklüğü hacmimizin hesaplanmasında, çalışma aşaması henüz bitirilmemiş olması sebebiyle referans çalışmalardan yararlanılması gerekmektedir. Bu sebeple örneklemin alınacağı evrende ilgili özelliğin standart sapmasının kestirilmesi, kabul edilebilir hata payının kararlaştırılması, sonucun öngörülen hata aralığı içine düşme olasılığını veren güven düzeyinin seçilmesi gibi amaçlarla referans çalışmalara ait verilerden yararlanılması gerçekleştirilmiştir.

Planladığımız çalışmamıza paralel olarak yürütülmüş olan, köpeklerde sedasyon etkilerin EEG yöntemi ile araştırıldığı referans olarak almış olduğumuz iki adet çalışma mevcuttur. Bunlar 2001 yılında n=12 köpek sayısı ile "Itamoto, K., et al. "Effect of medetomidine on electroencephalography and use of a quantitative electroencephalograph for evaluating sedation levels in dogs." Journal of Veterinary Medicine Series A 48.9 (2001): 525-535." ve 2016 yılında n=8 köpek sayısı ile "Bennett, R. C., et al. "Effects of MK-467 on the antinociceptive and sedative actions and pharmacokinetics of medetomidine in dogs." Journal of veterinary pharmacology and therapeutics 39.4 (2016): 336-343." çalışmalarıdır.

Çalışmalara ait ilgili EEG verileri referans alınarak G*Power 3.1.9.7 yazılımı aracılığıyla, iki bağımlı değer arasındaki ilişkide Student's-t paired testi için örneklem büyüklüğü hesaplanmıştır. Beklenen ortalama değer ve standart sapma, referans çalışmalardan

elde edilmiş ve etki büyüklüğü “0,96” olarak elde edilmiştir. Power (1 - Beta) “0,81” ve alfa değeri 0,05 olarak belirlenmiştir. Böylelikle grup başına n=8 sayısı elde edilmiştir.

Çalışmanın toplam süresi uygun vaka sayısının toplanmasına yönelik zorluklar sebebiyle 15 ay olarak belirlenmiştir.

3.2. Deneysel Dizayn

Çalışmaya ait deneysel dizayn, araştırılacak tıbbi durum ile ilişkili bilimsel soruların sorulması ve hipotezleri oluşturulmasıyla literatürün taranması ile birlikte elde edilen çıktılar sonucunda şekillendirilmiştir. Deneysel dizaynın tasarımı araştırmaya ait amaç, araştırmadan beklenen faydalar, araştırmanın nedeni/önemi ve katkısı konuları dikkate alınmıştır.

Örneklem grubu, araştırmaya ait mekan, araştırma süresi, araştırmış olduğumuz tüketimi gerçekleştirilen bitkisel ekstrakt, araştırma yöntemleri, parametreler, istatistiksel hesaplama yöntemi, araştırmada görevli takım üyeleri ve araştırmaya yönelik karşılaşılması muhtemel zorlukların analizleri deneysel dizaynın oluşturulmasında etkili olmuştur.

Tez kapsamında gerçekleştirilen bu araştırma metodu prospektif kohort olarak gerçekleştirilmiştir. Deneyde yanlılığı önlemek için çalışma gurubunda randomizasyon uygulanmıştır. Vakaların karakteristiği sebebiyle maskeleye yapılmamış, çalışma açık etiket şeklinde yürütülmüştür. Deneysel dizayn, etik değerler dikkate alınarak araştırma odağına yönelik sonucu etkileyebilecek karıştırıcı değişkenlerin (Confounding variable) çalışma açısından bir tehlike yaratmayacakları şekilde dikkate alınmasıyla tasarlanmıştır.

Köpeklerde kapsama kriterleri kapsamında,

- Hasta sahibinin gönüllülüğü
- Sedasyon uygulanmasına karşı fiziksel yeterlilik
- Uygulanan ankette en az 10 puana sahip olmak veya anket kapsamındaki davranışsal sorunlardan en az ikisine sürekli ve genellikle olmak üzere sahip olmak

Dışlanma kriterleri ise,

- Genel muayenede ortaya çıkabilecek deneysel prosedüre sıkıntı çıkarabilecek herhangi bir rahatsızlığa sahip olmak (kalp rahatsızlıkları, ciddi nörolojik sorunlar gibi)

- Deneysel sürecini tamamlamadan ayrılmak istemek veya onam formunun imzalanmaması
- Çalışmaya olumsuz etkisi olabilecek ilaçların halihazırda veya 1 ay öncesine kadar tüketilmiş olması
- Çalışma kapsamındaki bitkisel ekstraktın düzenli tüketilmemesi durumu
- Kontrollere zamanında gelinmemesi

Genel kapsama ölçütlerinin içerisinde ve dışlama ölçütlerince elenmeyen, çalışmaya katılma potansiyeli taşıyan köpeklerin sahipleri çalışma hakkında bilgilendirilerek köpeklerin genel muayenelerinin ardından köpeklerde anksiyete ile ilişkilendirilmiş davranış sorunlarını içeren anket, hastada anksiyete seviyesini tespit etmek amacıyla hasta sahiplerince doldurulmuştur.

Şartları sağlayan köpeklerin sahiplerine onam formu imzalatırılarak çalışmaya başlanılmıştır. İlgili form ekte mevcuttur.

Dahil edilen köpeklerden öncelikle kan alımı yapılmış ve birkaç saat içerisinde kandan serum elde etme işlemi için oda sıcaklığında saklanmıştır. Devamında hastalar sedasyona alınarak, herhangi bir madde tüketimi gerçekleşmeden veteriner hekim tarafından 5 dakikalık ham EEG kayıtları olacak şekilde rutin EEG yöntemi uygulanmıştır. Gerekli beyin bölgeleri ile ilişkili noktalardan sinyal kaydı elde edilmiştir.

Piyasadaki köpeklere yönelik bulunan ürünlere eş değer olarak üretilen bitkisel içerik, bu ürünlerin veteriner hekimlerce hali hazırda önerilmekte olduğu dozajlarda, kliniğe gelen uygun şartları sağlayan, gerekli onam formu hasta sahibi tarafından onaylanmış köpeklerden 8 köpeğe, rutin olarak kullanıldığı gibi 4 hafta boyunca günlük 10 kg ağırlık başına 1000 mg HE, diğer 8 köpeğe ise yine rutin olarak kullanıldığı gibi 4 hafta boyunca günlük 10 kg ağırlık başına 1000 mg Valerian Officinalis kapsül formatında verilmiştir. Çalışma kapsamında tercih edilen dozajların belirlenmesinde, veteriner hekimlerin önerilerinin ve hakemli dergilerde önceki klinik araştırmalara ait referansların yanında Türkiye Cumhuriyeti Tarım ve Orman Bakanlığı, Avrupa İlaç Ajansı (EMA), Amerikan Gıda ve İlaç İdaresi (FDA) kurumlarının standartları dikkate alınmıştır.

Hasta sahibi ekstrakt kullanımı ve çalışma hakkında bilgilendirilerek, hastanın 4 hafta boyunca düzenli olarak belirtilen maddelerin tüketiminin takibini yapabilmesi için, hasta

sahibine bir takvim verilmiştir. Hasta sahiplerinin iletişim bilgileri alınarak toplu olarak form üzerinde arşivlenerek dijital ortama geçirilmiştir. İlgili takvim ve form ektedir. Rutin ilaç kullanımının 2. haftasında herbir hasta sahibi ile iletişime geçilerek düzenli kullanım durumu teyit edilmiştir.

4 haftalık düzenli kullanım sonrası sonucu gözlemek adına yine bir anket uygulaması, kan alımı ve rutin EEG çekimi ilk seferki yöntemler ile standardize şekilde yapılarak çalışma ilgili hayvan için sonlandırılmıştır. Herbir hasta tarafından tamamlanan süreçler sonrası veriler dijital ortama aktarılmıştır. Tüm bu süreçte ait deneysel dizaynın genel akış şeması Şekil 3-1’de görülmektedir.



Şekil 3-1 Deneysel dizayna ait genel akış şeması

3.3. Örneklem Grubuna ait Davranışsal Verilerin Toplanması

Çalışma başlangıcında köpeklerde anksiyete ile ilişkili davranışsal sorunları tespit etmeyi amaçlayan anket formu hasta sahipleri tarafından doldurulmuştur. Anket formu ektedir. Anket formundaki herbir soru 0 ile 3 arasında skor değerine sahiptir. Çalışmaya dahil edilecek hastaların toplam skor değerinin en az 10 olması veya en az 2 adet genellikle veya sürekli değere sahip davranış sorununun olması şartı aranmaktadır.

Anket sonucunda yeterli skora sahip hastalar klinik genel muayenenin ardından diğer dışlama kriterleri ile çakışma yaşamamaları durumunda hasta sahibine onam formu doldurtularak çalışmaya dahil edilmişlerdir. Çalışma başlangıcında ve düzenli ekstrakt kullanımının 4. haftasının sonunda elde edilen anket formu verileri çalışma bulguları olarak değerlendirilerek istatistik çalışmalarına dahil edilmiştir. Bu davranışsal değerlerin tedavi

öncesi ve sonrası olacak şekilde EEG aktivitesi ve nörokimyasal değerler ile ilişkisi araştırılmıştır.

Çalışmanın dahilinde yapılan analizleri güçlendirmek doğrultusunda anket formunda, köpeklerle ilişkin demografik bilgileri belirlemek amacıyla da sorular mevcuttur. Köpeklerde anksiyete olup olmadığını değerlendirmek için kullanılan anket sorularının içeriğinin belirlenmesinde literatür taraması sonucu köpeklerde anksiyete skorlaması gerçekleştirilen geçmiş çalışmalar referans alınmıştır [3-7]. Anksiyeteye yönelik skorlama anketi çalışmamıza yönelik özgün şekilde dizayn edilmiştir.

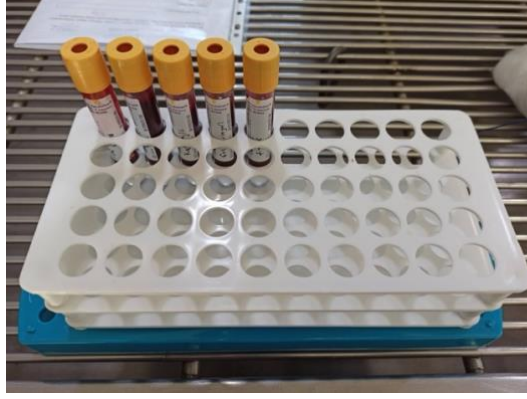
3.4. Kan Örneklerinin Toplanması ve Serum Eldesi

Her köpekten sedasyon uygulaması gerçekleştirilmeden önce çalışma başlangıcı ve 4 haftalık tedavi sonrasında Şekil 3-2'deki gibi vena cephalica antebrachium'dan yaklaşık 7 mL kan örnekleri alınmıştır.



Şekil 3-2 Vena cephalica antebrachium'dan kan alımı

Antikoagülan içermeyen tüp içerisindeki kan, oda sıcaklığında Şekil 3-3'teki düzende 30 dakika bekletilmiştir.



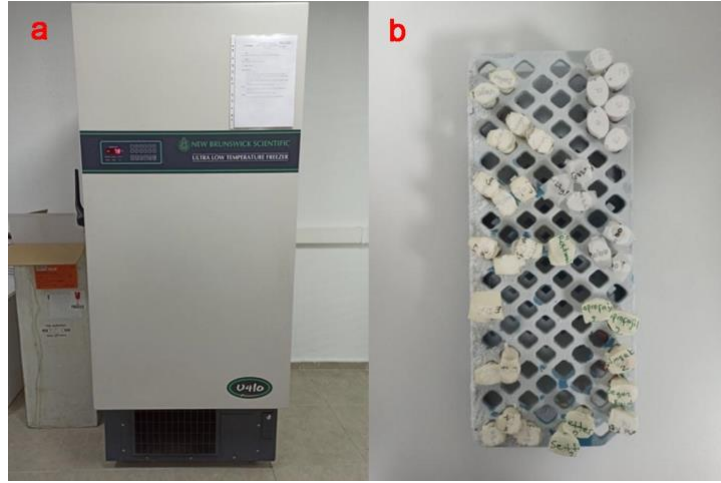
Şekil 3-3 Sarı kapaklı jelli tüplere alınan kan örnekleri

Antikoagülan içermeyen tüp içerisindeki kanlar, Şekil 3-4'te görülen veya eşdeğer santrifüj cihazlarında 10 dakika ve 4000 rpm'de santrifüj edilmiştir.



Şekil 3-4 Santrifüj cihazı

Santrifüj sonucunda elde edilen serumlar ependorflarda toplanarak hasta adı ve sıra ile ilgili numaralandırma yapılarak, ölçüm işlemlerine kadar -80°C 'de derin dondurucuda saklanmıştır. Şekil 3-5 (a)'da çalışma kapsamında kullanılan -80°C dondurucu ve Şekil 3-5 (b)'de -80°C dondurucu içerisindeki koşullardan etkilenmeyecek şekilde etiketlenmiş ependorflar içerisindeki serumların saklanması için düzenlenmiştir.



Şekil 3-5 – 80 °C dondurucu (a), ependorf içerisindeki serumların saklanması (b)

3.5. Kan Serumlarından Serotonin, Kortizol ve Dopamin Ölçülmesi

Ölçüm işlemi öncesi Dopamin, 5-Hydroxytryptamine (Serotonin) ve Kortizol ELISA kitlerine (ELK Biotechnology, Wuhan, China) ait Ön Kaplamalı Mikroplaka, Standartlar, Biotinlenmiş-Konjugat ve Streptavidin-HRP -20°C'de ve diğer tüm reaktifler ürün manuelinde belirtildiği şekilde 4°C'de muhafaza edilmiştir.

Ölçüm ve analiz uygulamaları Molgen firmasına ait laboratuvarında gerçekleştirilmiştir. Öncesinde -80°C'de muhafaza edilen kan serumlarının taşınmasında soğuk zincirin mümkün olduğunca en iyi şekilde korunması amacıyla Şekil 3-6'da görüldüğü gibi ısı yalıtımlı çanta ve buz akülerinden yararlanılarak donmuş serumlar çözünmeden laboratuvara ulaştırılmıştır.



Şekil 3-6 Soğuk zincir taşıma uygulaması

Örneklerin uygun şekilde laboratuvara ulaştırılmasından önce bütün ön hazırlıklar tamamlanmıştır ve zaman kaybedilmeden örneklerin hazırlanması ve analiz prosedürü yapılmıştır.

Gerçekleştirdiğimiz analiz uygulaması, rekabetçi (competitive) inhibisyon enzimi immünolojik tahlili tekniğini kullanır. Bu kitte sağlanan mikrotitre plakası, Dopamin (DA), 5-Hydroxytryptamine (5-HT), Kortizol (Cor) proteini ile önceden kaplanmıştır. Standartlar veya numuneler uygun mikrotitre plaka kuyularına eklenir ve ardından Cortisol(Cor)'a özgü biyotin-konjuge antikor ile eklenir. Daha sonra Horseradish Peroxidase (HRP) ile konjuge Avidin her mikroplaka kuyusuna eklenir ve inkübe edilir. TMB substrat solüsyonu eklendikten sonra. Enzim-substrat reaksiyonu, sülfürik asit çözeltisi ilave edilerek sonlandırılır ve renk değişimi 450 nm $\pm$ 10 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçülür. Numunelerdeki Kortizol (Cor) konsantrasyonu daha sonra numunelerin optik yoğunluk (OD)'si standart eğriyle karşılaştırılarak belirlenir.

- DA (Dopamin) ELISA Kiti Hassasiyet: 4,71 pg/mL Tespit aralığı: 15,63-1000 pg/mL
- Cor (Kortizol) ELISA Kiti Hassasiyet: 0,93 ng/mL Tespit aralığı: 3,13-200 ng/mL
- 5-HT (5-Hidroksitriptamin) ELISA Kiti Hassasiyet: 3,97 ng/mL Tespit aralığı: 14,07-900 ng/mL

Kit hassasiyeti ve tespit aralık değerleri belirtildiği şekilde ve her bir kit 96'şar adet yüksek hassasiyette test içermektedir.

3.5.1. ELISA Yöntemi

Serotonin, dopamin ve kortizol seviyelerinin tespitinde pratik olarak yüksek doğruluk oranına sahip enzim bağlantılı immünosorbent deneyi (ELISA), ilk olarak 1971'de Eva Engvall ve Peter Perlmann tarafından tanımlanan, yaygın olarak kullanılan bir analitik biyokimya deneyidir [119,167,168].

İmmünolojik testlerin prensibi spesifik antijen-antikor reaksiyonuna dayandığından, testler dünya çapında teşhis, ilaç izleme yoluyla farmakokinetik çalışmalar ve ticari olarak mevcut ürünlerin kalite kontrolü için kullanılmıştır [120].

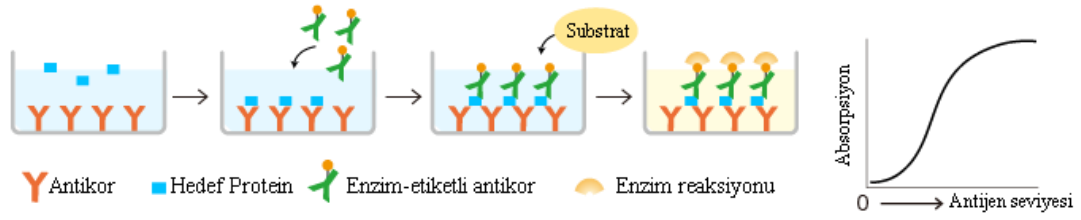
Analiz, ölçülecek proteine karşı yönlendirilen antikorlar kullanılarak sıvı bir numunede bir ligandın (genellikle bir protein) varlığını tespit etmek için katı faz tipi bir enzim immünolojik tahlili (EIA) kullanır. ELISA, tıpta, bitki patolojisinde ve biyoteknolojide teşhis aracı olarak ve çeşitli endüstrilerde kalite kontrol uygulaması olarak kullanılmıştır [121].

ELISA uygulamasında en basit biçiminde, test edilecek numuneden alınan antijenler bir yüzeye eklenir. Ardından, antijeni bağlayabilmesi için yüzeye uygun bir antikor uygulanır. Bu antikor bir enzime bağlanır ve daha sonra bağlanmamış antikorlar çıkarılır. Son adımda, enzimin substratını içeren bir madde eklenir. Bağlanma varsa, gerçekleşen reaksiyon renk değişikliği oluşturarak ışık absorpsiyonu ölçülür ve sayısal değerlere dönüştürülür [121].

ELISA avantajları aşağıdaki şekilde sıralanabilir [122]:

- Basit bir prosedür.
- Bir antijen-antikor reaksiyonu nedeniyle yüksek özgüllük ve duyarlılığa sahiptir.
- Karmaşık numune ön işleme tabi tutulmadan eş zamanlı analizler yapılabildiğinden yüksek verimlilik sağlar.
- Genel olarak güvenli ve çevre dostudur, çünkü radyoaktif maddeler ve büyük miktarlarda organik çözücüler gerekli değildir.
- Düşük maliyetli reaktifler kullanıldığı için uygun maliyetli test yapılmasına imkan sağlar.

Antijen-antikor kombinasyonuna bağlı olarak teste doğrudan ELISA, dolaylı ELISA, sandviç ELISA, rekabetçi ELISA vb. yöntemler tercih edilir.

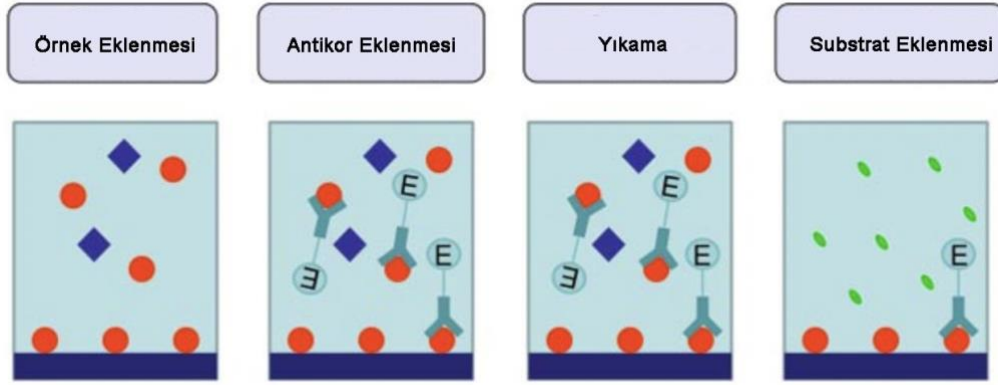


Şekil 3-7 Sandviç ELISA yöntemi [123]

Şekil 3-7’de görülen sandviç ELISA Yönteminde, hedef proteine yönelik bir antikor, mikropılaka kuyularının yüzeyinde hareketsiz hale getirilmesinin ardından ilk önce hedef protein ile ve daha sonra ise bir enzim ile etiketlenmiş başka bir hedef proteine özgü antikor ile inkübe edilir. Yıkamadan sonra mikropılakaya iyi bağlanmış enzimin aktivitesi ölçülür. Hareketsizleştirilmiş antikor (turuncu) ve enzim etiketli antikor (yeşil), hedef proteinin farklı epitoplarını tanımalıdır.

Doğrudan ELISA ile karşılaştırıldığında, sandviç ELISA (hedef protein üzerindeki iki farklı epitopa karşı antikorları birleştirir) daha yüksek bir özgüllüğe sahiptir. Sandviç ELISA, yüksek doğruluk gerektiren uygulamalar için kullanışlıdır [123].

Competitive (Rekabetçi) ELISA ise, serum gibi bir numunede bulunan antikorların tahmini için kullanılan bir tekniktir. Testin prensibi, biri enzimle konjuge, diğeri test serumunda bulunan (serum antikorlar için pozitif ise) iki spesifik antikor kullanılmasıdır. Aynı antijen için iki antikor arasında rekabet oluşur ve rengin ortaya çıkması, testin negatif olduğunu (antikor yokluğunu), rengin olmaması ise pozitif bir testi (antikorların varlığını) gösterir. Rekabetçi ELISA'nın ana olayı, orijinal antijen (örnek antijen) ve ek antijen tarafından yürütülen rekabetçi bir bağlanma işlemidir [160].



Şekil 3-8 Rekabetçi ELISA yöntemi

Şekil 3-8'deki rekabetçi ELISA yönteminde iki antikor kullanıldığından ve antijen/analit spesifik olarak yakalanıp saptandığından yüksek özgüllük seviyesine sahiptir. Antijen ölçümden önce saflaştırma gerektirmediğinden karmaşık numuneler için uygundur ve hem doğrudan hem de dolaylı algılama yöntemleri kullanılabildiğinden esneklik ve hassasiyet sağlamaktadır [160].

3.5.2. ELISA Yönteminin Uygulanması

ELISA yönteminin uygulanmasında, öncelikle çalışmanın organizasyonu planlanarak kitlerin içermediği aşağıdaki materyaller hazır hale getirilmiştir:

- 450 ± 10 nm'de absorbansı ölçebilen mikroparka okuyucu (ELISA Reader)
- Yüksek hızlı santrifüj
- İnkübatör
- Emici kağıt
- Damıtılmış veya deiyonize su
- Tek veya çok kanallı, yüksek hassasiyetli, tek kullanımlık uçlu pipetler
- 2 μ L ila 1 mL hacimler aktarmak için hassas pipetler

Aynı zamanda kitler ile gelen bileşenlerin uygulama için hazırlığı yapılmıştır. Şekil 3-9'da görülmekte olan, proje kapsamında satın alınan kitler aşağıdaki bileşenleri içermektedirler:

- 12 şerit x 8 kuyu Önceden kaplanmış Mikroparka

- 2 adet Standart (liyofilize)
- 20 mL Standart/Numune Seyreltici Tamponu
- 100 adet 60 μ L Biotinlenmiş-Konjugat
- 10 mL Biotinlenmiş Konjugat Seyreltici
- 100 adet 120 μ L Streptavidin-HRP
- 12 mL HRP Seyreltici
- 25 adet 20 mL Yıkama Tamponu
- 9 mL TMB Substrat Solüsyonu
- 6 mL Reaktifi durdurun
- 2 adet Plaka Kapakları



Şekil 3-9 Dopamin, serotonin ve kortizol kit içerikleri

Uygulama başlangıcında serum örnekleri Şekil 3-10'daki yapıda, düzenli şekilde hazır hale getirilmiş ve ölçüm uygulaması gerekli güvenlik önlemleri kapsamında uygulanmaya başlanmıştır.



Şekil 3-10 Serum örneklerinin düzenlenmesi

Eppendorf tüpler içerisindeki numuneler yaklaşık $1000\times g$ 'da 20 dakika santrifüjlemeden önce oda sıcaklığında iki saat bekletilmiştir. Bu aşamada kullanılan yüksek hızlı santrifüj cihazı Şekil 3-11'de görülmektedir.



Şekil 3-11 Yüksek hızlı santrifüj cihazı

Taze hazırlanmış serumlar ile hemen test işlemine geçilmiştir. Farklı tahliller için kalan numuneler daha sonra kullanmak üzere -80°C 'de alikotta saklanılmıştır. İşlemler sırasında tekrarlanan dondurma/çözme döngülerinden kaçınılmıştır. Numune hemolizi sonucu etkileyebileceği için hemolitik numuneler kullanılmamaktadır. Tüm kit bir defada kullanılacağı için herhangi bir saklama prosedürü uygulanmamıştır. Örneklerin hazırlanması sürecine ait plate düzeni ve numaralandırılması işlemleri Şekil 3-12'de görülmektedir.



Şekil 3-12 Plate düzeni ve numaralandırılması

Test sürecinde kullanılan reaktifleri hazırlama süreci:

1. Kullanmadan önce tüm kit bileşenlerini ve numuneleri oda sıcaklığına (18-25°C) getirildi.
2. 25x yıkama tamponu 1x çalışma konsantrasyonuna seyreltildi.
3. Biotinlenmiş-Konjugat (1x) şişesi açılmadan önce santrifüjlenmiştir. 10 µL Biotinlenmiş Konjugat, 990 µL Biotinlenmiş Konjugat Seyreltici ile 100 kat seyreltilmiştir.
4. Standart, 1.0 mL Standart Seyreltici ile sulandırılarak, oda sıcaklığında 10 dakika bekletilmiş ve hafifçe köpürmeyecek şekilde sallanmıştır. Stok solüsyondaki standardın konsantrasyonu 1000 pg/mL'dir.
5. Standart aracılığıyla farklı oranlarda, 0,5 mL Standart Seyreltici içeren 7 tüp hazırlanmıştır. Bunlar 1000 pg/mL, 500 pg/mL, 250 pg/mL, 125 pg/mL, 62.5 pg/mL, 31.25 pg/mL, 15.63 pg/mL değerlerindedir ve son olarak 0 pg/mL yani boş bir tüp te hazır durumdadır.
6. Streptavidin-HRP (1x) şişesi açılmadan önce santrifüjlenmiştir. 10 µL Streptavidin-HRP, 990 µL HRP Seyreltici ile 100 kat seyreltilmiştir.
7. TMB substratı - Çözeltinin gerekli dozajı sterilize edilmiş uçlarla aspire edilmiş ve kalan çözelti tekrar şişeye dökülmemiştir.

Numune hazırlama aşaması:

1. Kullanmadan önce tüm malzemeler ve hazırlanan reaktifler oda sıcaklığında dengelenmiştir. Tüm reaktifler ise şişelerde köpük oluşturmamaya özen gösterilerek iyice karıştırılmıştır.
2. Tüm testte kullanılan olası numune miktarları hesaplanmıştır. Yeterli sayıda numune önceden rezerve edilmiştir.
3. Testten önce konsantrasyonu tahmin yapılmıştır. Bunlar için değerlerin standart eğri aralığında olmaması durumunda, deneylerimiz için en uygun numune dilüsyonlarını belirlenmiştir.

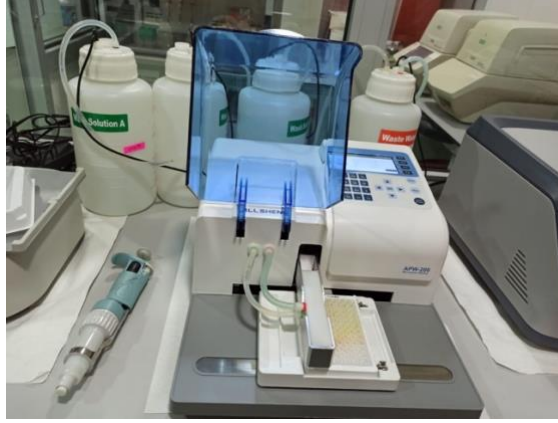
Test Prosedürü sırası aşağıdaki gibidir:

1. Tüm reaktif ve numuneler oda sıcaklığına getirilmiştir. Tüm kuyular kullanılmıştır.
2. Standart Seyreltici Tamponu ile bir Boş kuyu ayarlanmıştır. Kuyu başına 50 µL Standart veya Numune ve her kuyuya 50 µL Biotinylated -Conjugate(1x) eklenmiştir. İyice karıştırılıp yapışkan filmler ile kaplanmış ve 37°C'de 1 saat inkübe edilmiştir. Kimyasal aktarım işleminde Şekil 3-13'de görülen çoklu pipet uygulaması yapılmıştır.



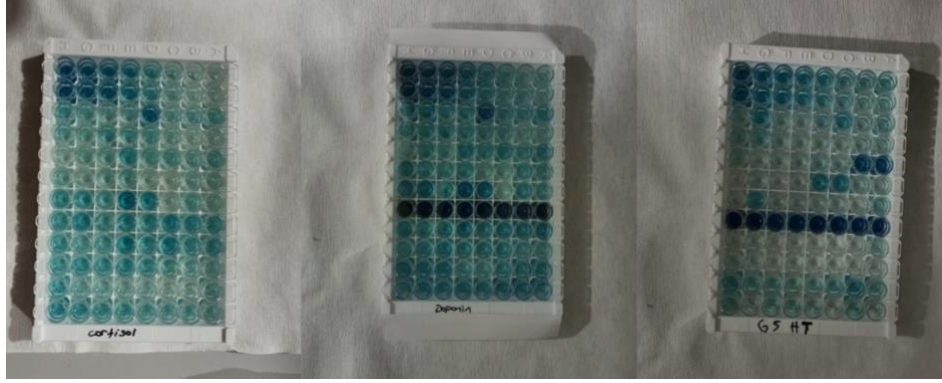
Şekil 3-13 Çok pipetli aktarım uygulaması

3. Her kuyuyu aspire edilmiş ve işlem toplam üç yıkama için tekrarlanarak yıkama yapılmıştır. Şekil 3-14'deki ortamda otomatik yıkayıcı kullanarak her kuyu yıkama tamponu (200 µL) ile doldurarak yıkanmıştır.



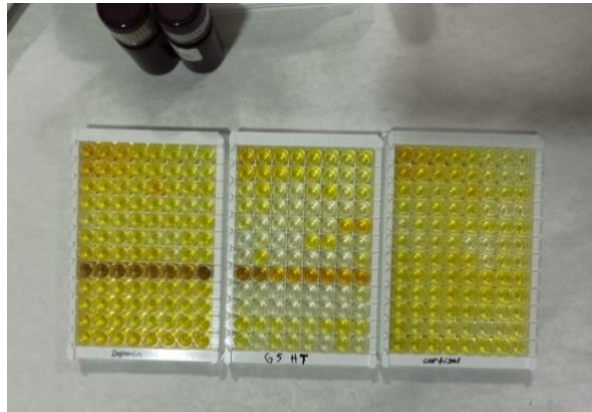
Şekil 3-14 Yıkama işlemi

4. Her adımda sıvının tamamen uzaklaştırılması, iyi performans için esastır. Son yıkamadan sonra kalan yıkama tamponu aspire edilerek/boşaltılarak çıkarılmıştır. Plaka ters çevrilerek temiz kağıt havlulara bastırılmıştır.
5. Her kuyuya 100 μ L Streptavidin-HRP (1x) eklenerek, sağlanan yapışkan filmlerle örtülmüş ve 37°C'de 1 saat inkübe edilmiştir.
6. Her kuyu aspire edilmiş ve işlem toplam beş yıkama için tekrarlanarak yıkanmıştır. Otomatik yıkayıcı kullanarak her kuyuyu yıkama tamponu (200 μ L) ile doldurarak yıkanmıştır. Her adımda sıvının tamamen uzaklaştırılması, iyi performans için esastır. Son yıkamadan sonra kalan yıkama tamponu aspire edilerek/ boşaltılarak çıkarılmış, plakayı ters çevirilerek temiz kağıt havlulara bastırılmıştır.
7. Her kuyucuğa 90 μ L Substrat Solüsyonu eklenmiş ve 37°C'de 20 dakika inkübe edilmiştir. Plaka karanlıkta muhafaza edilmiş, cereyan ve diğer sıcaklık dalgalanmalarından uzak tutulmuştur. Plaka doğrudan ışığa maruz bırakılmamıştır. Sonucunda Şekil 3-15'te ki görüntü elde edilmiştir.



Şekil 3-15 Aktivasyon işlemi sonrası görünüm

8. Her kuyucuğa 50 μ L Durdurma Solüsyonu eklenmiştir. Renk değişiminin homojen görünmediği durumlarda, iyice karışmasını sağlamak için plakaya hafifçe vurulmuştur.
9. 450 nm'ye ayarlanmış bir mikroparka okuyucu kullanarak her kuyunun optik yoğunluğu 5 dakika içinde belirlenmiştir. Dalga boyu düzeltilmesi 540 nm veya 570 nm'ye ayarlanmıştır. 450 nm'deki okumalardan 540 nm veya 570 nm'deki okumalar çıkarılmıştır, böylelikle bu çıkarma işleminin optik kusurları düzeltilmesi sağlanmıştır.

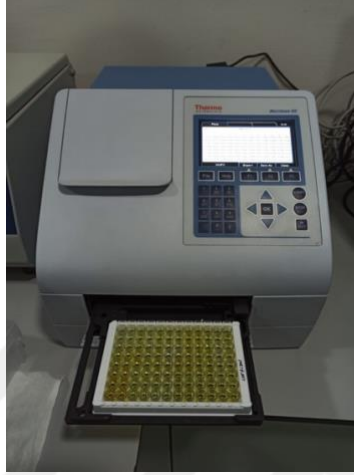


Şekil 3-16 İnhibitör eklenmesi sonrası renk değişimi

10. Tüm bu işlemler sonrası Şekil 3-16'da görülen mikroparkaların, okuyucudan elde edilen kuyulara ait optik okuma değerleri hesaplama algoritmasına dahil edilerek sonuç hesaplaması aşamasına geçilmiştir.

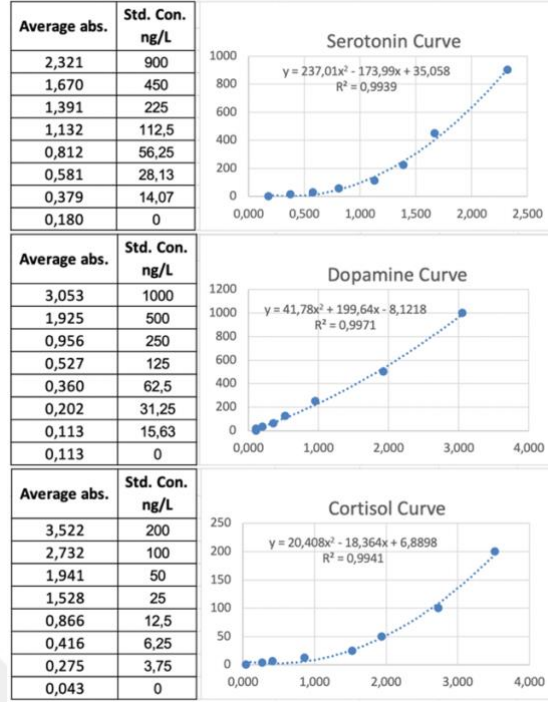
3.5.3. ELISA Verilerinin Analizi

Bu tahlil, yarışmalı inhibisyon enzimi immünolojik tahlili tekniğini kullanır, bu nedenle numunedeki DA konsantrasyonu ile tahlil sinyal yoğunluğu arasında ters bir korelasyon vardır. Tahlillerde Şekil 3-17'deki Thermo Scientific Multiskan GO marka mikrolaka spektrofotometresi aracılığıyla fotometrik araştırma uygulaması gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3-17 ELISA Okuyucu kullanımı

Her standart, kontrol ve numune için çift okumaların ortalamasını alınmıştır. Y ekseninde DA, Cor ve 5-HT konsantrasyonu ve X ekseninde absorbans ile standart bir eğri oluşturulmuştur. Standart değerlere ait noktalardan en uygun düz çizgi oluşturularak ve regresyon analizi uygulanmıştır. Seyreltilen numuneler standart eğriden okunan konsantrasyon seyreltme faktörü ile çarpılmıştır.



Şekil 3-18 Absorpsiyon ile konsantrasyon değerlerinin ilişkisi ve oluşturulan eğriler

Microsoft Excel ortamında ng/L cinsinden standardize konsantrasyon değerleri bilinen numunelere ait absorpsiyon değerleri arasındaki ilişki oluşturularak çizilmiş olan, herbir ölçüme ait regresyon grafikleri Şekil 3-18’de görülmektedir. Oluşturulan eğrilerin R^2 değerlerinin kuvvetli olduğu görülmüştür.

3.6. EEG Kayıtlarının Alınması

EEG kayıtları, İstanbul Üniversitesi – Cerrahpaşa Veterinerlik Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalındaki yoğun bakım biriminde bulunan EEG cihazı aracılığıyla Elektroensefalografi muayene odasında ve vakanın durumuna göre EEG cihazı ve gerekli ekipmanlar taşınarak çeşitli özel klinikler ve hayvan çiftliğinde elde edilmiştir. Çalışmada sedasyon altındaki deneklerden 5 farklı elektrot bölgesinden elektroensefalogram kayıtları elde edildi.

EEG uygulaması kapsamında, beyinde aynı anatomik bölgeye ait elektriksel aktivite farklı kafatası tiplerine sahip köpeklerde dahil aynı beyin bölgelerinden ve birbirinden bağımsız zamanlarda kaydedilebilmiştir. Böylelikle herbir hayvanda kayıt standardizasyonu sağlanmış ve karşılaştırmalar yapılabilmektedir.

Korteksin elektriksel aktivitesi kaydedilirken, son derece duyarlılığın mevcut olduğu kas, kardiyovasküler ve oküler aktiviteler de dahil olmak üzere dikkate alınmıştır. Bu nedenle EEG uygulamasına özel bir önem ve özen gösterilmiştir.

EEG işlemi mümkün olduğunca gürültü, yoğun ışık, koku gibi uyarıcı etmenlerden arındırılmış sakin bir ortamda gerçekleştirilmiştir. Köpeğin sedye üzerinde bulunması durumunda metal kısımlarına temas etmemesine özen gösterilmiştir. EEG işleminin güvenliği açısından hayvanın 12 saat öncesine kadar bir şey yememiş olmasına dikkat edilerek sedatif madde sebebiyle kusma gibi durumların önüne geçilmiştir.



Şekil 3-19 EEG çekim işlemi

Sinyaller, 256 Hz'lik bir örnekleme frekansında alınmıştır. Örnekleme frekansının düşük olması sinyal analizi için büyük bir zorluk teşkil eder ve spektral çözünürlüğü sınırlar, yüksek olması ise veri depolaması ve analize yönelik ekstra işlem gücü gerektirebilir. Örnek EEG çekim uygulamasına ait ortam Şekil 3-19'da görülmektedir.

3.6.1. Hayvanın Hazırlanması ve Sedasyon İşlemi

Sedasyon işlemi aracılığıyla hayvan üzerinde uygun şekilde zapturapt sağlanması ile uygulama sırasında hareketlerden kaynaklı artifaktların engellenmesi ve kaydın kaliteli şekilde alınması sağlanmıştır.

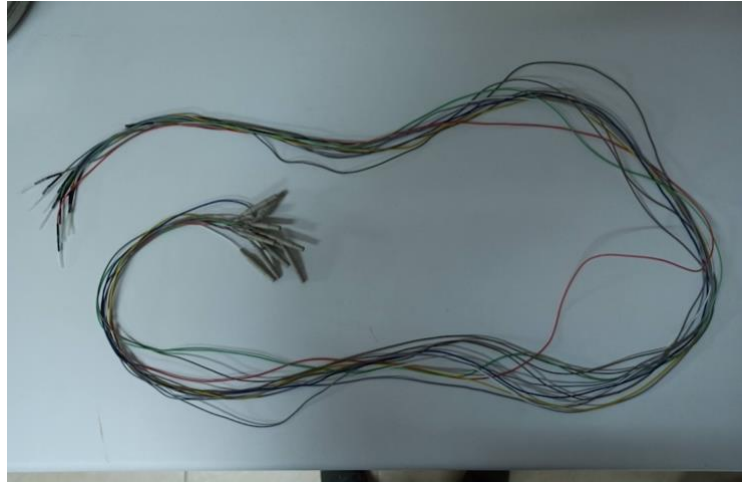
Çalışma kapsamında kullanılan Xylazine (Ksilazin) sedatif maddesi, piramidal kortikal nöronlar üzerinde doğrudan etkisi olmayan bir α_2 adrenerejik reseptör agonistidir. Ksilazin ile

yapılan geçmiş çalışmalarda yüksek doz kullanımda baskın olarak uyku dalgalarının saptanması, düşük dozun ise yeterli sakinleşmeyi sağlamaması nedeniyle optimum sakinleşmenin sağlanmasında 1 mg/kg dozunun kullanılmasının uygun olduğu belirtilmiştir [149-151].

Kaydın alınmasını sağlayacak en uygun ksilazin dozunun seçilmesinde Pellegrino ve arkadaşları tarafından toplam 50 köpek ile gerçekleştirilmiş olan ve gruplara sırasıyla 0.5, 1 ve 1.5 mg/kg subkutan ksilazin uygulandığı çalışmaya ait doz-cevap eğrisinden yararlanılmıştır. Bu doğrultuda çalışmamızda hayvan kısıtlaması, 1 mg/kg subkutan Ksilazin enjeksiyonu kullanılarak sağlanmıştır [149].

3.6.2. EEG İşlemi ile İlgili Cihazlar

Köpeklerde gerçekleştirdiğimiz EEG işleminde, deri üzerindeki kıl yoğunluğu ve köpeğin kayıt sırasında gerçekleştirmesi muhtemel hareketleri nedeniyle direkt kortikal kayıt için minimal invaziv etkiye sahip Şekil 3-20'deki deri altı iğne elektrotlar (Boston Scientific Scimed Inc., Massachusetts, United States) tercih edilmiştir. Deri altı iğne elektrotlar, kolay ve hızlı uygulanabilirliklerinin yanında minimum artefakta sebep olacak şekilde kısıtlı elektrot hareketi sağlamaları sebebiyle veteriner hekimlikte en sık kullanılan elektrotlardır [152].

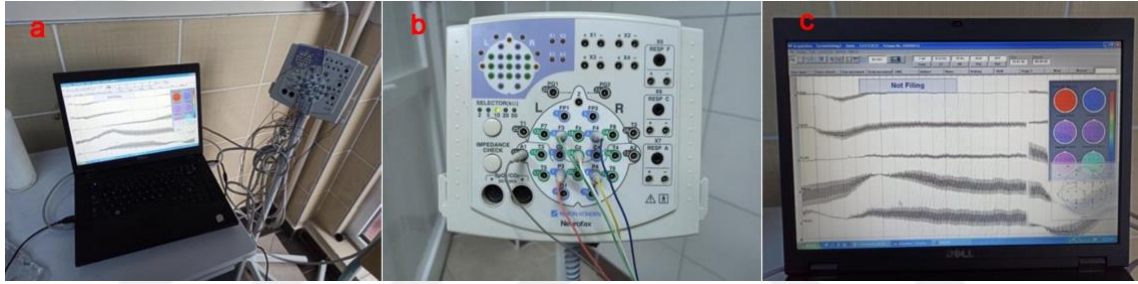


Şekil 3-20 Deri altı iğne elektrotlar

Aktif ve referans elektrotlar için 15 mm uzunluğunda paslanmaz çelik iğneli subdermal elektrotlar kullanıldı. Bu elektrotlar ile deri altında duracak şekilde kaslara girmeden, ilgili alanlar üzerinde cilt altına kolayca giriş yapılabilmektedir. Empedanslar,

EEG'ler elde edilmeden önce ölçüldü ve her zaman yaklaşık 5 k Ω olmak üzere tüm elektrot tipleri için benzerdi. 5 iğne, belirlenen elektrot pozisyonlarına yerleştirildi. Çalışma süresince kullanılan herhangi bir subdermal iğne elektrotu aracılığıyla gerçekleştirilen kayıtlarda empedans uyumsuzluğu veya artefakt tespit edilmedi.

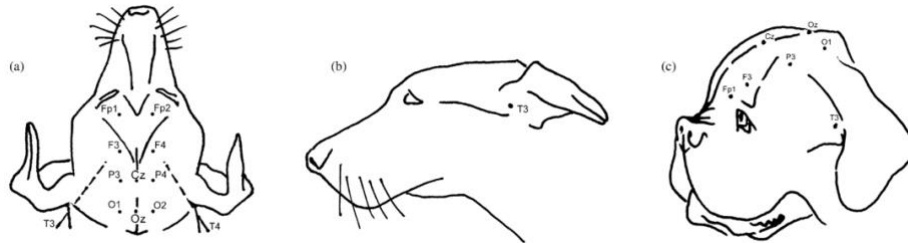
EEG kayıtlarını elde etmek için, 32 kanallı Neurofax EEG-1200 (Nihon Kohden Digital Health Solutions Inc., Tokyo, Japan) model analog-dijital arayüze sahip sistem kullanıldı. Sinyal verileri Nihon Kohden EEG 5.03 ve Nihon Kohden Event Viewer yazılımları kullanılarak Intel i5 İşlemcili Dell E5540 dizüstü bilgisayar aracılığıyla kayıt sırasında eş zamanlı görselleştirilmiş ve arşivlenmiştir. Mevcut sistemler Şekil 3-21'de görülmektedir.



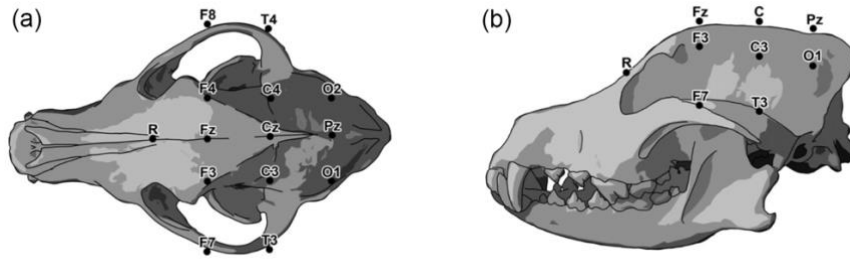
Şekil 3-21 EEG sistemi (a), junction box (b), kayıt monitörü (c)

3.6.3. Kayıt Elektrotlarının Yerleştirilmesi ve Montaj Düzeni

Köpeklerde EEG uzun yıllardır kullanılmasına ve çeşitli deneysel çalışmalara rağmen araştırmalarda ve veteriner klinik nörolojisinde kullanımı şimdiye kadar az ilgi görmüştür. Teknik olarak zorluklar ve kayıt tekniği (elektrot sayısı, terminoloji ve konum) için evrensel bir standart olmaması EEG'nin veterinerlik alanında yaygınlaşmasını engellemiştir [149].



Şekil 3-22 EEG kayıt elektrotlarının yerleşimini gösteren bir mezosefalik köpek kafatasının dorsal (a) ve brakisefalik köpek kafatasının sol tarafının yan görünümü (b), (c) [149]



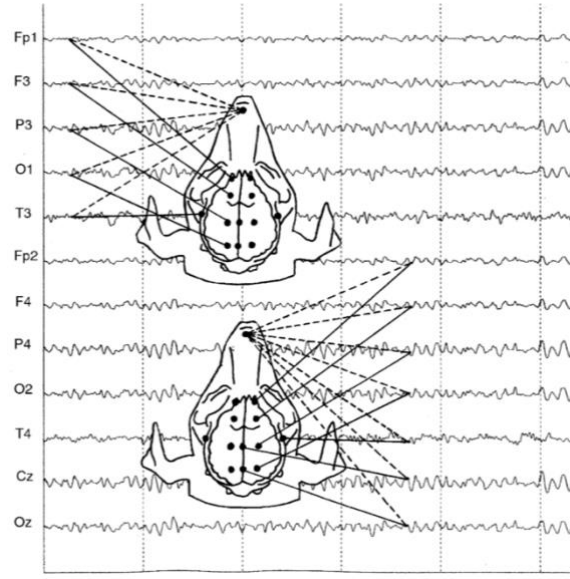
Şekil 3-23 Mezasefalik köpek kafası dorsal (a) ve sağ tarafı (b) [153]

Çalışmamızda F3, F4, T3, T4, Cz ve referans (R) olmak üzere 5 farklı bölgeye yerleştirilen elektrotlar Pellegrino ve ark., 2004 ile James ve ark., 2017 çalışmaları referans alınarak Şekil 3-22 ve 3-23'te gösterilen düzenlerde yerleştirilmiştir. Çalışma kapsamında bu düzenin uygulanması ise Şekil 3-24'te görülmektedir.



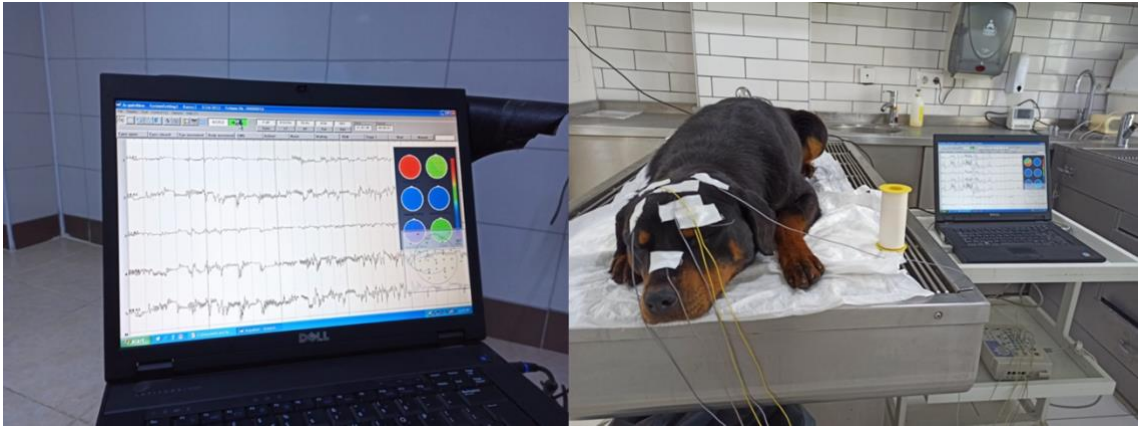
Şekil 3-24 EEG elektrotlarının yerleşimi

EEG kaydında kullanılan elektrot kombinasyonlarının düzeni (montaj) olarak monopolar/referansiyel çalışma gerçekleştirilmiştir. Montaj düzenlemeleri aracılığıyla, elektrotların her biri tarafından tespit edilen bireysel deşarjların yanında, bu elektrotların birbirleriyle ilişkilendirilmeleriyle de kafa derisinin tamamı boyunca çok daha zengin bir veri seti ortaya çıkarılması amaçlanmaktadır.



Şekil 3-25 Monopolar montaj düzeni [149]

Çalışma kapsamında uygulanmış olan monopolar düzene ait temsili yapı Şekil 3-25'te görülmektedir. Fp: Prefrontal, F: Frontal, P: Parietal, O: Oksipital, T: Temporal, C: Central olarak kısaltılmıştır. Tek sayılar sol, çift sayılar sağ tarafı temsil etmektedir.



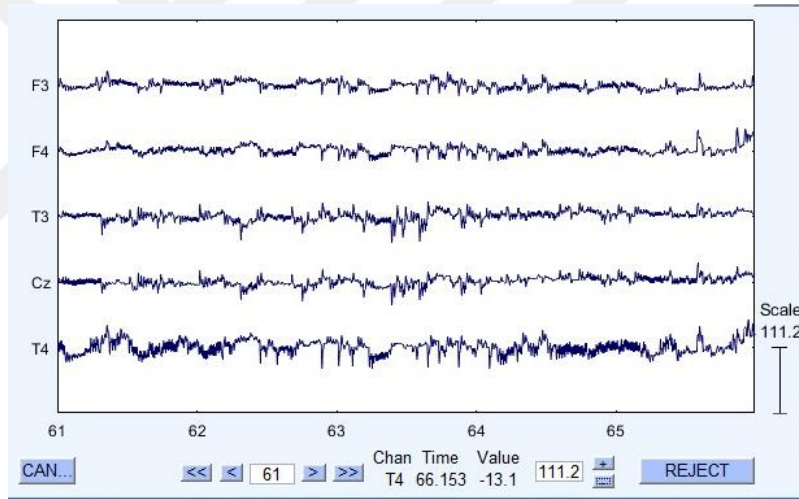
Şekil 3-26 Kayıt işlemi sırasında EEG monitörü ve hasta

Sinyal verileri Nihon Kohden EEG 5.03 sürümü yazılımı üzerinden eş zamanlı olarak incelenerek montaja ait sinyal kalitesi takip edilmiştir. Monitör üzerinden görüntüleme düzeni Şekil 3-26'da görülmektedir.

3.7. EEG Sinyallerinin İşlenmesi ve Analizi

Bu tez çalışmasında, EEG verilerinin hem ön işleme hem de analizi için MATLAB (The Mathworks, Inc.) ortamında çalışan ve SCCN laboratuvarı tarafından geliştirilmiş olan EEGLAB adlı açık kaynak kodlu toolbox kullanılmıştır.

EEG sinyallerinin export işlemi, işlenmesi ve analizinde tüm prosedürler standardize hale getirilerek her bir hasta verisine uygulanmıştır. Nihon Kohden Event Viewer yazılımı aracılığıyla görüntülenen sinyaller hastaya ait protokol numaraları ve işlem sıraları ile etiketlenerek ASCII formatta kaydedilmiş ve veriseti oluşturulmuştur. Verilerin Matlab üzerinden EEGLAB eklentisi aracılığıyla format dönüşümü gerçekleştirilmiş ve sinyaller Matlab ortamında Şekil 3-27'deki gibi görselleştirilmiştir. EEG veri dosyalarını EEGLAB'e aktarırken ilk olarak referans elektroduna atıfta bulunulmuştur. Sinyal verilerine ait örnekleme frekansı bellek ve disk depolama alanından tasarruf etmek için 256 Hz'e düşürülmüştür.



Şekil 3-27 Ham EEG sinyalinden bir kesit

Daha sonra, EEG kafa derisi haritalarını çizmek veya veri bileşenleri için kaynak konumlarını tahmin etmek için gerekli olan kayıt elektrotları hakkında bilgi almak için kanal konumları alınmış ve ön işleme adımına geçilmiştir. Çalışma kapsamında toplanan EEG verilerinin ön işleme kapsamında filtreleme, sinyallerin görselleştirilmesi, artifaktlı bölgelerin eliminasyonu, bağımsız bileşen analizi metodu ve güç spektral yoğunluğunun hesaplanması dahil olmak üzere EEGLAB'de mevcut olan standart veri analiz fonksiyonları kullanılmıştır. Tüm bu işlemler belirtildiği şekilde sıralanarak her bir hastaya ait veriler üzerinde standart şekilde uygulanmıştır.

Zaman-Frekans analizi (güç spektral yoğunluğu) sonrası her bir kanala ait bölgesel sinyal-güç karakteristikleri belirlenip, elde ettiğimiz ve literatür kaynaklı diğer veriler değerlendirilerek, bitkisel gıda takviyelerinin etkinliğini konusunda yorumlar yapılmasına yönelik özellik çıkarımları yapılmıştır. Çıkarılan özelliklere ait bulgusal değerler SPSS ortamına aktarılarak istatistik aşaması için hazır hale getirilmiştir.

3.7.1. Ön İşleme

EEGLAB aracılığıyla EEG ön işleme ham EEG verilerinin filtrelenmesiyle başlamıştır. Ardından filtrelemelerin yapıldığı sinyaller görsel olarak incelenmiş ve çevresel ve beyin harici fizyolojik aktiviteler kaynaklı oluşmuş büyük genlikli artefakt dönemleri veriden çıkarılmıştır. Analiz kalitesinin artırılmasına yönelik Bağımsız Bileşen Analizi (ICA) yöntemi uygulandıktan sonra ön işleme aşaması tamamlanmış ve EEG sinyalleri Zaman-Frekans Analizi için hazır hale gelmiştir.

3.7.1.1. Filtreleme

EEG sinyalleri üzerinde 0.1 Hz düşük kesme frekansı ile yüksek bant geçiren filtre ve ardından 30 Hz kesme frekansı ile alçak bant geçiren filtre uygulaması yapılmıştır. Bu uygulama sebebiyle 50 Hz'de şebeke hattı parazitini gidermek için notch filtre uygulamasına gerek duyulmamıştır. Filtreleme uygulanması ile verimiz, çalışmamızda odaklandığımız parametre aralığı harici frekans bantlarından arındırılmıştır. Lineer Finite Impulse Response (FIR) filtresi kullanılarak sürekli EEG sinyallerine uygulanan bant geçiren filtrelemesi, elektrik şebeke hattı gürültüsünü, elektromiyografi (EMG) ve elektrookülografi (EOG) artefaktlarını büyük oranda ortadan kaldırmıştır.

N dereceli bir FIR filtresi için, çıkış sırası geçmiş giriş değerlerinin ağırlıklı toplamından oluşur:

$$y(n) = \sum_{i=1}^N b_i x[n-i] \quad 3.1$$

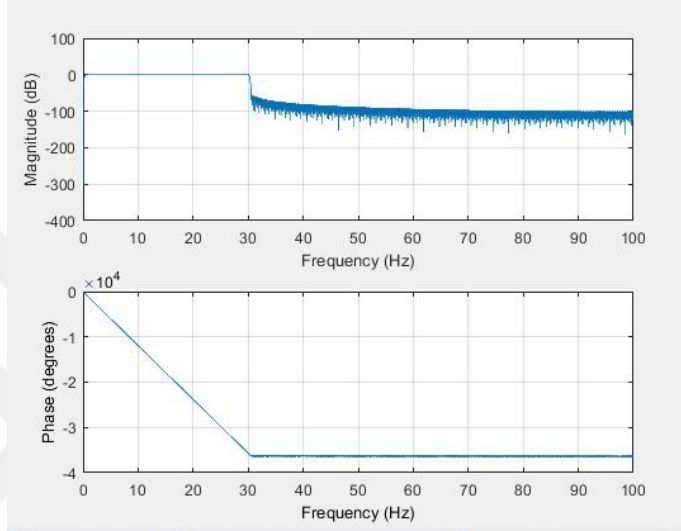
$y(n)$ = çıkış sinyali

$x(n)$ = giriş sinyali

N = Filtre sayısı

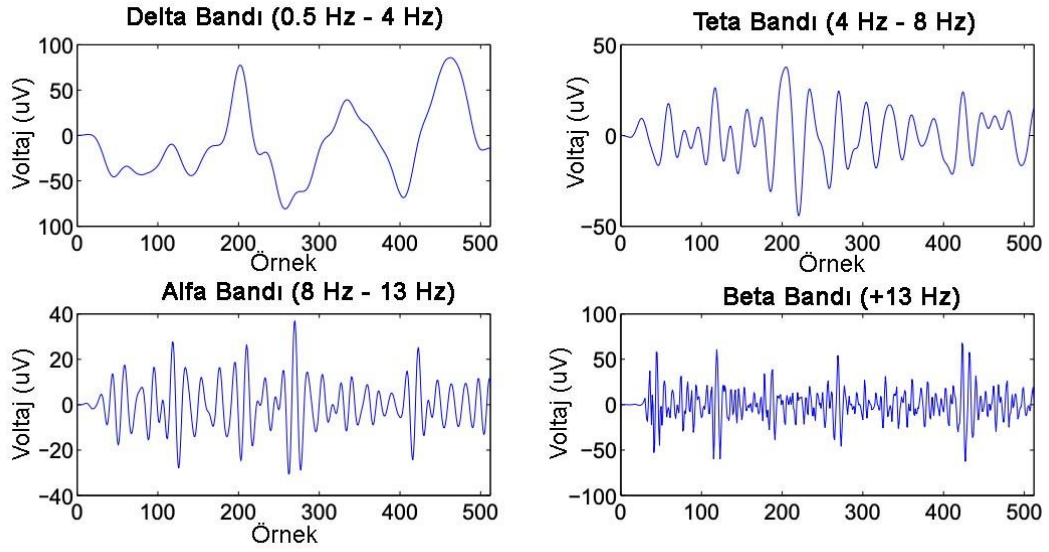
b_i = Filtre katsayıları

FIR filtreler karmaşık değildir ve faz özelliklerinin çok önemli olduğu uygulamalarda kullanılırlar. Bu filtreler her zaman kararlıdır ve doğrusal bir faz tepkisi gösterir. Belirli uygulamalarda kritik olabilecek bir gecikme sergilerler ve ayrıca çıktıyı hesaplamak için çok fazla girdi kullandıkları için genellikle yüksek bir sıraya sahiptirler [154]. Bu filtre uygulamasına ait görsel Şekil 3-28’de mevcuttur.



Şekil 3-28 Çalışmamıza ait FIR filtre uygulaması

Delta, teta, alfa ve beta frekans bantlarına ait sinyal karakteristikleri ise Şekil 3-29’da görülmektedir.

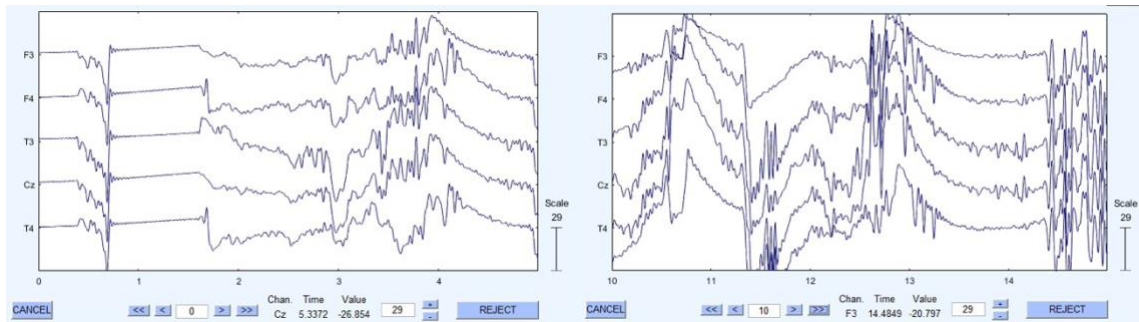


Şekil 3-29 Bant geçiren filtre uygulamalarından elde edilen EEG frekans bantları [154]

3.7.1.2. Artifaktların Çıkarılması

Filtreleme işlemi sonrası her bir kanala ait sinyaller üzerinde etkisi olan nabız, kas ve göz hareketi gibi durumlarda oluşan fizyolojik sebepli artifaktlar büyük oranda temizlenmiştir. Ancak kayıt elektroduna istemli veya istemsiz müdahaleler gibi çevresel etmenler sebebiyle oluşabilen Şekil 3-30'daki sinyallerde görüldüğü gibi yüksek boyutlu bozulmaların mevcut olduğu görülmüştür. Bu durumda veriler görsel olarak incelendi ve elektrot hareketinden kaynaklandığı tespit edilen büyük genlikli artefakt dönemlerinin bulunduğu kesitler kayıt verisinden çıkarıldı.

İşlem sonrası elde edilen sinyallerde epoklama (dilimleme) işlemi yapılarak çalışmada odaklanılacak sinyal aralıkları her bir hasta için standardize hale getirilmiştir.



Şekil 3-30 Kayıt sırasında oluşan çeşitli artifaktlar

3.7.1.3. Bağımsız Bileşen Analizi

Çalışma kapsamındaki EEG araştırmalarında göz, kas ve şehir şebekesi gibi çevresel kaynaklı gürültü artefaktlarını tespit ederek ve ortadan kaldırarak beynin elektriksel kaynaklarını birbirinden ayırmak için Bağımsız Bileşen Analizi (Ing. Independent Component Analysis (ICA)) kullanılmıştır.

ICA algoritmaları ile EEG verilerinde birbirinden azami ölçüde bağımsız olan hem yapay hem de nöral olarak oluşturulmuş farklı sinyal kaynaklarını birbirlerinden yalıtılmıştır, bir diğer deyişle veri içerisindeki sinyal bileşenleri ayrıştırılmıştır.

Çalışmamızda ICA algoritmasının otomatikleştirilmiş bir sürümünü içeren EEGLAB toolbox'tan yararlanılmıştır.

ICA, veri projeksiyonlarının minimum zamansal örtüşmeye sahip olduğu bir koordinat çerçevesi bulur. ICA'nın temel matematiksel kavramı, veri projeksiyonları arasındaki karşılıklı bilgiyi en aza indirmek veya ortak entropilerini en üst düzeye çıkarmaktır [166].

3.7.2. Zaman-Frekans Analizi ve Özellik Çıkarımı

Sinyal verilerine ait Güç Spektral Yoğunluğunu (Ing. Power Spectrum Density (PSD)) elde etmek için Ayırık Fourier Dönüşümü (Discrete Fourier Transform) gerçekleştirilerek Welch metodu kullanılmıştır.

EEG oluşturan sinirsel süreçler dinamik bir yapıdadırlar. EEG dalgalarının gücünde veya frekansında, önemli bilgilerin sağlandığı geçici değişiklikler vardır. EEG sinyallerinin durağan olmayan doğası, spektral içeriğini zamanın bir fonksiyonu olarak ölçebilen yöntemlerin kullanılmasını gerekli kılmaktadır. Zaman-Frekans Analizi, salınım durumlarında kendiliğinden ve indüklenmiş değişikliklerin incelenmesi için çok uygun bir araçtır.

EEGLAB aracılığıyla elde etmiş olduğumuz spektral çizim, bir veri kanalının aktivite spektrumunu temsil eden renkli bir iz göstermektedir. Ayrıca seçilen frekansta beyin modelindeki güç spektrumu da EEGLAB aracılığıyla görüntülenebilmektedir. Bu nedenle beyinde aktifleşen kısımlar bilinebilmektedir. Çalışmamızda delta, teta, alfa, beta Hz aralıklarındaki ortalama dönemsel verilerdeki güç spektrumu çizilerek gücün kafa derisi dağılımının incelenmiştir. Her bant aralığının kapsamış olduğu alt frekans değerleri boyunca, her EEG kanalı için ortalama hesaplanarak PSD ile ilişkili özellik çıkarımı gerçekleştirilmiştir.

Fourier analizi, zaman alanı sinyallerinden frekans alanı sinyallerine veya tam tersine gitmek için popüler bir sinyal işleme yaklaşımıdır. Bu analiz hem sürekli hem de ayrık zamanlı sinyallere uygulanabilir. Her sinyali trigonometrik fonksiyonlarının toplamı ile temsil edilebileceği veya yaklaşılabileceği ilkesine göre aktarır. Hızlı Fourier Dönüşümü (Ing. Fast Fourier Transform (FFT)), bir dizinin Ayrık Fourier Dönüşümünü (Ing. Discrete Fourier Transform (DFT)) veya tersini hesaplayan bir algoritmadır.

DFT aşağıdaki formülle tanımlanır:

$$X_k = \sum_{n=0}^{N-1} x_n e^{\frac{-2\pi i k n}{N}} \quad k = 0, \dots, N - 1 \quad 3.2$$

$X_k = x_n$ 'nin DFT'si

x_n = giriş sırası

N = giriş sırasındaki elemanlar

FFT, EEG'de PSD tahmin etmek için yaygın olarak kullanılır. PSD, birim frekans başına bulunacak spektral enerji dağılımını ifade eder. FFT'yi doğrudan sinyale uygulayarak veya tahmin edilen otokorelasyon dizisini dönüştürerek hesaplayabilmekteyiz.

Özellik çıkarımı için FFT kullanan teknikler arasında, Periodogram ve Welch yöntemi en popüler ve yaygın olarak kullanılanlardan ikisidir.

PSD'yi hesaplamak için en kolay yaklaşım Periodogramdır. Periodogram, Frekans ayrıştırmasından oluşur ve sinyalin Fourier dönüşümünün modül karesi ile elde edilir:

$$S(f) = \frac{\Delta t}{N} \left| \sum_{n=0}^{N-1} x_n e^{\frac{-2\pi i k n}{N}} \right|^2 \quad 3.3$$

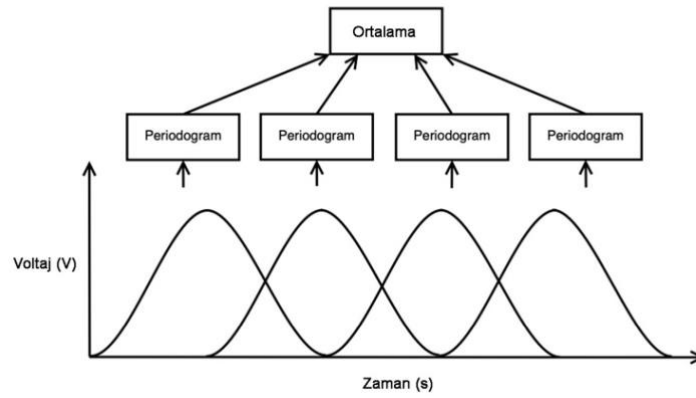
$S(f) = x_n$ 'nin PSD'si

Δt = örnekler arasındaki boşluk

x_n = giriş sırası

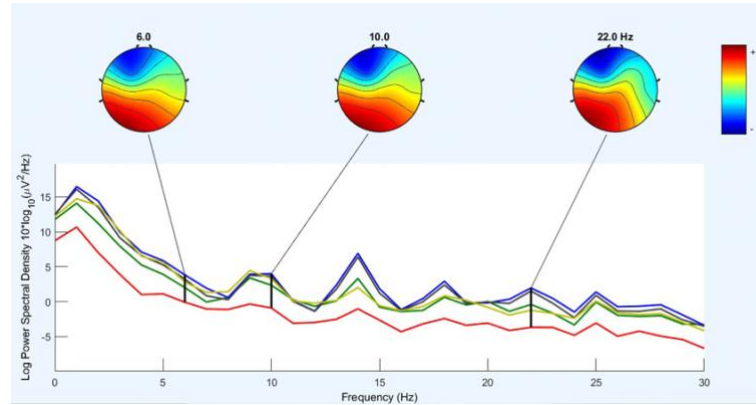
N = örnekler arasındaki boşluk

Öte yandan Welch metodu, standart Periodogramın gelişmiş bir versiyonudur. Her pencere için bir periodogramın hesaplandığı ve daha sonra PSD'yi hesaplamak için bu periodogramların aralarında ortalamasının alındığı sinyale örtüşen pencerelerin kullanımına dayanır. Bu prosedür Şekil 3-31'de gösterilmektedir [154].



Şekil 3-31 Welch Metodu prosedürü [154]

Bu yöntem, frekans çözünürlüğünü azaltmak karşılığında tahmini güç spektrumlarındaki varyansı ve dolayısıyla gürültüyü azaltır [154].



Şekil 3-32 Farklı EEG veri kanallarına ait aktivite spektrumu

Şekil 3-31’de Welch metoduna ait prosedür görselleştirilirken, Şekil 3-32’de Welch metodu uygulaması sonucu hesaplanan, farklı EEG kanallarına ait güç spektrumu görülmektedir.

3.8. Bitkisel Gıda Takviyelerinin Hazırlanması ve Analizi

Araştırmada kullanılmış olan bitkisel ekstraktlar Fiziksel, Kimyasal ve Mikrobiyolojik analizleri içeren sertifika onaylı üreticilerden temin edilmiştir. Sankara Beyin ve Biyoteknoloji Araştırma Merkezi bünyesindeki Enstrümental Analiz Laboratuvarında, UV-Vis spektroskopisi metodu ile UV-Vis Spektrofotometre cihazı aracılığıyla biyoaktif bileşenlerinin analizi (toplam fenol belirlenmesi gibi) yapılarak standardizasyon çalışması gerçekleştirilmiştir. Ardından hassas şekilde ölçümler yapılarak steril ortamda kapsülleme işlemi gerçekleştirilmiştir.

3.8.1. Bitkilere ait Ekstraktların Tedariği ve Analiz Raporları

Çalışmada kullanılan Aslan yeleşi ve Kediotu ekstraktları APHARMA Sağlık Ürünleri A.Ş. firması aracılığıyla tedarik edilmiştir. Aslan yeleşi ve Kediotu ekstraktları, zengin antioksidan kapasitelerinin korunması dikkate alınarak bitki materyallerinin yüksek oranda korunacağı şekilde su ve etanol karışımı ile ekstrakt haline getirilmiştir.

Üretici firmalara ait ürün bilgilerinin yanında fiziksel, kimyasal ve mikrobiyolojik analizlere ait raporlar ekte sunulmuştur.

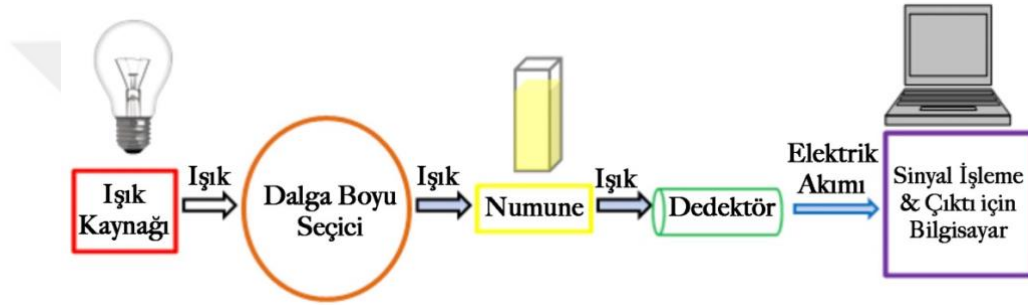
3.8.2. UV-Vis Spektroskopi ile Toplam Fenolik Madde Miktarları Analizi

Ultraviyole-görünür (UV-Vis) spektroskopisi, bakteri kültürü, ilaç tanımlama ve nükleik asit saflık kontrolleri ve kantitasyonundan içecek endüstrisinde kalite kontrolüne ve kimyasal araştırmalara kadar birçok bilim alanında yaygın olarak kullanılmaktadır. UV-Vis spektroskopisi, bir referans veya boş numuneye kıyasla bir numune tarafından absorbe edilen veya içinden iletilen UV ve görünür ışığın ayrı dalga boylarının miktarını ölçen analitik bir tekniktir. Bu özellik, numune bileşiminden etkilenir ve potansiyel olarak numunede ne olduğu ve hangi konsantrasyonda olduğu hakkında bilgi sağlar [144,145].

Işığın dalga boyu ile ters orantılı olan belirli bir enerjisi vardır. Daha kısa dalga boyları daha fazla enerji taşır ve daha uzun dalga boyları daha az enerji taşır. Bir maddedeki elektronları absorpsiyon olarak algılayabileceğimiz daha yüksek bir enerji durumuna yükseltmek için belirli bir miktarda enerji gereklidir. Bir maddedeki farklı bağlanma ortamlarındaki elektronlar, elektronları daha yüksek bir enerji durumuna yükseltmek için

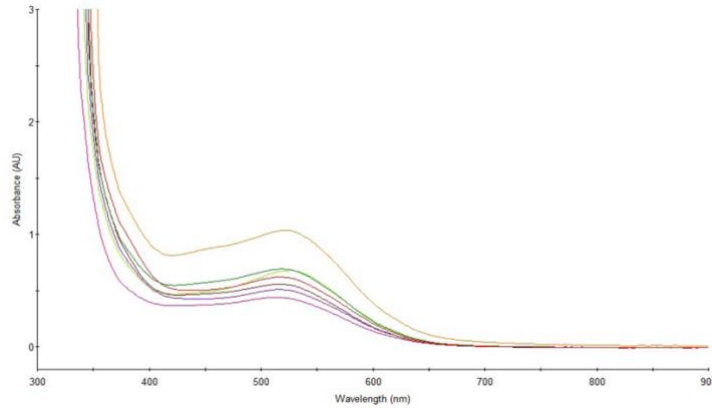
farklı bir spesifik enerji miktarı gerektirir. Bu nedenle ışığın absorpsiyonu farklı maddelerde farklı dalga boylarında gerçekleşir. İnsanlar, mor olarak gördüğümüz yaklaşık 380 nm'den kırmızı olarak gördüğümüz 780 nm'ye kadar bir görünür ışık spektrumu görebilirler. UV ışığı, görünür ışıktan yaklaşık 100 nm'ye kadar daha kısa dalga boylarına sahiptir. Bu nedenle, ışık dalga boyu ile tanımlanabilir ve UV-Vis spektroskopisinde maksimum absorbansa karşılık gelen spesifik dalga boylarını belirleyerek farklı maddeleri analiz etmek veya tanımlamak için faydalı olabilir [146,147].

UV-Vis spektrofotometrede birçok varyasyon olsa da, cihazın çalışma prensibine yönelik Şekil 3-33'de gösterilen ana bileşenleri ele alabiliriz.



Şekil 3-33 UV-Vis spektrofotometresindeki ana bileşenleri [147]

UV-Vis spektroskopi bilgisi, dalga boyunun bir fonksiyonu olarak absorbans, optik yoğunluk veya geçirgenliğin bir grafiği olarak sunulabilir. Bununla birlikte, bilgi genellikle dikey y ekseninde bir absorbans grafiği ve yatay x ekseninde dalga boyunun bir grafiği olarak sunulur. Bu grafik tipik olarak bir absorpsiyon spektrumu olarak adlandırılır [147].



Şekil 3-34 Tipik bir absorpsiyon spektrumu grafiği örneği [148]

Şekil 3-34'te farklı ton ve renk yoğunluğuna sahip yedi farklı kırmızı şarap örneğinin absorpsiyon spektrumları görülmektedir. Numuneler aynı karakteristik spektral özelliklere sahip olsada değişen absorbans değerleri üzerinden toplam fenol konsantrasyonlarındaki farklılıkların ölçümü yapılmaktadır [148].

UV-Vis Spektroskopi yöntemi ile gerçekleştirilen ölçümde Valerian Officinalis ekstraktı toplam fenol miktarı 9,7 mg (GAE)/g, HE 19,6 mg (GAE)/g olarak bulunmuştur.

Valerian Officinalis ve HE örneklerindeki toplam fenol miktarının belirlenmesi için Folin Ciocalteu toplam fenol metodu kullanılmıştır. Sırası ile:

- Analiz sırasında ekstraktlar öncelikle 50 mg/25 mL su içerisinde çözdürülmüştür.
- 1.5 mL %10'luk Folin reaktifi ile 200 µL örnek karıştırılmıştır.
- Karışıma 1.2 mL %7.5'lik Na_2CO_3 eklendi.
- Oda sıcaklığında 60 dakika inkübasyona bırakılan örnekler UV-spektrofotometre de 765 nm'de köre karşı ölçüm yapıldı.
- Sigma $\geq 98.0\%$ saflıkta gallik asit 10-500 ppm konsantrasyonları kullanılarak kalibrasyon çizgisi eğimi elde edilmiştir.

Toplam fenol miktarı mg (GAE)/gr kuru örnek cinsinden ifade edilmiştir [145].



Şekil 3-35 UV-Vis spektrofotometre cihazı

Analizlerde kullanılmış olan UV-1800 model Shimadzu UV-Vis Spektrofotometre cihazı Şekil 3-35'te görülmektedir.

3.8.3. Ekstraktların Kapsüllenmesi ve Kullanıma Hazır Hale Getirilmesi

Çalışma kapsamında ekstraktlar Vcaps Plus, bitkisel (HPMC – Hidroksipropil Metil Selüloz) yapıda, yaklaşık 500-1.000 mg toz ekstrakt kapasitesine sahip şeffaf kapsüller içerisine doldurulmuştur. Kapsüller midede çözünecek özelliktedirler. Bitkisel selülozdan yapılmışlardır ve kapsüllenmiş bitkilerin sindirimini ve emilimini engellemeyecek yapıdadırlar. Kapsülleri dolumu Şekil 3-36’da görüldüğü şekilde hijyen önlemleri kapsamında doldurulmuşlardır.



Şekil 3-36 Ekstraktların kapsüllenmesi ve kapsüllerin kutuları

Kapsüllerin standardize olmasına özen gösterilerek, Şekil 3-37’de görülen ve proje kapsamında alınan hassas terazi ile hassas ölçüm işlemi gerçekleştirilerek kapsül dolum işlemi tamamlanmıştır.



Şekil 3-37 Hassas terazi

3.9. İstatistiksel Analiz

Çalışmaya ait anket ve demografik veriler dijital ortama aktarılarak veriseti oluşturulmuştur. EEG sinyalleri Matlab R2017a üzerinden EEGLAB eklentisi aracılığıyla işlenerek analizleri gerçekleştirilmiş ve CSV sayısal halde kaydedilmişlerdir. Nörokimyasal seviyeleri ise Excel ortamında formüle edilen eğri aracılığıyla hesaplanmış ve sayısal olarak kaydedilmiştir.

Veri tabanının oluşturulması ile birlikte veri kümelerindeki hataların belirlenmesi, veri setlerinin daha iyi anlaşılması, aykırı değerleri veya anormal olayları tespit etme amacıyla görselleştirmeler yapılmıştır.

Ardından tüm veriler SPSS 21 istatistik programına manuel olarak girilmiştir. Aynı hayvanlardan yapılan uygulama öncesi ve sonrası gibi iki farklı zamanda tekrarlı elde edilen sayısal ölçüm değerlerinin analizinde örneklem grubu sayısı ve veri dağılımı gibi şartlar doğrultusunda nonparametrik istatistiksel test olan Wilcoxon's sign testi uygulanmıştır.

İki farklı grup olan HE ve VO gruplarından elde edilen değerlerin istatistiksel test uygulamasında ise yine örneklem grubu sayısı ve veri dağılımı gibi şartlar doğrultusunda nonparametrik istatistiksel test olan Mann-Whitney's U-test uygulanmıştır. Veriler bulgu tablolarında ortalama, $\pm$ standart sapma şeklinde özetlenmiş, istatistiksel anlamlılık sınırı $p < 0.05$ olarak alınmıştır.

Veri seti değişkenlerini ve aralarındaki ilişkiyi anlamaya yardımcı olmak amacıyla yine örneklem grubu sayısı ve veri dağılımı gibi şartlar doğrultusunda Spearman's rank korelasyon testi uygulanarak deney parametreleri arasında korelasyon katsayısı hesaplanması gerçekleştirilmiştir.



4. BULGULAR

Örneklem grubuna ait demografik veriler kapsamında yaş, ağırlık, cinsiyet ve ırk çeşitliliği bulguları grafikler ile desteklenerek alt başlıklarda paylaşılmıştır. Ayrıca genel muayene bulgularına ait bilgilendirme yapılmıştır.

HE ve VO gruplarında aynı ekstraktın öncesi ve sonrası kullanımı için davranış anketi, nörokimyasal seviyeler (kortizol, dopamin, serotonin), farklı frekans bantları (delta, teta, alfa, beta) ve elektrot lokasyonları için EEG spektral güç seviyesi verileri üzerindeki hipotez test sonuçlarına ait bulguların herbiri özel alt başlıklar altında verilmiştir. Alt başlıklarda bulunan bulgu tablolarında ekstraktların tüketimi öncesi ve sonrası için ilgili parametre değerlerindeki istatistiksel anlamlılığın ölçüldüğü Wilcoxon's sign testi sonuçları bütün hipotez tabloları üzerinde dikey yapıda gösterilmiştir. HE ve VO gruplarının deney öncesi parametre değerlerindeki standardizasyon analizi için ise Mann-Whitney's U-testi uygulanarak test sonuçları tablo üzerlerinde yatay konumda belirtilmiştir.

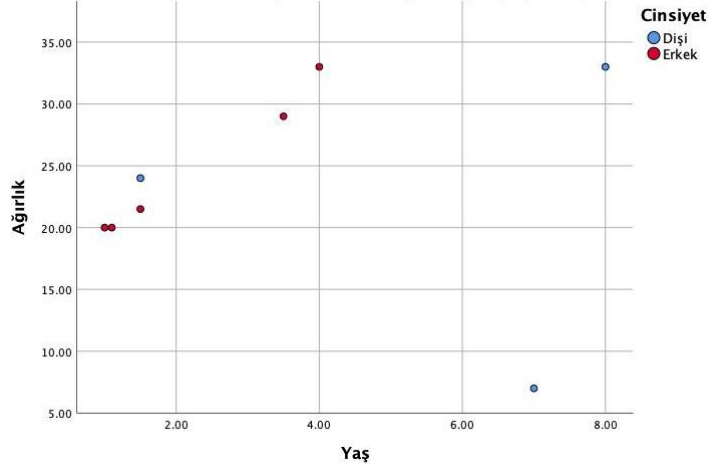
Uygulanmış olan hipotez test sonuçları (p değerleri) ile birlikte ilgili değerlere ait ortalama ile standart sapmalar bütün hipotez tablolarında mevcuttur. Çalışmamızda genel olarak $p < 0.05$ eşik değeri olarak alınmıştır. Tablo üzerinde p değerinin 0.05'ten küçük olduğu istatistiksel anlamlılık gösteren değerler ** ile belirtilmiştir.

Çalışma kapsamında ölçümleri yapılan parametreler arasında uygun kombinasyonlar oluşturularak Spearman's rank korelasyon testi sonucunda elde edilen korelasyon katsayıları da özel alt başlıklar altında tablo halinde verilmiştir.

4.1. Demografik Bulgular

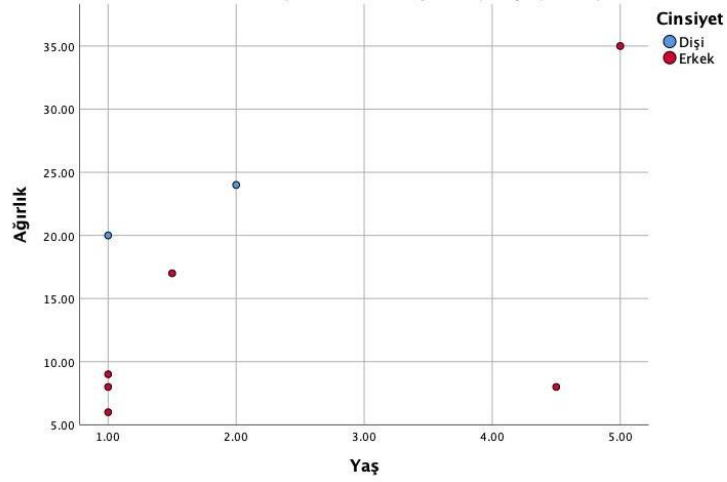
Anksiyete belirtileri gösteren toplam 16 adet köpek ile çalışma materyali kapsamında ilgili süreçler tamamlamıştır. HE ve VO olmak üzere her iki grupta da toplam 8 adet köpek ile çalışma gerçekleştirilmiştir.

HE grubuna ait yaş, ağırlık ve cinsiyet verilerinin uzayda dağılımı Şekil 4-1’de görselleştirilmiştir.



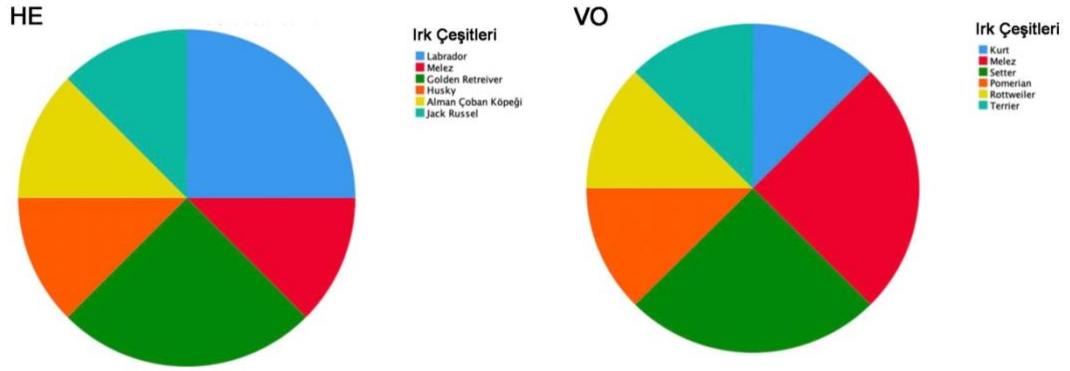
Şekil 4-1 HE grubuna ait cinsiyet, ağırlık ve yaş dağılımı

V.Officinalis grubuna ait yaş, ağırlık ve cinsiyet gibi verilerin ise uzayda dağılımı Şekil 4-2’de görselleştirilmiştir.



Şekil 4-2 VO grubuna ait cinsiyet, ağırlık ve yaş dağılımı

HE grubunda 2 Labrador, 1 Melez, 2 Golden Retriever, 1 Husky, 1 Alman Çoban Köpeği ve 1 Jack Russel ırkına dahil köpek bulunmaktadır. VO grubunda ise 1 Kurt, 2 Melez, 2 Setter, 1 Pomerian, 1 Rottweiler ve 1 Terrier cinsi köpek bulunmaktadır.



Şekil 4-3 Irk çeşitliliği

HE ve VO gruplarına ait ırk çeşitliliği dairesel grafik yöntemi ile Şekil 4-3'te görülmektedir.

4.2. Genel Muayene Bulguları

Çalışma materyalimiz olan, anksiyete şikayeti sebebiyle kliniğe başvuran köpeklerin sahiplerinden anamnez detayları dinlenildi ve davranışlar ile ilişkili olan anketler hasta sahiplerine doldurtuldu. HE (n=8) ve VO (n=8) olmak üzere toplam örneklem grubuna dahil köpeklerin (n=16) genel fiziksel muayenesinde herhangi bir anomali tespit edilmedi. Köpeklerin eş zamanlı herhangi bir ilaç kullanmadıkları teyit edildi. Anomali tespit edilen köpekler çalışmadan dışlandı.

4.3. Davranış Anketi Bulguları

HE ve VO gruplarında aynı ekstraktın öncesi ve sonrası kullanımı için davranış anketi verilerine yönelik hipotez test sonuçları Tablo 4-1'de mevcuttur.

Tablo 4-1 Anket verilerinin değerlendirilmesi

	Kontrol Günü	H.Erinaceus Ortalama ± Standart Sapma	V. Officinalis Ortalama ± Standart Sapma	Anlamlılık
Korku durumu	0.Gün	1.75 ± 0.886	1.875 ± 0.991	0.878
	28.Gün	0.875 ± 0.834	1.25 ± 1.035	0.505
Anlamlılık		0.038**	0.025**	
Aşırı aktivite	0.Gün	2 ± 1.309	2.5 ± 0.755	0.574
	28.Gün	1.125 ± 0.991	1.25 ± 0.707	0.645
Anlamlılık		0.059	0.026**	
İnsanlara yönelik saldırganlık	0.Gün	1.125 ± 1.356	1.25 ± 1.488	0.878
	28.Gün	0.625 ± 0.916	1.125 ± 1.356	0.505
Anlamlılık		0.102	0.655	
Köpeklerle veya diğer hayvanlara yönelik saldırganlık	0.Gün	1.75 ± 1.281	1.375 ± 1.407	0.645
	28.Gün	1 ± 0.925	0.75 ± 1.035	0.574
Anlamlılık		0.063	0.102	
Nefes nefese kalma durumu	0.Gün	1.625 ± 1.06	0.75 ± 1.164	0.130
	28.Gün	0.875 ± 1.125	0.5 ± 0.755	0.574
Anlamlılık		0.107	0.577	
Aşırı havlama, uluma	0.Gün	1 ± 1.195	2 ± 1.309	0.161
	28.Gün	0.5 ± 0.755	0.625 ± 0.517	0.574
Anlamlılık		0.257	0.020**	
Çevresindeki nesnelere zarar verme	0.Gün	1.125 ± 1.552	0.625 ± 0.916	0.645
	28.Gün	0.5 ± 0.755	0.25 ± 0.707	0.505
Anlamlılık		0.197	0.180	
Uygunsuz idrar/dışkı yapımı (ev kirliliği)	0.Gün	0.75 ± 0.886	0.75 ± 1.164	0.878
	28.Gün	1.250 ± 0.353	0.25 ± 0.462	0.721
Anlamlılık		0.059	0.102	
Cinsel davranış sorunları	0.Gün	0.25 ± 0.462	0.5 ± 1.069	0.659
	28.Gün	0.25 ± 0.707	0.125 ± 0.353	0.959
Anlamlılık		1	0.180	
Kaprofaji (dışkı yenilmesi)	0.Gün	1.25 ± 1.488	0.625 ± 1.06	0.505
	28.Gün	0.25 ± 0.707	0.125 ± 0.353	0.959
Anlamlılık		0.063	0.102	
Başıboşluk	0.Gün	1.75 ± 1.164	1.750 ± 1.035	1
	28.Gün	0.75 ± 0.886	0.625 ± 1.06	0.721
Anlamlılık		0.046**	0.024**	
Utangaçlık	0.Gün	0.875 ± 1.246	1 ± 1.195	0.798
	28.Gün	0.25 ± 0.462	0.625 ± 1.187	0.878
Anlamlılık		0.131	0.180	
Kendi kendine zarar verme	0.Gün	0.25 ± 0.707	0.125 ± 0.353	0.959
	28.Gün	0.375 ± 1.069	0 ± 0	0.721
Anlamlılık		0.317	0.317	
Aşırı tükürük salgısı	0.Gün	1 ± 1.069	0.125 ± 0.353	0.83
	28.Gün	0.5 ± 1.069	0.25 ± 0.462	0.959
Anlamlılık		0.102	0.564	
Yemek yememe durumu	0.Gün	0.375 ± 0.517	0.125 ± 0.353	0.442
	28.Gün	0.25 ± 0.462	0 ± 0	0.442
Anlamlılık		0.317	0.317	

HE tüketen örneklem grubuna ait korku ($p=0.038$) ve başıboşluk ($p=0.046$) davranış skorlarına ait öncesi ve sonrası karşılaştırmasında Wilcoxon's sign testi sonucunda anlamlı olarak azalma gözlemlenmiştir.

VO tüketen örneklem grubuna ait korku ($p=0.025$), aşırı aktivite ($p=0.026$), aşırı havlama ($p=0.020$) ve başıboşluk ($p=0.024$) davranış skorlarına öncesi ve sonrası karşılaştırmasında yine Wilcoxon's sign testi sonucunda anlamlı olarak azalma gözlemlenmiştir.

HE ve VO gruplarında, ekstrakt kullanımı öncesi ve sonrasında birbirleri ile yapılan Mann–Whitney's U-testinde herhangi bir davranış maddesine ait skor arasında istatistiksel anlamlılık tespit edilmemiştir. Bu, örneklem gruplarındaki standardizasyonun sağlandığını destekleyen bir göstergedir.

4.4. Nörokimyasal Seviyelere ait Bulgular

HE ve VO gruplarında aynı ekstraktın öncesi ve sonrası kullanımı için Nörokimyasal seviyelere (kortizol, dopamin, serotonin) verilerine yönelik uygulanmış olan hipotez test sonuçları Tablo 4-2'de mevcuttur.

Tablo 4-2 Nörokimyasal seviyelere ait bulgular

	Kontrol Günü	H.Erinaceus Ortalama $\pm$ Standart Sapma	V. Officinalis Ortalama $\pm$ Standart Sapma	Anlamlılık
Kortizol	0.Gün	3.41 $\pm$ 0.84	4.18 $\pm$ 2.04	0.248
	28.Gün	3.51 $\pm$ 0.60	3.17 $\pm$ 0.42	0.207
Anlamlılık		0.401	0.327	
Dopamin	0.Gün	201.23 $\pm$ 81.14	204.83 $\pm$ 83.33	0.753
	28.Gün	221.84 $\pm$ 84.23	129.97 $\pm$ 40.09	0.009**
Anlamlılık		0.161	0.025**	
Serotonin	0.Gün	7.77 $\pm$ 1.39	7.55 $\pm$ 2.09	0.672
	28.Gün	4.74 $\pm$ 1.74	6.61 $\pm$ 2.67	0.207
Anlamlılık		0.017**	0.326	

Tablo 4-2'deki bulgular kortizol, dopamin ve serotonin için herbir özel başlık altında aşağıda açıklanmıştır.

4.4.1. Kortizol

HE veya VO gruplarından herhangi birinde kortizol seviyesine ait değerlerin Wilcoxon's sign ve Mann–Whitney's U test uygulamalarında istatistiksel anlamlılık ($p<0.05$) tespit edilememiştir.

Mann–Whitney’s U test uygulamalarında istatistiksel anlamlılık bulunmaması durumu örneklem gruplarındaki standardizasyonun sağlandığını destekleyen bir göstergedir.

4.4.2. Dopamin

VO tüketen örneklem grubuna ait dopamin ($p=0.025$) değerlerine ait öncesi ve sonrası karşılaştırmasında Wilcoxon’s sign testi sonucunda anlamlı azalma gözlemlenmiştir. HE grubunda istatistiksel anlamlılık tespit edilememiştir.

HE ve VO gruplarında, ekstrakt kullanımı öncesi ve sonrasında birbirleri ile yapılan Mann–Whitney’s U-testinde yalnızca 28. Gün dopamin ($p=0.009$) seviyesi ölçüm değerlerinde istatistiksel anlamlılık gözlemlenmiştir. İstatistiksel anlamlılık durumu ile ilk ölçüm değerlerinde (0. Gün) karşılaşılmaması sebebiyle örneklem grubunda standardizasyonun sağlanması desteklenmiştir.

28. gün ölçümlerinde iki grup arasındaki istatistiksel anlamlılık durumu nedeniyle HE ve VO kullanımının dopamin seviyesinde birbirlerinden farklı etkilerde bulunduğu anlamı çıkarılabilir.

4.4.3. Serotonin

HE tüketen örneklem grubuna ait serotonin ($p=0.017$) değerlerine ait öncesi ve sonrası karşılaştırmasında Wilcoxon’s sign testi sonucunda anlamlı azalma gözlemlenmiştir. VO grubunda istatistiksel anlamlılık tespit edilememiştir.

Ayrıca Mann–Whitney’s U test uygulamalarında istatistiksel anlamlılık ($p<0.05$) tespit edilememiştir. Mann–Whitney’s U test uygulamalarında istatistiksel anlamlılık bulunmaması durumu örneklem gruplarındaki standardizasyonun sağlandığını destekleyen bir göstergedir.

4.5. EEG Bulguları

EEG bulgularında HE ve VO grupları için delta, teta, alfa ve beta olmak üzere herbir frekans bandı ve elektrotların konumları da ayrı ayrı dikkate alınmıştır. Bu sebeple EEG bulguları herbir frekans bandı başlığı altında özel olarak ekstrakt kullanım grupları ve lokasyonlar dikkate alınarak tablo haline getirilmiş, güç spektrum değerleri arasındaki ilişkilerin istatistiksel anlamlılıkları belirtilmiştir.

EEG bulgularına ait alt başlıklarda EEG spektral gücü mutlak ($10 \cdot \log_{10}(\mu v^2/Hz)$) cinsinden HE ve VO için ortalama ve standart sapma değerleri ile birlikte ilgili bantlarının her biri için tablolarda paylaşılmıştır.

HE ve VO gruplarında aynı ekstraktın öncesi ve sonrası kullanımında farklı frekans bantları ve elektrot lokasyonları için EEG spektral güç seviyesi verileri üzerinden uygulanmış olan hipotez test sonuçları (p değerleri) ile birlikte ilgili değerlere ait ortalama ile standart sapmalar her bir frekans bandına ait alt başlıktaki tabloda mevcuttur.

4.5.1. Delta Frekansı

HE ve VO gruplarında aynı ekstraktın öncesi ve sonrası kullanımı için F3, F4, Cz, T3, T4 Elektrot noktalarında EEG Delta frekansı güç spektrumu verilerine ait test ve analiz bilgileri Tablo 4-3'te mevcuttur.

Tablo 4-3 Delta frekansına ait bulgular

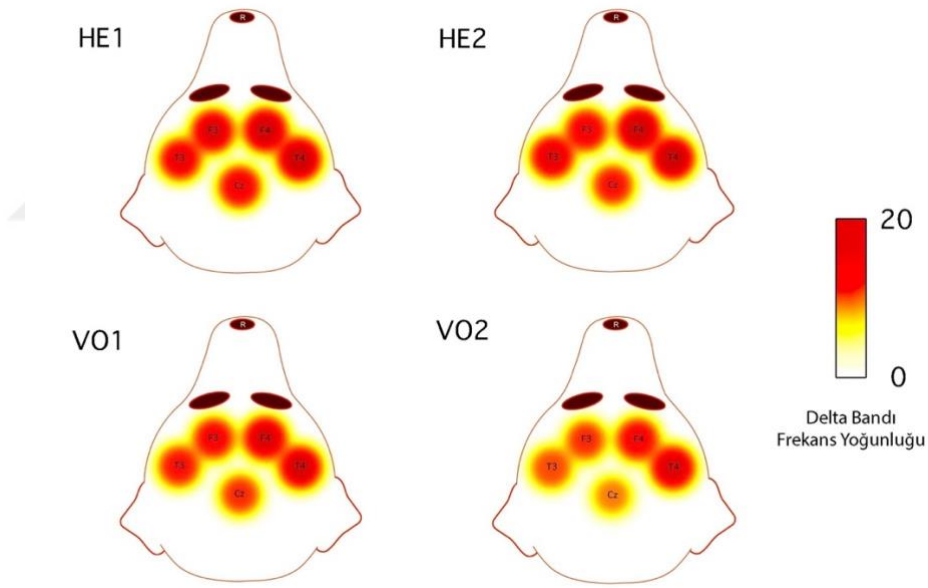
Delta	Kontrol Günü	H.Erinaceus Ortalama $\pm$ Standart Sapma	V. Officinalis Ortalama $\pm$ Standart Sapma	Anlamlılık
F3	0.Gün	19.09 $\pm$ 8.82	14.51 $\pm$ 6.47	0.208
	28.Gün	16.62 $\pm$ 3.61	10.88 $\pm$ 3.48	.012**
Anlamlılık		0.108	0.070	
F4	0.Gün	20.82 $\pm$ 5.52	18.59 $\pm$ 4.30	0.529
	28.Gün	19.95 $\pm$ 2.30	15.91 $\pm$ 3.66	.027**
Anlamlılık		0.679	0.070	
T3	0.Gün	17.02 $\pm$ 8.55	13.80 $\pm$ 6.73	0.401
	28.Gün	17.15 $\pm$ 5.42	10.57 $\pm$ 3.68	0.046**
Anlamlılık		0.437	0.096	
T4	0.Gün	21.84 $\pm$ 4.24	19.68 $\pm$ 4.00	0.462
	28.Gün	21.22 $\pm$ 2.15	17.44 $\pm$ 3.13	0.027**
Anlamlılık		0.534	0.139	
Cz	0.Gün	16.43 $\pm$ 8.52	11.95 $\pm$ 6.05	0.248
	28.Gün	12.99 $\pm$ 6.18	8.95 $\pm$ 4.00	0.074
Anlamlılık		0.078	0.593	

HE veya VO gruplarından herhangi birinde Delta frekansı güç spektrumu seviyesine ait değerlerin Wilcoxon's sign ve Mann-Whitney's U test uygulamalarında istatistiksel anlamlılık değeri ($p < 0.05$) tespit edilememiştir.

HE ve VO gruplarında, ekstrakt kullanımı öncesi ve sonrasında gruplar arasında birbirleri ile yapılan Mann–Whitney’s U-testinde 28. Günde F3(p=0.012), F4(p=0.027), T3(p=0.046), T4(p=0.027) lokasyonlarında Delta frekansı güç spektrumu seviyesi ölçüm değerlerinde istatistiksel anlamlılık gözlemlenmiştir. İstatistiksel anlamlılık durumu ile ilk ölçüm değerlerinde(0. Gün) karşılaşılmaması sebebiyle örneklem grubunda standardizasyonun sağlanması desteklenmiştir.

28. gün ölçümlerinde iki grup arasındaki istatistiksel anlamlılık durumu nedeniyle HE ve VO kullanımının EEG Delta frekans bandında F3, F4, T3, T4 lokasyonlarında birbirlerinden farklı etkilerde bulunduğu anlamı çıkarılabilir.

Delta frekansında HE ve VO kullanımına ait değişimler EEG Topografik Harita metoduyla Şekil 4-4’te görüntülenmiştir.



Şekil 4-4 HO ve VO öncesi ile sonrası Delta PSD topografik haritası

4.5.2. Teta Frekansı

HE ve VO gruplarında aynı ekstraktın öncesi ve sonrası kullanımı için F3, F4, Cz, T3, T4 Elektrot noktalarında EEG Teta frekansı güç spektrumu verilerine ait test ve analiz bilgileri Tablo 4-4’te mevcuttur.

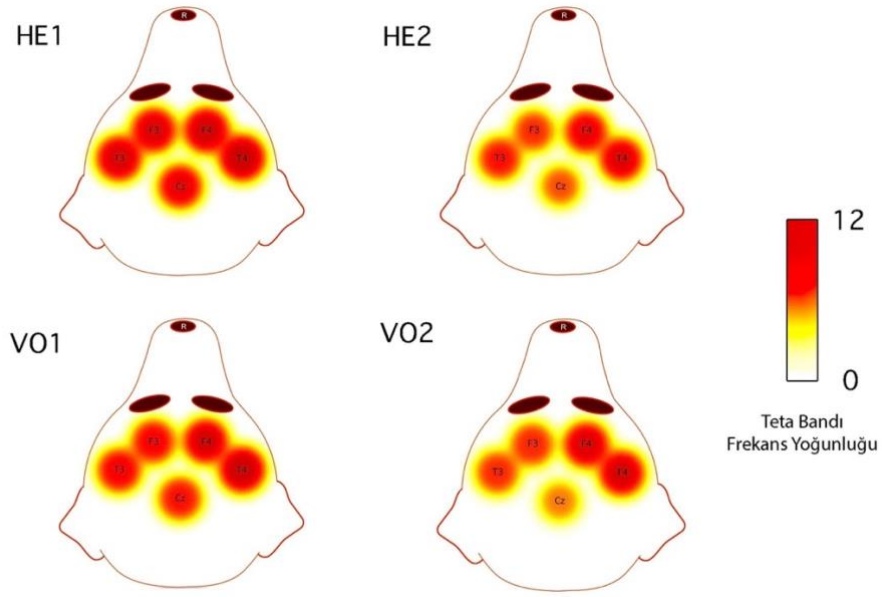
Tablo 4-4 Teta frekansına ait bulgular

Teta	Kontrol Günü	H.Erinaceus Ortalama $\pm$ Standart Sapma	V. Officinalis Ortalama $\pm$ Standart Sapma	Anlamlılık
F3	0.Gün	11.96 $\pm$ 7.92	7.82 $\pm$ 5.50	0.529
	28.Gün	6.72 $\pm$ 3.78	5.92 $\pm$ 3.80	1
Anlamlılık		0.011**	0.234	
F4	0.Gün	12.96 $\pm$ 4.45	10.09 $\pm$ 5.28	0.529
	28.Gün	9.89 $\pm$ 2.90	10.10 $\pm$ 4.38	0.916
Anlamlılık		0.030**	0.877	
T3	0.Gün	9.83 $\pm$ 7.30	7.60 $\pm$ 5.96	0.529
	28.Gün	6.53 $\pm$ 5.90	5.31 $\pm$ 4.48	0.462
Anlamlılık		0.034**	0.796	
T4	0.Gün	14.06 $\pm$ 3.06	12.39 $\pm$ 4.07	0.916
	28.Gün	11.06 $\pm$ 2.89	11.32 $\pm$ 3.76	0.674
Anlamlılık		0.005**	0.330	
Cz	0.Gün	8.88 $\pm$ 8.34	6.15 $\pm$ 4.63	0.401
	28.Gün	4.44 $\pm$ 6.23	3.50 $\pm$ 5.25	0.834
Anlamlılık		0.010**	0.330	

HE tüketen örneklem grubuna ait F3(p=0.011), F4(p=0.030), Cz(p=0.034), T3(p=0.005), T4(p=0.010) değerlerine ait öncesi ve sonrası karşılaştırmasında Wilcoxon's sign testi sonucunda anlamlı azalma (p<0.05) tespit edilmiştir. VO grubunda istatistiksel anlamlılık tespit .

Ayrıca Mann–Whitney's U test uygulamalarında istatistiksel anlamlılık (p<0.05) tespit edilememiştir. Mann–Whitney's U test uygulamalarında istatistiksel anlamlılık bulunmaması durumu örneklem gruplarındaki standardizasyonun sağlandığını destekleyen bir göstergedir.

Teta frekansında HE ve VO kullanımına ait değişimler EEG Topografik Harita metoduyla Şekil 4-5'te görüntülenmiştir.



Şekil 4-5 HO ve VO öncesi ile sonrası Teta PSD topografik haritası

4.5.3. Alfa Frekansı

HE ve VO gruplarında aynı ekstraktın öncesi ve sonrası kullanımı için F3, F4, Cz, T3, T4 Elektrot noktalarında EEG Alfa frekansı güç spektrumu verilerine ait test ve analiz bilgileri Tablo 4-5'te mevcuttur.

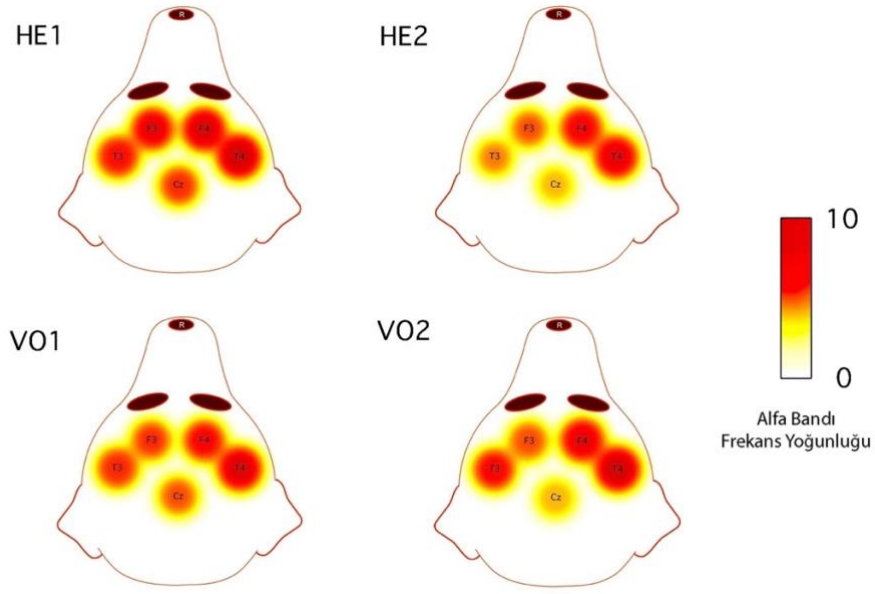
Tablo 4-5 Alfa Frekansına ait bulgular

Alfa	Kontrol Günü	H.Erinaceus Ortalama $\pm$ Standart Sapma	V. Officinalis Ortalama $\pm$ Standart Sapma	Anlamlılık
F3	0.Gün	8.26 $\pm$ 7.60	5.14 $\pm$ 5.58	.529
	28.Gün	4.077 $\pm$ 3.25	4.70 $\pm$ 4.33	.916
Anlamlılık		0.02**	.569	
F4	0.Gün	9.34 $\pm$ 4.04	7.37 $\pm$ 5.12	.674
	28.Gün	7.23 $\pm$ 2.55	8.74 $\pm$ 4.85	.528
Anlamlılık		0.162	.959	
T3	0.Gün	6.08 $\pm$ 6.78	5.73 $\pm$ 5.59	.834
	28.Gün	3.37 $\pm$ 5.58	3.78 $\pm$ 4.28	.834
Anlamlılık		0.049**	.534	
T4	0.Gün	10.35 $\pm$ 3.04	10.18 $\pm$ 4.01	.834
	28.Gün	8.57 $\pm$ 2.75	9.94 $\pm$ 4.17	.462
Anlamlılık		.234	.637	
Cz	0.Gün	5.32 $\pm$ 7.74	4.32 $\pm$ 4.54	.600
	28.Gün	2.03 $\pm$ 6.25	1.91 $\pm$ 5.14	.834
Anlamlılık		.070	.777	

HE tüketen örneklem grubuna ait F3(p=0.002), T3(p=0.049) yani sol elektrot bölgesi değerlerine ait öncesi ve sonrası karşılaştırmasında Wilcoxon's sign testi sonucunda anlamlı azalma (p<0.05) tespit edilmiştir. VO grubunda istatistiksel anlamlılık tespit edilememiştir.

Ayrıca Mann–Whitney's U test uygulamalarında istatistiksel anlamlılık (p<0.05) tespit edilememiştir. Mann–Whitney's U test uygulamalarında istatistiksel anlamlılık bulunmaması durumu örneklem gruplarındaki standardizasyonun sağlandığını destekleyen bir göstergedir.

Alfa frekansında HE ve VO kullanımına ait değişimler EEG Topografik Harita metoduyla Şekil 4-6'da görüntülenmiştir.



Şekil 4-6 HO ve VO öncesi ile sonrası Alfa PSD topografik haritası

4.5.4. Beta Frekansı

HE ve VO gruplarında aynı ekstraktın öncesi ve sonrası kullanımı için F3, F4, Cz, T3, T4 Elektrot noktalarında EEG Alfa frekansı güç spektrumu verilerine ait test ve analiz bilgileri Tablo 4-6'da mevcuttur.

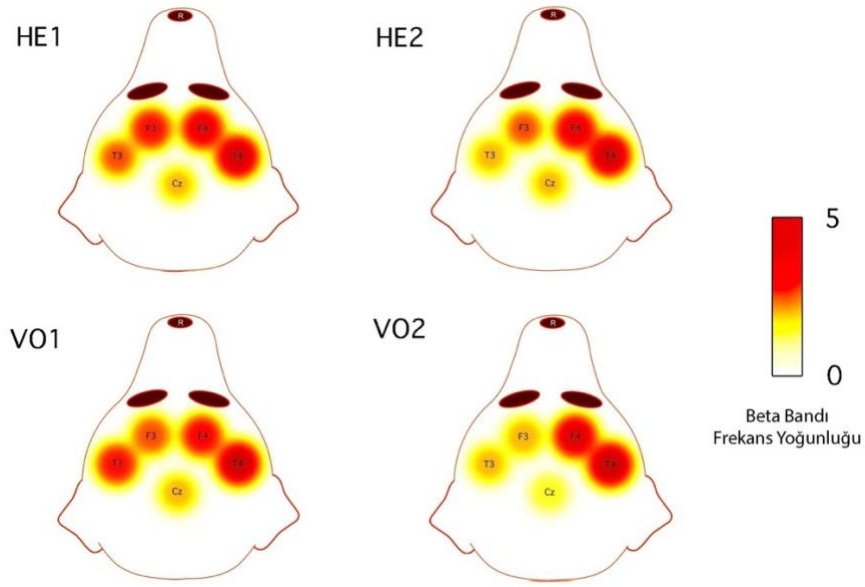
Tablo 4-6 Beta frekansına ait bulgular

Beta	Kontrol Günü	H.Erinaceus Ortalama ± Standart Sapma	V. Officinalis Ortalama ± Standart Sapma	Anlamlılık
F3	0.Gün	3.99 ± 6.78	2.73 ± 5.51	.916
	28.Gün	2.01 ± 2.42	1.88 ± 5.04	.917
Anlamlılık		.325	.534	
F4	0.Gün	4.97± 3.93	3.53 ± 5.37	.248
	28.Gün	4.69± 1.90	5.95 ± 5.35	.674
Anlamlılık		.234	.214	
T3	0.Gün	2.19 ± 6.02	3.32 ± 6.15	.834
	28.Gün	1.27 ± 4.55	0.77 ± 4.62	.753
Anlamlılık		.534	.407	
T4	0.Gün	6.00 ± 3.16	7.31 ± 4.85	.529
	28.Gün	5.81 ± x2.09	7.09 ± 4.76	.400
Anlamlılık		.255	1	
Cz	0.Gün	1.07 ± 7.28	1.60 ± 5.19	.916
	28.Gün	1.71 ± 4.99	0.84 ± 5.00	.674
Anlamlılık		.108	.796	

HE veya VO gruplarından herhangi birinde Alfa frekansı güç spektrumu seviyesine ait değerlerin Wilcoxon's sign ve Mann–Whitney's U test uygulamalarında istatistiksel anlamlılık ($p<0.05$) tespit edilememiştir.

Ayrıca Mann–Whitney's U test uygulamalarında istatistiksel anlamlılık ($p<0.05$) tespit edilememiştir. Mann–Whitney's U test uygulamalarında istatistiksel anlamlılık bulunmaması durumu örneklem gruplarındaki standardizasyonun sağlandığını destekleyen bir göstergedir.

Alfa frekansında HE ve VO kullanımına ait değişimler EEG Topografik Harita metoduyla Şekil 4-7'de görüntülenmiştir.



Şekil 4-7 HO ve VO öncesi ile sonrası Beta PSD topografik haritası

4.6. Bulgulara ait Korelasyon Analizleri

Çalışma kapsamında HE ve VO gruplarına ait delta, teta, alfa ve beta bantlarındaki EEG verileri, kortizol, serotonin, dopamin seviyeleri, davranış skorları ve demografik verilerin farklı kombinasyonlar şeklinde gerçekleştirilmiş Spearman korelasyon testlerine korelasyon katsayıları aşağıdaki tablolarda paylaşılmıştır.

EEG delta frekans bandına ait spektral güç analiz verileri ve anket skorları arasındaki Spearman korelasyon katsayıları Tablo 4-7’de görülmektedir.

Tablo 4-7 Anket-EEG Delta bandı PSD korelasyonu

	Delta F3	Delta F4	Delta Cz	Delta T3	Delta T4
Korku	-.017	-.088	.013	-.086	-.152
Aşırı aktivite	-.168	-.145	-.103	-.256	-.100
İnsanlara yönelik saldırganlık	-.234	-.233	-.116	-.140	-.194
Köpeklerle veya diğer hayvanlara yönelik saldırganlık	.234	.246	.139	.106	.164
Nefes nefese kalma durumu	.276	.216	.290	.196	.284
Aşırı havlama, uluma	-.231	-.223	-.179	-.178	-.130
Çevresindeki nesnelere zarar verme	.265	.343	.211	.118	.235
Uygunsuz idrar/dışkı yapımı (ev kirliliği)	-.174	-.166	.124	-.064	-.169
Cinsel davranış sorunları	-.056	-.074	.128	-.027	-.067
Kaprofaji (dışkı yenilmesi)	.058	.199	.103	.152	.174
Başiboşluk	.443*	.401*	.514**	.397*	.308
Utangaçlık	.012	-.040	-.118	-.203	-.076
Kendi kendine zarar verme	-.245	-.134	-.166	-.313	-.166
Aşırı tükürük salgısı	-.123	-.140	-.087	-.143	-.126
Yemek yememe durumu	.330	.304	.364*	.278	.252

Başiboşluk ile delta bandında Cz lokasyonu yüksek pozitif korelasyon katsayısına sahipken, F3, F4 ve T3 lokasyonları da pozitif korelasyon katsayısına sahiptirler. Ayrıca yine yemek yememe durumu ile delta bandında Cz lokasyonu ile pozitif korelasyon mevcuttur.

EEG teta frekans bandına ait spektral güç analiz verileri ve anket skorları arasındaki Spearman korelasyon katsayıları Tablo 4-8’de görülmektedir.

Tablo 4-8 Anket-EEG Teta bandı PSD korelasyonu

	Teta F3	Teta F4	Teta Cz	Teta T3	Teta T4
Korku	-.074	-.254	-.026	-.194	-.302
Aşırı aktivite	-.250	-.220	-.233	-.253	-.071
İnsanlara yönelik saldırganlık	-.205	-.196	-.168	-.141	-.236
Köpeklerle veya diğer hayvanlara yönelik saldırganlık	.288	.238	.186	.113	.106
Nefes nefese kalma durumu	.073	-.099	.141	.079	-.082
Aşırı havlama, uluma	-.224	-.143	-.179	-.136	.029
Çevresindeki nesnelere zarar verme	.210	.171	.145	.036	.028
Uygunsuz idrar/dışkı yapımı (ev kirliliği)	-.163	-.232	.032	-.078	-.263
Cinsel davranış sorunları	-.152	-.190	-.050	-.076	-.244
Kaprofaji (dışkı yenilmesi)	.070	.282	.112	.207	.268
Başıboşluk	.442*	.206	.502**	.351*	.077
Utangaçlık	-.064	-.233	-.156	-.251	-.117
Kendi kendine zarar verme	-.275	-.219	-.276	-.317	-.274
Aşırı tükürük salgısı	-.176	-.177	-.241	-.192	-.234
Yemek yememe durumu	.304	.234	.321	.295	.156

Başıboşluk ile teta bandında Cz lokasyonu yüksek pozitif korelasyon katsayısına sahipken, F3 ve T3 lokasyonları da pozitif korelasyon katsayısına sahiptirler.

EEG teta frekans bandına ait spektral güç analiz verileri ve anket skorları arasındaki Spearman korelasyon katsayıları Tablo 4-9’de görülmektedir.

Tablo 4-9 Anket-EEG Alfa bandı PSD korelasyonu

	Alfa F3	Alfa F4	Alfa Cz	Alfa T3	Alfa T4
Korku	-.116	-.174	-.047	-.177	-.365*
Aşırı aktivite	-.400*	-.392*	-.300	-.330	-.086
İnsanlara yönelik saldırganlık	-.265	-.318	-.211	-.230	-.221
Köpeklerle veya diğer hayvanlara yönelik saldırganlık	.255	.130	.137	.048	.090
Nefes nefese kalma durumu	-.096	-.297	-.015	-.062	-.209
Aşırı havlama, uluma	-.339	-.266	-.146	-.154	.060
Çevresindeki nesnelere zarar verme	.137	.089	.151	.005	-.064
Uygunsuz idrar/dışkı yapımı (ev kirliliği)	-.213	-.260	.012	-.109	-.346
Cinsel davranış sorunları	-.183	-.312	-.153	-.189	-.207
Kaprofaji (dışkı yenilmesi)	.044	.263	.185	.258	.114
Başboşluk	.358*	.155	.441*	.304	-.008
Utangaçlık	-.083	-.119	-.077	-.155	-.109
Kendi kendine zarar verme	-.298	-.229	-.261	-.316	-.199
Aşırı tükürük salgısı	-.204	-.249	-.307	-.211	-.240
Yemek yememe durumu	.278	.095	.182	.208	.147

Korku ile alfa bandında T4 lokasyonu negatif korelasyon katsayısına sahipken aşırı aktivite ile F3 ve F4 lokasyonları da negatif korelasyon katsayısına sahiptirler. Ayrıca başboşluk ile alfa bandında F3 ve Cz lokasyonlarında pozitif korelasyon mevcuttur.

EEG beta frekans bandına ait spektral güç analiz verileri ve anket skorları arasındaki Spearman korelasyon katsayıları Tablo 4-10’da görülmektedir.

Tablo 4-10 Anket-EEG Beta bandı PSD korelasyonu

	Beta F3	Beta F4	Beta Cz	Beta T3	Alfa T4
Korku	-.161	-.362*	-.101	-.166	-.319
Aşırı aktivite	-.385*	-.453**	-.299	-.350*	-.272
İnsanlara yönelik saldırganlık	-.395*	-.358*	-.301	-.298	-.522**
Köpeklerle veya diğer hayvanlara yönelik saldırganlık	.127	-.112	-.038	-.026	-.215
Nefes nefese kalma durumu	-.237	-.396*	-.162	-.133	-.432*
Aşırı havlama, uluma	-.388*	-.313	-.135	-.200	-.237
Çevresindeki nesnelere zarar verme	.067	-.166	-.010	-.089	-.187
Uygunsuz idrar/dışkı yapımı (ev kirliliği)	-.261	-.307	.058	-.129	-.404*
Cinsel davranış sorunları	-.235	-.323	-.166	-.185	-.358*
Kaprofaji (dışkı yenilmesi)	.068	.172	.154	.180	.052
Başboşluk	.309	-.142	.434*	.325	-.096
Utangaçlık	-.121	-.187	-.118	-.200	.028
Kendi kendine zarar verme	-.271	-.177	-.249	-.327	-.169
Aşırı tükürük salgısı	-.289	-.233	-.324	-.252	-.338
Yemek yememe durumu	.225	.069	.147	.173	-.009

Beta bandında F3 lokasyonu aşırı aktivite, insanlara yönelik saldırganlık ve aşırı havlama, uluma ile negatif korelasyona sahiptir. F4 lokasyonu aşırı aktivite ile yüksek negatif korelasyona sahipken, korku, insanlara yönelik saldırganlık ve nefes nefese kalma durumu ile de negatif korelasyon katsayısına sahiptir. T4 lokasyonu da insanlara yönelik saldırganlık ile yüksek negatif korelasyona sahipken, nefes nefese kalma, uygunsuz idrar/dışkı yapımı ve cinsel davranış sorunları ile negatif korelasyon katsayısına sahiptir. T3 katsayısı ise aşırı aktivite ile negatif korelasyona sahipken Cz lokasyonu başboşluk ile pozitif korelasyon katsayısına sahiptir.

EEG delta frekans bandına ait spektral güç analiz verileri ile dopamin, serotonin ve kortizol arasındaki Spearman korelasyon katsayıları Tablo 4-11’de görülmektedir.

Tablo 4-11 EEG Delta PSD-Nörokimyasal korelasyon

	Dopamin	Serotonin	Kortizol
Delta F3	.272	.043	-.182
Delta F4	.279	.046	-.186
Delta Cz	.260	.096	-.163
Delta T3	.316	.047	-.330
Delta T4	.187	.006	-.227

Delta bandına ait herhangi bir lokasyon ile nörokimyasal değerler arasında anlamlı bir korelasyon tespit edilememiştir.

EEG teta frekans bandına ait spektral güç analiz verileri ile dopamin, serotonin ve kortizol arasındaki Spearman korelasyon katsayıları Tablo 4-12’de görülmektedir.

Tablo 4-12 EEG Teta PSD-Nörokimyasal korelasyon

	Dopamin	Serotonin	Kortizol
Teta F3	.170	.151	-.256
Teta F4	.132	.248	-.253
Teta Cz	.221	.099	-.221
Teta T3	.189	.110	-.371*
Teta T4	-.065	.103	-.282

Teta bandında T3 lokasyonu ile kortizol seviyesi arasında negatif korelasyon katsayısı mevcuttur.

EEG alfa frekans bandına ait spektral güç analiz verileri ile dopamin, serotonin ve kortizol arasındaki Spearman korelasyon katsayıları Tablo 4-13’de görülmektedir.

Tablo 4-13 EEG Alfa PSD-Nörokimyasal korelasyon

	Dopamin	Serotonin	Kortizol
Alfa F3	.230	.104	-.213
Alfa F4	.134	.146	-.291
Alfa Cz	.180	.053	-.241
Alfa T3	.192	.055	-.372*
Alfa T4	-.156	-.035	-.238

Alfa bandında T3 lokasyonu ile kortizol seviyesi arasında negatif korelasyon katsayısı mevcuttur.

EEG beta frekans bandına ait spektral güç analiz verileri ile dopamin, serotonin ve kortizol arasındaki Spearman korelasyon katsayıları Tablo 4-14’te görülmektedir.

Tablo 4-14 EEG Beta PSD-Nörokimyasal korelasyon

	Dopamin	Serotonin	Kortizol
Beta F3	.212	.097	-.138
Beta F4	.015	-.002	-.310
Beta Cz	.111	.104	-.201
Beta T3	.249	.031	-.263
Beta T4	-.138	-.152	-.171

Beta bandına ait herhangi bir lokasyon ile nörokimyasal değerler arasında anlamlı bir korelasyon tespit edilememiştir.

Anket skorları ile dopamin, serotonin ve kortizol arasındaki Spearman korelasyon katsayıları Tablo 4-15’te görülmektedir.

Tablo 4-15 Nörokimyasal-Anket verileri korelasyonu

	Dopamin	Serotonin	Kortizol
Korku	.191	.113	.163
Aşırı aktivite	-.103	.361*	.321
İnsanlara yönelik saldırganlık	-.130	.356*	-.035
Köpeklerle veya diğer hayvanlara yönelik saldırganlık	.178	.309	.002
Nefes nefese kalma durumu	-.227	.103	.080
Aşırı havlama, uluma	-.200	.297	.127
Çevresindeki nesnelere zarar verme	-.131	-.068	-.052
Uygunsuz idrar/dışkı yapımı (ev kirliliği)	.055	.211	.196
Cinsel davranış sorunları	.207	.270	.279
Kaprofaji (dışkı yenilmesi)	.117	.182	.152
Başboşluk	.156	.070	-.081
Utangaçlık	-.005	-.200	.020
Kendi kendine zarar verme	-.199	.011	.359*
Aşırı tükürük salgısı	-.147	-.083	.046
Yemek yememe durumu	.321	-.013	.052

Serotonin seviyesi aşırı aktivite ve insanlara yönelik saldırganlık ile pozitif korelasyon katsayısına sahip ve Kortizol seviyesi ise kendi kendine zarar verme davranışı ile pozitif korelasyon katsayısına sahiptir.

Örnekleme grubundaki dişi ve erkek köpekler için demografik (yaş, ağırlık) verileri ile anket skorları arasında uygulanan Spearman korelasyon testine ait korelasyon katsayıları aşağıdaki Tablo 4-16 ve Tablo 4-17’de görülmektedir.

Tablo 4-16 Demografik veriler ile Anket korelasyonu (dişi)

<i>Dişi</i>	Yaş	Ağırlık
Korku	.878**	.464
Aşırı aktivite	-.183	.140
İnsanlara yönelik saldırganlık	.107	-.219
Köpeklerle veya diğer hayvanlara yönelik saldırganlık	.160	-.219
Nefes nefese kalma durumu	.539	.513
Aşırı havlama, uluma	.170	-.408
Çevresindeki nesnelere zarar verme	.661*	.407
Uygunsuz idrar/dışkı yapımı (ev kirliliği)	.746*	.507
Cinsel davranış sorunları	-.471	.242
Kaprofaji (dışkı yenilmesi)	.581	-.060
Başıboşluk	.426	.178
Utangaçlık	.331	.889**
Kendi kendine zarar verme	.703*	.721*
Aşırı tükürük salgısı	.481	.713*
Yemek yememe durumu	-.471	.242

Dişi köpeklerde yaş, korku yüksek pozitif korelasyon katsayısına ve çevredeki nesnelere zarar verme, uygunsuz idrar/dışkı yapımı, kendi kendine zarar verme davranışları ile de pozitif korelasyon katsayısına sahiptir. Ağırlık ise utangaçlık ile yüksek pozitif korelasyon katsayısına sahipken, kendi kendine zarar verme ve aşırı tükürük salgısı durumu ile pozitif korelasyon katsayısına mevcuttur.

Tablo 4-17 Demografik veriler ile Anket korelasyonu (erkek)

Erkek	Yaş	Ağırlık
Korku	-.020	.252
Aşırı aktivite	-.090	.265
İnsanlara yönelik saldırganlık	-.091	.274
Köpeklerle veya diğer hayvanlara yönelik saldırganlık	.361	.375
Nefes nefese kalma durumu	.266	.056
Aşırı havlama, uluma	-.314	.054
Çevresindeki nesnelere zarar verme	-.017	.033
Uygunsuz idrar/dışkı yapımı (ev kirliliği)	-.473*	-.076
Cinsel davranış sorunları	-.193	.081
Kaprofaji (dışkı yenilmesi)	-.210	-.441*
Başıboşluk	.169	.304
Utangaçlık	-.106	-.210
Kendi kendine zarar verme	-.347	-.247
Aşırı tükürük salgısı	-.143	-.311
Yemek yememe durumu	.138	.018

Erkek köpeklerde yaş, uygunsuz idrar/dışkı yapımı davranışı ile negatif korelasyon katsayısına sahipken ağırlık ise kaprofaji davranışı ile negatif korelasyon katsayısı mevcuttur.

5. TARTIŞMA

Amacı ve uygulanan materyal, metod kapsamında literatür için özgün bir yeri olacak şekilde tasarlanılan çalışmada kaygı durumuna odaklanılmıştır. Kaygı, bir dereceye kadar hayvanlara biyolojik avantaj katan doğal bir duygudur. Anksiyete bozukluğunda erkeklerin neredeyse iki katı prevalansa sahip olan kadınlarda bu durumun çocukların korunmasında etkili olduğu düşünülmektedir. Belirsiz uyaranları tehdit olarak algılama yaklaşıma sahip olma durumu ve tehdit ile ilgili durumlara aşırı artan ilgi durumu sonucu yanlış yorumlamalara yol açan bilişsel önyargıya sahip olunması Anksiyete bozukluğu olan hastaların ortak sorunudur [76]. Anksiyete insanlarda %28 prevalans değeri ile en sık görülen bozukluklar arasındadır [45]

Kaygı ve korku ile ilgili davranış sorunları insanlar ile köpeklerde benzer yapıda ve yaygındır. Fizyolojik stres tepkisi oluşumu endişe ya da korku uyaranına maruz kalınması ile gerçekleşir [1]. Hayvanlara davranış problemleri nedeniyle veteriner hekimlerce müdahale edilmesi durumu son yıllarda insanlar ile benzer şekilde artmış ve davranış tıbbı veteriner hekimlikte de oldukça yaygınlaşmıştır. [2]. Anksiyete ile ilişkili olarak insanlar ile oldukça yüksek benzerliğe sahip olan köpeklerle çalışılması tercih edilen bir yöntem olarak bildirilmektedir.

Çalışmada gerçekleştirilen analizlerin güvenilirliğini arttırmak amacıyla anket formunda köpeklerle ilişkin demografik bilgilerin tespitine yönelik sorular mevcuttur. Anket soruları köpeklerde anksiyete probleminin tespitine yönelik literatür taraması sonucu anksiyete ile ilişkilendirilmiş ve anksiyete seviyesinin skorlanmasına yönelik geçmiş çalışmalardan derlenmiştir [3-7].

Gönüllü ve/veya hastaların çeşitli bilişsel, motor veya algısal görevlerini gerçekleştirirken beyin aktivitelerinin doğrudan araştırmacılar tarafından gözlenmesi günümüzde EEG, MEG, fMRI, fNIRS gibi modern nörogörüntüleme yöntemleri ile yapılması mümkündür. Nörogörüntüleme alanındaki gelişim ve disiplinlerarası uygulamalar sayesinde beyin görüntüleme teknikleri bilişsel sinirbilim alanına çağ atlatmıştır. Nörogörüntüleme yöntemlerinin gelişmiş deneysel tasarımlar ve modern veri analizi yöntemleri ile birleştirilmesiyle beyin bölgelerinin işlev ve etkileşimleri keşfedilmektedir [35].

EEG elektriksel beyin aktivitesinin gözlemlenmesi için yeterli geniş bir frekans spektrumuna ve oldukça iyi bir zamansal çözünürlüğe sahip olmasının yanında kolay ulaşılabilir ve ucuz olması sebebiyle diğer nörogörüntüleme tekniklerinden avantajlıdır. [13,60]. EEG sinyallerinin çalışıldığı frekans bantları genel olarak delta (0,5-4Hz), teta (4-7,5Hz), alfa (8-13Hz), beta (14-26Hz) ve gama (>30Hz) ritimleri olmak üzere bölünebilir ve literatürde her bir frekans aralığının farklı beyin bölgelerindeki aktiflik durumu farklı fizyolojik aktiviteler ile ilişkilendirilmiştir [60-62,73,74,90].

Gerçekleştirilen deneysel çalışmada EEG sinyallerine ait frekans verileri ile kortizol seviyelerindeki değişimin artmış uyanıklık ve bilişsel performans arasındaki ilişkisi tespit edilmiştir [79]. Serotonin (5-HT) ve Dopamin gibi çok çeşitli nörotransmitterler nöronların davranışları yönetmesi ve eylemleri için önemlidir [91]. Bu gibi nörotransmitterler sağlıklı sinirsel işlevlerde olduğu gibi anksiyete rahatsızlığında da sinirler arası iletişim ve kontrolün sağlanmasında görevli kimyasallardır. Farklı tipteki anksiyete bozukluklarında nörotransmitterlerdeki eylem veya duyarlılık varyasyonları etkili olabilmektedir [11]. Dopaminerjik ve serotonerjik sistemlerin çeşitli hayvan modellerinde ve insanlarda anksiyete ve stres sorunlarına yol açabileceği bildirilmiştir [21].

Nörotransmitter sistemlerinin beyin ile ilişkilerinin keşfi farmakoloji araştırmalarından net bilgiler elde edilmesine yardımcı olur. Günümüz çalışmaları nörotransmitter sistemlerindeki değişikliklerin beyin çeşitli bölgelerini farklı şekillerde etkilediğini de açıklamıştır. Bu sebeple lokasyon odaklı araştırmalardan daha net sonuçlar çıkarılmasına olanak tanımaktadır [157].

Stresin neden olduğu depresif bozukluk geliştirme eğilimli deney hayvanları ile anksiyete ve depresyonun araştırılması amacıyla nörokimyasal profil çıkarımların amaçlandığı araştırmada nöroendokrin sistem ve davranışsal tepkinin ilişkili olduğu sonucu elde edilmiştir [169]. DeLuca ve ark. yapmış olduğu çalışmada insanlar ile ortak özellikleri dikkate alınarak köpekler arasında oluşturulacak farklı gözlem gruplarının serum proteinleri ile ilişkili biyokimyasal seviyede farklılıklara sahip olup olmadıklarını belirlemenin davranış araştırmalarında başarıyı destekleyici olduğu açıklanmıştır [99].

HE ve VO geleneksel ve modern tıpta çok sayıda yararlı etkileri ile bilinen bitkilerdir. HE'nin sinir sistemi üzerindeki etkileri, depresif bozukluğa karşı iyileştiriciliği ve anksiyete ile ilişkisine dair literatüre geçmiş çok sayıda yayın mevcuttur [127-133]. Benzer şekilde

günümüzde insanlar tarafından yaygın olarak kullanılan VO'nun anksiyolitik etkisinin raporlandığı çok sayıda araştırma mevcuttur [134-141].

Çalışmamızın deneysel bölümünde 4 haftalık düzenli HE ve VO ekstraktlarının kullanımı öncesi ve sonrası verilerin toplanması gerçekleşmiştir. Ekstrakt tüketimi öncesi ve sonrası anksiyete ile ilişkili durumun araştırılması sebebiyle kontrol grubuna ihtiyaç duyulmamıştır. Bulgu karşılaştırmalarının yapıldığı HE ve VO gruplarının anket, EEG güç spektrumu ve nörokimyasal seviyelerine ait değerlerinde iki örneklem grubuna ait ilk ölçüm verilerinin birbirleri arasında anlamlı bir farklılık olmamasına dikkat edilmiştir. Böylelikle iki grup arasında ön değer standardizasyonu sağlanarak iki farklı ekstraktın etkileri ilk aşamada benzer özellikler gösteren iki örneklem grubunda daha sağlıklı kıyaslanmıştır.

Çalışmamız kapsamında Tablo 4-1'de verilmiş olan bulgular doğrultusunda anksiyete ile ilişkilendirilen korku durumu ve başıboşluk davranışlarında iki grupta istatistiksel ve gözlemsel olarak anlamlı azalmalar tespit edilmiştir. Elde edilen bu bilgiden her iki bitkiye ait ekstrakt tüketiminin anksiyete ile ilişkili olumsuz davranışlarda azaltıcı etkisi olduğu sonucunu çıkarmak mümkündür.

Köpeklerde korku durumu ile başıboşluk skorlarında her iki grup içinde anlamlı düşüşler görülürken ek olarak VO grubunda aşırı aktivite ve aşırı havlama, uluma durumlarında da anlamlı azalmalar tespit edilmiştir. Elde ettiğimiz sonuçlar, HE tüketen köpeklerin kaygı durumlarının iyileştiğinin tespit edildiği, depresyon ve anksiyeteyi azaltmadaki potansiyelinin ortaya konulduğu çalışmalar ile paralellik göstermektedir [128-133]. VO tüketimine ait bulgular da anksiyete ve uykusuzluk durumlarının iyileştiğini bildiren çalışmalar ile aynı doğrultudadır [134-141].

Tablo 4-2'deki değerlere göre, HE grubunda ekstrakt kullanımı öncesi ve sonrası yalnızca serotonin seviyesinde anlamlı düşüş tespit edilirken, VO grubunda yalnızca dopamin seviyesine ait istatistiksel olarak anlamlı bir azalma görülmüştür. Dopamin seviyesinde ise ilk ölçümlerde HE grubu ve VO grubu arasında anlamlı farklılık bulunmazken 28. gün sonuçlarında anlamlı istatistiksel olarak değişiklik görülmüştür. Böylelikle HE ve VO ekstraktlarının tüketiminin dopamin seviyesi üzerinde farklı etkinliğinin olduğu sonucuna varmak mümkündür. Bulgularımızı VO ekstraktının net bir analjezik etkiye sahip olduğunu serotonerjik ve dopaminerjik sistemler aracılığıyla çalıştığı sonucuna varılan çalışma desteklemektedir [161]. H. erinaceus'un stres altındaki hayvanlarda serotonerjik ve

dopaminerjik modülasyonlar yoluyla anti-depresan benzeri etkilere sahip olduğunu da yapılan çalışmalarda görülmüştür [162].

HE ile VO'nun dopaminerjik sistemler ilişkisinin karşılaştırıldığı çalışmalara literatürde rastlanılmamıştır. Çalışmamızdaki bulgu farklılıkları ile iki bitkinin dopaminerjik sistemler arasında farklı bir ilişkisi olabileceği ihtimali ile açıklanabilir.

Tablo 4-3'te görülmekte olan EEG delta frekansına ait bulgulara HE ve VO gruplarının F3, F4, T3, T4 ve Cz kanallarındaki güç değerlerinin 0. Ve 28. günleri karşılaştırıldığında istatistiksel bir anlamlılık tespit edilememiştir. Ancak 28. Gün ölçümlerinde iki grup arasında F3, F4, T3 ve T4 kanallarında anlamlı farklılık tespit edilmiştir. Böylelikle HE ve VO ekstrakt kullanımının Delta frekans bandı üzerindeki etkinliklerinde farklılıklar olduğu sonucu çıkarılabilir. Delta gücünün artması ile rahatlama, kaygı puanlarının düşmesinin ilişkilendirildiği yayınlar olmasına rağmen çalışmamızda delta gücünde beklenen artış gözlemlenmemiştir [18,78,79].

EEG'de teta frekansına ait bulgulara HE grubunda F3, F4, T3, T4 ve Cz olmak üzere kaydedilen bütün elektrot gruplarında Tablo 4-4'te görüldüğü üzere anlamlı azalmalar tespit edilmiştir. VO grubunda ise tüm EEG kanallarına ait ortalama güç değerlerinde düşüşler mevcut olsada anlamlı farklılık tespit edilememiştir. Öğrenciler ile yapılan araştırmada sınav öncesi teta bandının yüksek olduğu tespit edilerek endişe durumu ile bağlantı kurulmuştur [17]. Teta salınımlarının, kararlılık, rasyonel düşünceler ve ödül işlemeyen sorumlu subkortikal beyin bölgeleriyle de ilişkilendirildiği çalışmalar mevcuttur [163]. Bu doğrultuda HE grubundaki köpeklerde görülen anlamlı düşüşler literatür tarafından desteklenmektedir.

EEG'de alfa frekansına ait bulgulara HE grubunda F3 ve T3 elektrotlarında anlamlı düşüşler tespit edilmiş ve Tablo 4-5'te belirtilmiştir. VO grubunda ise herhangi bir kanalda anlamlı farklılık tespit edilememiştir. Alfa dalgaları rahatlatmış farkındalık ile ilişkilendirilmektedir [60]. Farklı bir çalışmaya ait örneklem grubunda stres giderici, memnuniyet artırıcı uygulamalar sonrası alfa aktivitesinde istatistiksel anlamlılık tespit edilmiştir [37]. Ayrıca panik bozukluğu hastalarının sağlıklı kontrollere göre daha düşük EEG alfa gücüne sahip olduğu raporlanmıştır [77]. Ancak anksiyete ve depresyonun psikometrik ölçümlerinin yapıldığı bir başka çalışmada ise hastalara ait kaygı puanları ile EEG alfa gücü arasında pozitif ilişki tespit edilmiştir [78]. Alfa bandındaki sonuçlarımız çeşitli referans çalışmalarda desteklenirken [78] bazıları ile ters [60,77] düşmektedir.

Tablo 4-6'daki EEG'de beta frekansına ait bulgulara HE ve VO gruplarında çeşitli azalma ve artışlar mevcut olsa da herhangi bir anlamlı istatistiksel farklılık tespit edilememiştir. Literatürde beta bandının kaygı değişiklikleri ile ilişkili öznel yakalamak için çok önemli olduğuna yönelik yayınlar mevcuttur [18,164,165].

Bulgulara ait korelasyon çıktıları ise farklı kombinasyonlar arasında gerçekleştirilen analizler sonucunda bulunmuştur. Gerçekleştirdiğimiz Anket - Genel EEG Delta Bandı PSD Korelasyon analizinde F3, F4, Cz ve T3 kanalları ile başıboşluk davranışı verileri arasında pozitif korelasyonlar Tablo 4-7'de gösterilmiştir. Aynı delta bandında Cz kanalı ile yemek yememe davranışı arasında da pozitif korelasyon tespit edilmiştir. Referans çalışmalar doğrultusunda delta gücünün artması ile anksiyete skorları arasında aslında negatif korelasyon olması beklenmektedir [18,78,79]. Delta bandındaki mevcut bulgular ile referans çalışmalarının birbirlerini desteklememesinde örneklem grubu sayısının az olmasının etkisi olduğu düşünülmektedir.

Anket – Genel EEG Teta Bandı PSD Korelasyon analizinde F3, Cz ve T3 kanal verileri ile yine başıboşluk arasında pozitif korelasyon tespit edilmiştir. Teta bandındaki artış ile anksiyete ilişkili skor verisinin artışı literatür tarafından desteklenmektedir [17,163]. Bulgular Tablo 4-7'de paylaşılmıştır.

Anket – Genel EEG Alfa Bandı PSD Korelasyon analizinde F3, F4 ile aşırı aktivite, T4 ile korku arasında negatif korelasyon, F3 kanalı ve Cz kanalı ile Başıboşluk arasında pozitif korelasyon tespit edilmiştir. İlgili bulgular Tablo 4-9'da paylaşılmıştır. Anksiyete ile ilişkili davranış bulgularımızın negatif ve pozitif korelasyon farklılığı göstermesi sebebiyle net bir yorum yapılması mümkün gözükmemektedir. Aynı şekilde literatürde de anksiyete ile EEG alfa bandı ilişkisi konusunda farklı yaklaşımlar mevcuttur. Bu durumda bu ilişki ile ilgili kesin sonuca varılması amacıyla çalışmamızın farklı veri ve analizlerle desteklenmesi gerekmektedir.

Anket – Genel EEG Beta Bandı PSD Korelasyon analizlerinde F3 kanalı ile Aşırı aktivite, İnsanlara yönelik saldırganlık, Aşırı havlama/ulumada azalma ile negatif korelasyon tespit edilmiştir. F4 kanalı ile Korku, Aşırı aktivite, insanlara yönelik saldırganlık, Nefes nefese kalma durumunda azalma arasında negatif korelasyon tespit edilmiştir. Cz kanalı ile Başıboşlukta pozitif korelasyon tespit edilmiştir. Başıboşluk skorunun her frekans bandında farklı EEG kanalları ile bir pozitif korelasyonu mevcuttur. T3 kanalı ile Aşırı aktivite arasında negatif korelasyon tespit edilmiştir. T4 kanalında ise İnsanlara yönelik saldırganlık,

Nefes nefese kalma durumu, Uygunsuz idrar/dışkı yapımı (ev kirliliği) ve cinsel davranış sorunlarında azalma ile de negatif korelasyon tespit edilmiştir. Beta bandına ait özelliklerin anksiyete ile ilişkisinin frekans yoğunluğu değişimi haricinde çeşitli analizlerle de tespit edilen öneminin çok sayıda yayında değinilmesi durumu Tablo 4-10'daki bulgularımızda anksiyete ile ilişkili özelliklerimizin Beta bandı ile olan yüksek korele durumları tarafından desteklenmektedir.

Genel EEG delta ve beta frekans bandına ait spektral güç analiz verileri ile dopamin, serotonin ve kortizol arasında herhangi bir korelasyon tespit edilememiştir. Genel EEG alfa ve teta frekans bandına ait spektral güç analiz verilerinde ise sadece T3 kanalına ait kortizol seviyesi arasında korelasyon olduğu bulunmuştur. Bu durumun yanında Tablo 4-11, Tablo 4-12, Tablo 4-13 ve Tablo 4-14 bulgularında genel olarak değerler istatistiksel olarak anlamlılık elde edilmemiştir. Dopamin ve Serotonin değerleri hemen hemen bütün EEG frekans bantları ile pozitif korelasyona eğilimine sahipken Kortizol ile negatif korelasyon eğilimi mevcuttur. Bu durumdan kortizol ile ilişkili mekanizmanın dopamin ve serotonininden farklı işlediği sonucu çıkarılabilir.

Nörokimyasallar ile anket verileri arasındaki korelasyon analizinde ise Serotonin ile aşırı aktivite ve insanlara yönelik saldırganlık arasında pozitif korelasyon Tablo 4-15'te görüldüğü şekilde tespit edilmiştir. Ayrıca Kortizol ile kendi kendine zarar verme arasında da pozitif korelasyon tespit edilmiştir. Aşırı aktivite ve insanlara yönelik saldırganlık durumundaki değişimler diğer davranış sorunları ile kıyaslırsak yaptığımız testlerin çoğunda daha fazla anlamlı değişim değerlerine sahip olmuşlardır. Kortizol değerleri ile kendi kendine zarar verme durumu arasındaki pozitif korelasyon ise kortizol seviyesinin diğer analizlerdeki etkinlikleri düşünülürse bir anlam içerebilir. Ancak konu ile ilişkili kortizol hakkındaki çalışmalara literatürde denk gelinememiştir.

Demografik veriler kapsamında ise Tablo 4-16 ve Tablo 4-17'de görüldüğü üzere dişi köpeklerde anket verileri ile yaş ve ağırlık gibi parametreler arasında erkek köpeklere oranla çok yüksek korelasyon oranları tespit edilmiştir. Anksiyetenin kadınlarda yüksek prevalansa sahip olduğuna yönelik literatür bilgisinin dişi köpekler içinde geçerli olduğu çıkarımını yapmak mümkündür [76]. Bulgularımız ile ilgili farklı istatistik (farklı korelasyon analizleri vb.) ve analiz (EEG asimetri vb.) kombinasyonları oluşturulması mümkündür. Ayrıca daha geniş örneklem grubundan yararlanarak yapılacak çalışmalar ile literatür tarafından desteklenmesi muhtemel özgün sonuçlara ulaşılabilir.

Açıklanmış olan bulgular ve literatür doğrultusunda HE ve VO bitkilerine ait ekstraktların 4 haftalık süreyle belirlenen dozlarda düzenli tüketiminde özellikle anksiyete ile ilişkili korku ve başboşluk gibi olumsuz davranışlarda azaltıcı etkisi olduğu sonucu çıkarılabilir. Çeşitli literatür çalışmalarında bu ve bu tür davranışlar anksiyete ile özellikle ilişkilendirilmiştir [3-7].

Nörokimyasal seviyelerindeki bulgular doğrultusunda her iki grup için farklı seviye değişimleri gözükmesi sebebiyle, tüketilen ekstraktların Kortizol, Dopamin ve Serotonin mekanizmalarına etkilerinde farklılıklar olduğu düşünülebilir. Ayrıca Dopamin ve Serotonin değerleri çalışma kapsamında ölçülen neredeyse bütün EEG frekans bantlarına ait güç değerleri ile pozitif korelasyon eğilimine sahipken Kortizol değerlerinde negatif korelasyon eğilimi mevcut olması dikkate değer bir bulgudur. Bu davranışlara yönelik benzer ilişkinin incelendiği literatür çalışmasına denk gelinememiştir.

Ekstrakt tüketimi öncesi iki grubun EEG Delta frekans bandındaki güç değerleri arasından anlamlı herhangi bir farklılık yokken tüketim sonrası mevcut bütün kanallarda oluşan anlamlılığın, ekstraktların mekanizma üzerindeki farklı etkisini ortaya koyduğu sonucuna ulaşılabilir. Ancak her iki grup için de delta bandında anlamlı artış veya azalma görülmemesiyle anksiyetenin iyileşmesine yönelik bir etkisi tespit edilememiştir. Ancak anksiyete skor verisi ile pozitif korelasyon durumu literatür ile ters düşmektedir [18,78,79].

HE tüketen grubun mevcut bütün kanallarda EEG Teta bandı değerlerindeki anlamlı düşüşler literatür kapsamında anksiyetenin iyileşmesine yönelik pozitif göstergeler olarak kabul edilebilir [17,163]. VO grubundaki stabilite doğrultusunda ise anksiyetenin iyileşmesi durumuna yönelik etki gözlemlenememiştir.

Ekstrakt tüketimi sonrası VO grubundaki alfa bandındaki stabil durum etkisizlik olarak tanımlanabilir. HE grubundaki beynin sol tarafındaki değişim ve genel EEG alfa verilerine ait korelasyon analizi sonucu anksiyetenin iyileşmesine yönelik çeşitli referans çalışmalarca desteklenirken [78] bazıları ile ters düşmektedir [60,77].

Beta bandında iki grupta da ekstrakt tüketimi sonrası anlamlı bir değişim mevcut değilken anksiyete ile ilişkili davranışlar ile arasında birçok anlamlı korelasyon sonucu mevcuttur. Beta bandı ile kaygı değişikliklerinin ilişkilendirilmesine yönelik ciddi literatür çalışmaları vardır. Literatürdeki Beta bandına yönelik çalışmalarda genel olarak daha farklı analizler ile çeşitli sonuçlara ulaşılmıştır. Bu sebeple bir sonuca ulaşmak için Beta bandında mevcut bulguların arttırılması gerekmektedir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Hipotez testlerimizin sonucunda VO grubunun anksiyete ile ilişkili olumsuz davranışlarında daha yüksek iyileşme oranı tespit edilmesi sebebiyle VO'nun köpekler üzerinde 4 haftalık tüketimde HE'ye kıyas ile daha etkili olduğu sonucu çıkarılabilir.

Serotonin seviyesinde HE'nin düşürücü etkisi olduğunun yanında dopamin seviyesinde ise her iki bitkinin birbirinden farklı etki mekanizmasına sahip olduğu bulgular doğrultusunda düşünülebilir.

EEG frekans bantlarından ise delta spektrumuna ait frontal ve temporal sağ ve sol bölgelerde her iki bitkinin farklı etkileri mevcuttur. Teta spektrumunda HE'nin tüm lokasyonlarda düşürücü etki durumu mevcut iken VO etkisiz olarak gözlemlenmiştir. Alfa spektrumunda HE frontal ve temporal sol bölgelerde düşürücü etkiye sahip iken VO yine etkisiz durumdadır. Beta spektrumunda ise her iki bitki grubunun da etki göstermemesi ile birlikte bu bitkilere ait ekstraktların bulguları belirtilen sonuçlar şeklinde manipüle edici etkisi olduğu sonucu çıkarılabilir. HE grubunun EEG sinyalleri üzerinde oluşan anlamlı değişimlerinin VO grubuna kıyasla fazla olması sebebiyle HE kullanımının beyin elektriksel aktivitesi üzerinde daha manipülatif etkiye sahip olduğu sonucu çıkarılabilir.

Korelasyon analizleri doğrultusunda Alfa ve Beta ile anket sonuçları arasında net bir sonuca çıkılmayacak tutarsız bulgular elde edilmiştir. EEG frekans bantlarından delta spektrumunun ise neredeyse tüm beyin lokasyonlarında anket verileri ile pozitif korelasyona sahip olduğu ve teta spektrumunda sol ağırlıklı bölgelerin anket verileri ile pozitif korelasyona sahip olduğu sonucu mevcuttur.

Dopamin ve serotonin seviyelerinin ise EEG frekans bantlarının mevcut kanallarda hemen hepsi ile pozitif korelasyon eğilimine sahip iken kortizolün EEG frekans bantlarının mevcut kanallarında neredeyse hepsi ile negatif korelasyon eğilimine sahip olduğu sonucu çıkarılabilir.

Sonuç olarak gerçekleştirilen bu çalışma, 4 haftalık düzenli olarak HE ve VO ekstraktı tüketen anksiyeteli evcil köpek (*Canis familiaris*) gruplarının her ikisinde de önemli davranışsal iyileşmeler olduğunu göstermiştir. Çalışmada anksiyete ile ilişkili davranış

bozuklukları, elektroensefalografik beyin elektriksel aktivite kayıtları ve kan serumu üzerinden nörokimyasal ve hormonal seviye bulguları ile çalışılmıştır. Anksiyete üzerinde iki grup için olumlu sonuçlar elde edilse de, her iki ekstraktın da bulgularda farklı oranlarda önemli etkileri oluşması sebebiyle kullanılan bitkilerin farklı etki mekanizmaları ve etkinlikleri olduğu sonucu çıkarılabilmektedir.

Çalışma kapsamında kullanılan ekstraktların, ölçmüş olduğumuz parametrelere ait analizlerden yola çıkarak anksiyetenin iyileştirilmesine yönelik potansiyele sahip olduğu görülmektedir. Gerçekleştirdiğimiz EEG analizlerine ek olarak mevcut deney verilerimiz ile belirli zaman aralığında frekans salınım indeksi, senkronizasyon, asimetri çalışmaları ve farklı deney düzenekleri ile çalışmanın güçlendirilmesi önerilebilir.



KAYNAKLAR

- [1]. Dreschel, N.A., 2010. The effects of fear and anxiety on health and lifespan in pet dogs. *Applied Animal Behaviour Science*, 125(3-4), pp.157-162.
- [2]. Knol, B.W., 1987. Behavioural problems in dogs: Problems, diagnoses, therapeutic measures and results in 133 patients. *Veterinary Quarterly*, 9(3), pp.226-234.
- [3]. Flannigan, G. and Dodman, N.H., 2001. Risk factors and behaviors associated with separation anxiety in dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 219(4), pp.460-466.
- [4]. Konok, V., Dóka, A. and Miklósi, Á., 2011. The behavior of the domestic dog (*Canis familiaris*) during separation from and reunion with the owner: A questionnaire and an experimental study. *Applied Animal Behaviour Science*, 135(4), pp.300-308.
- [5]. Carrieri-Rocha, V.M., Duarte, M.H.L. and da Silva Vasconcellos, A., 2020. Acoustic stress in domestic dogs (*Canis familiaris*) living around football stadiums. *Journal of veterinary behavior*, 37, pp.27-35.
- [6]. Kurachi, T., Irimajiri, M., Mizuta, Y. and Satoh, T., 2017. Dogs predisposed to anxiety disorders and related factors in Japan. *Applied Animal Behaviour Science*, 196, pp.69-75.
- [7]. Rooney, N.J., Clark, C.C. and Casey, R.A., 2016. Minimizing fear and anxiety in working dogs: A review. *Journal of Veterinary Behavior*, 16, pp.53-64.
- [8]. Hollander, E. and Simeon, D., 2008. Anxiety disorders. RE Hales, SC Yudofsky, GO Gabbard,(Eds.), *Textbook of Psychiatry*.
- [9]. Dogan, O., 2012. The etiology of anxiety disorders. *Anadolu Psikiyatri Dergisi*, 13, pp.224 – 231.

- [10]. Bystritsky, A., Khalsa, S.S., Cameron, M.E. and Schiffman, J., 2013. Current diagnosis and treatment of anxiety disorders. *Pharmacy and Therapeutics*, 38(1), p.30.
- [11]. Kim, J. and Gorman, J., 2005. The psychobiology of anxiety. *Clinical Neuroscience Research*, 4(5-6), pp.335-347.
- [12]. Michael, J.A., Wang, M., Kaur, M., Fitzgerald, P.B., Fitzgibbon, B.M. and Hoy, K.E., 2021. EEG correlates of attentional control in anxiety disorders: A systematic review of error-related negativity and correct-response negativity findings. *Journal of Affective Disorders*, 291, pp.140-153.
- [13]. Haas, L.F., 2003. Hans berger (1873–1941), richard caton (1842–1926), and electroencephalography. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, 74(1), pp.9-9.
- [14]. McNaughton, N., Swart, C., Neo, P., Bates, V. and Glue, P., 2013. Anti-anxiety drugs reduce conflict-specific “theta” A possible human anxiety-specific biomarker. *Journal of affective disorders*, 148(1), pp.104-111.
- [15]. Díaz, H., Cid, F.M., Otárola, J., Rojas, R., Alarcón, O. and Cañete, L., 2019. EEG Beta band frequency domain evaluation for assessing stress and anxiety in resting, eyes closed, basal conditions. *Procedia Computer Science*, 162, pp.974-981.
- [16]. Wang, T.C., Sit, C.H.P., Tang, T.W. and Tsai, C.L., 2020. Psychological and physiological responses in patients with generalized anxiety disorder: The use of acute exercise and virtual reality environment. *International journal of environmental research and public health*, 17(13), p.4855.
- [17]. Rajendran, V.G., Jayalalitha, S. and Adalarasu, K., 2022. EEG Based Evaluation of Examination Stress and Test Anxiety Among College Students. *Irbm*, 43(5), pp.349-361.
- [18]. De Pascalis, V., Vecchio, A. and Cirillo, G., 2020. Resting anxiety increases EEG delta–beta correlation: relationships with the reinforcement sensitivity theory personality traits. *Personality and Individual Differences*, 156, p.109796.

- [19]. Siwak-Tapp, C.T., Head, E., Muggenburg, B.A., Milgram, N.W. and Cotman, C.W., 2008. Region specific neuron loss in the aged canine hippocampus is reduced by enrichment. *Neurobiology of aging*, 29(1), pp.39-50.
- [20]. Dürmüller, N., Guillaume, P., Lacroix, P., Porsolt, R.D. and Moser, P., 2007. The use of the dog electroencephalogram (EEG) in safety pharmacology to evaluate proconvulsant risk. *Journal of pharmacological and toxicological methods*, 56(2), pp.234-238.
- [21]. Srivastava, A. and Kumar, P., 2021. Nutraceuticals in anxiety and stress. In *Nutraceuticals* (pp. 63-72). Academic Press.
- [22]. Olivier, B., Pattij, T., Wood, S.J., Oosting, R., Sarnyai, Z. and Toth, M., 2001. The 5-HT 1A receptor knockout mouse and anxiety. *Behavioural pharmacology*, 12(6), pp.439-450.
- [23]. Tu, X., Li, Y.W., Chen, Q.L., Shen, Y.J. and Liu, Z.H., 2020. Tributyltin enhanced anxiety of adult male zebrafish through elevating cortisol level and disruption in serotonin, dopamine and gamma-aminobutyric acid neurotransmitter pathways. *Ecotoxicology and environmental safety*, 203, p.111014.
- [24]. Orekhova, E.V., Stroganova, T.A., Posikera, I.N. and Elam, M., 2006. EEG theta rhythm in infants and preschool children. *Clinical neurophysiology*, 117(5), pp.1047-1062.
- [25]. Chanel, G., Kronegg, J., Grandjean, D. and Pun, T., 2006, September. Emotion assessment: Arousal evaluation using EEG's and peripheral physiological signals. In *International workshop on multimedia content representation, classification and security* (pp. 530-537). Springer, Berlin, Heidelberg.
- [26]. Sgarbieri, V.C. and Pacheco, M.T.B., 2017. Premature or pathological aging: longevity. *Brazilian Journal of Food Technology*, 20.
- [27]. Jerison, H., 2012. *Evolution of the brain and intelligence*. Elsevier.
- [28]. Leon, A.C., Portera, L. and Weissman, M.M., 1995. The social costs of anxiety disorders. *The British Journal of Psychiatry*, 166(S27), pp.19-22.

- [29]. Wu, G.K., Tao, H.W. and Zhang, L.I., 2011. From elementary synaptic circuits to information processing in primary auditory cortex. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 35(10), pp.2094-2104.
- [30]. Jacobson, S., Marcus, E.M. and Pugsley, S., 2011. *Neuroanatomy for the Neuroscientist*. New York: Springer Science+ Business Media, LLC.
- [31]. Widmaier, E.P., Raff, H. and Strang, K.T., 2006. *Vander's human physiology* (Vol. 5). New York, NY: McGraw-Hill.
- [32]. Huang, A., Zhang, X., Li, R. and Chi, Y., 2018. Memristor neural network design. *Memristor and Memristive Neural Networks*, pp.1-35.
- [33]. Wikipedia Contributors (2019). *Action potential*. [online] Wikipedia. Available at: https://en.wikipedia.org/wiki/Action_potential [Ziyaret tarihi: 4 Temmuz 2021].
- [34]. Wang, J., Yang, T., Thompson, P. and Ye, J., 2016. Sparse models for imaging genetics. In *Machine Learning and Medical Imaging* (pp. 129-151). Academic Press.
- [35]. Gui, X.U.E., Chuansheng, C.H.E.N., Zhong-Lin, L.U. and Qi, D.O.N.G., 2010. Brain imaging techniques and their applications in decision-making research. *Xin li xue bao. Acta psychologica Sinica*, 42(1), p.120.
- [36]. da Silva, F.L., 2013. EEG and MEG: relevance to neuroscience. *Neuron*, 80(5), pp.1112-1128.
- [37]. Bennett, R.C., Salla, K.M., Raekallio, M.R., Hänninen, L., Rinne, V.M., Scheinin, M. and Vainio, O.M., 2016. Effects of MK-467 on the antinociceptive and sedative actions and pharmacokinetics of medetomidine in dogs. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 39(4), pp.336-343.
- [38]. Górecka, J. and Makiewicz, P., 2019. The dependence of electrode impedance on the number of performed EEG examinations. *Sensors*, 19(11), p.2608.
- [39]. Li, G. and Chung, W.Y., 2022. Electroencephalogram-Based Approaches for Driver Drowsiness Detection and Management: A Review. *Sensors*, 22(3), p.1100.

- [40]. Kułak, W. and Sobaniec, W., 2003. Spectral analysis and EEG coherence in children with cerebral palsy: spastic diplegia. *Przegląd Lekarski*, 60, pp.23-27.
- [41]. Rojas, G.M., Alvarez, C., Montoya, C.E., De la Iglesia-Vaya, M., Cisternas, J.E. and Gálvez, M., 2018. Study of resting-state functional connectivity networks using EEG electrodes position as seed. *Frontiers in neuroscience*, 12, p.235.
- [42]. Roy-Byrne, P.P., Davidson, K.W., Kessler, R.C., Asmundson, G.J., Goodwin, R.D., Kubzansky, L., Lydiard, R.B., Massie, M.J., Katon, W., Laden, S.K. and Stein, M.B., 2008. Anxiety disorders and comorbid medical illness. *General hospital psychiatry*, 30(3), pp.208-225.
- [43]. Sareen, J., Cox, B.J., Afifi, T.O., De Graaf, R., Asmundson, G.J., Ten Have, M. and Stein, M.B., 2005. Anxiety disorders and risk for suicidal ideation and suicide attempts: a population-based longitudinal study of adults. *Archives of general psychiatry*, 62(11), pp.1249-1257.
- [44]. Bateson, M., Brilot, B. and Nettle, D., 2011. Anxiety: an evolutionary approach. *The Canadian Journal of Psychiatry*, 56(12), pp.707-715.
- [45]. Kessler, R.C., Chiu, W.T., Demler, O. and Walters, E.E., 2005. Prevalence, severity, and comorbidity of 12-month DSM-IV disorders in the National Comorbidity Survey Replication. *Archives of general psychiatry*, 62(6), pp.617-627.
- [46]. Malmivuo, J. and Plonsey, R., 1995. *Bioelectromagnetism: principles and applications of bioelectric and biomagnetic fields*. Oxford University Press, USA.
- [47]. Mariti, C., Gazzano, A., Moore, J.L., Baragli, P., Chelli, L. and Sighieri, C., 2012. Perception of dogs' stress by their owners. *Journal of Veterinary Behavior*, 7(4), pp.213-219.
- [48]. National Institute of Mental Health (2019). Anxiety Disorders. [online] Nih.gov. Available at: <https://www.nimh.nih.gov/health/topics/anxiety-disorders/index.shtml> [Ziyaret tarihi: 13 Temmuz 2021].
- [49]. Svartberg, K., 2007. Individual differences in behaviour—dog personality. *The behavioural biology of dogs*, pp.182-206.

- [50]. Bandelow, B. and Michaelis, S., 2022. Epidemiology of anxiety disorders in the 21st century. *Dialogues in clinical neuroscience*.
- [51]. Dattani, S., Ritchie, H. and Roser, M., 2021. Mental health. *Our world in data*.
- [52]. Depression, W.H.O., 2017. Other common mental disorders: global health estimates. *Geneva: World Health Organization*, 24.
- [53]. DuPont, R.L., Rice, D.P., Miller, L.S., Shiraki, S.S., Rowland, C.R. and Harwood, H.J., 1996. Economic costs of anxiety disorders. *Anxiety*, 2(4), pp.167-172.
- [54]. Becker, H., Albera, L., Comon, P., Haardt, M., Birot, G., Wendling, F., Gavaret, M., Bénar, C.G. and Merlet, I., 2014. EEG extended source localization: tensor-based vs. conventional methods. *NeuroImage*, 96, pp.143-157.
- [55]. Tong, S. and Thankor, N.V., 2009. *Quantitative EEG analysis methods and clinical applications*. Artech House.
- [56]. Beaver, B.V., Fischer, M. and Atkinson, C.E., 1992. Determination of favorite components of garbage by dogs. *Applied Animal Behaviour Science*, 34(1-2), pp.129-136.
- [57]. Jagoe, A. and Serpell, J., 1996. Owner characteristics and interactions and the prevalence of canine behaviour problems. *Applied Animal Behaviour Science*, 47(1-2), pp.31-42.
- [58]. Landsberg, G.M., 1991. Feline scratching and destruction and the effects of declawing. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 21(2), pp.265-279.
- [59]. Yalcin, E.B.R.U. and Batmaz, H., 2007. Signalment factors, comorbidity in behavior diagnoses in dogs in Bursa Region, Turkey (2000-2004). *Acta Veterinaria Brno*, 76(3), pp.445-450.
- [60]. Pfurtscheller, G. and Da Silva, F.L., 1999. Event-related EEG/MEG synchronization and desynchronization: basic principles. *Clinical neurophysiology*, 110(11), pp.1842-1857.

- [61]. Niedermeyer, E. and da Silva, F.L. eds., 2005. *Electroencephalography: basic principles, clinical applications, and related fields*. Lippincott Williams & Wilkins.
- [62]. Klimesch, W., Sauseng, P. and Hanslmayr, S., 2007. EEG alpha oscillations: the inhibition–timing hypothesis. *Brain research reviews*, 53(1), pp.63-88.
- [63]. Ströhle, A., Gensichen, J. and Domschke, K., 2018. The diagnosis and treatment of anxiety disorders. *Deutsches Ärzteblatt International*, 115(37), p.611.
- [64]. Leichsenring, F., Salzer, S., Beutel, M.E., Herpertz, S., Hiller, W., Hoyer, J., Huesing, J., Joraschky, P., Nolting, B., Poehlmann, K. and Ritter, V., 2013. Psychodynamic therapy and cognitive-behavioral therapy in social anxiety disorder: a multicenter randomized controlled trial. *American Journal of Psychiatry*, 170(7), pp.759-767.
- [65]. Diemer, J., Mühlberger, A., Pauli, P. and Zwanzger, P., 2014. Virtual reality exposure in anxiety disorders: Impact on psychophysiological reactivity. *The World Journal of Biological Psychiatry*, 15(6), pp.427-442.
- [66]. Chatterjee, D., Gavas, R., Samanta, R. and Saha, S.K., 2021. Electroencephalogram-based cognitive performance evaluation for mental arithmetic task. In *Cognitive Computing for Human-Robot Interaction* (pp. 85-101). Academic Press.
- [67]. Torse, D., Desai, V. and Khanai, R., 2018. Classification of EEG Signals in a Seizure Detection System Using Dual Tree Complex Wavelet Transform and Least Squares Support Vector Machine. *International Journal of Image, Graphics & Signal Processing*, 10(1).
- [68]. Lehmann, C., Koenig, T., Jelic, V., Prichet, L., John, R.E., Wahlund, L.O., Dodge, Y. and Dierks, T., 2007. Application and comparison of classification algorithms for recognition of Alzheimer's disease in electrical brain activity (EEG). *Journal of neuroscience methods*, 161(2), pp.342-350.
- [69]. Soikkeli, R., Partanen, J., Soininen, H., Pääkkönen, A. and Riekkinen Sr, P., 1991. Slowing of EEG in Parkinson's disease. *Electroencephalography and clinical neurophysiology*, 79(3), pp.159-165.

- [70]. Teplan, M., 2002. Fundamentals of EEG measurement. *Measurement science review*, 2(2), pp.1-11.
- [71]. Kim, M.K., Kim, M., Oh, E. and Kim, S.P., 2013. A review on the computational methods for emotional state estimation from the human EEG. *Computational and mathematical methods in medicine*, 2013.
- [72]. Wang, Y., 2020. *EEG-based Anxious Personality Prediction* (Doctoral dissertation, University of Otago).
- [73]. Palva, S. and Palva, J.M., 2007. New vistas for α -frequency band oscillations. *Trends in neurosciences*, 30(4), pp.150-158.
- [74]. Klimesch, W., 1999. Eeg alpha and theta oscillations reflect. *Eeg alpha and theta oscillations reflect*.
- [75]. Jackson, A.F. and Bolger, D.J., 2014. The neurophysiological bases of EEG and EEG measurement: A review for the rest of us. *Psychophysiology*, 51(11), pp.1061-1071.
- [76]. Tyrer, P. and Baldwin, D., 2006. Generalised anxiety disorder. *The Lancet*, 368(9553), pp.2156-2166.
- [77]. Silva, L.D.G., Aprigio, D., Marinho, V., Teixeira, S., Di Giacomo, J., Gongora, M., Budde, H., Nardi, A.E., Bittencourt, J., Cagy, M. and Basile, L.F., 2022. The Computer Simulation for Triggering Anxiety in Panic Disorder Patients Modulates the EEG Alpha Power during an Oddball Task. *NeuroSci*, 3(2), pp.332-346.
- [78]. Knyazev, G.G., Savostyanov, A.N. and Levin, E.A., 2004. Alpha oscillations as a correlate of trait anxiety. *International journal of psychophysiology*, 53(2), pp.147-160.
- [79]. Field, T., Ironson, G., Scafidi, F., Nawrocki, T., Goncalves, A., Burman, I., Pickens, J., Fox, N., Schanberg, S. and Kuhn, C., 1996. Massage therapy reduces anxiety and enhances EEG pattern of alertness and math computations. *International journal of neuroscience*, 86(3-4), pp.197-205.

- [80]. Bunford, N., Andics, A., Kis, A., Miklósi, Á. and Gácsi, M., 2017. *Canis familiaris* as a model for non-invasive comparative neuroscience. *Trends in neurosciences*, 40(7), pp.438-452.
- [81]. Kappenman, Emily S., and Steven J. Luck. "The effects of electrode impedance on data quality and statistical significance in ERP recordings." *Psychophysiology* 47.5 (2010): 888-904.
- [82]. Mogg, K., Bradley, B.P., Millar, N. and White, J., 1995. A follow-up study of cognitive bias in generalized anxiety disorder. *Behaviour research and therapy*, 33(8), pp.927-935.
- [83]. Kim, M.S. and Nam, T.C., 2006. Electroencephalography (EEG) spectral edge frequency for assessing the sedative effect of acupuncture in dogs. *Journal of Veterinary Medical Science*, 68(4), pp.409-411.
- [84]. Kis, A., Szakadát, S., Gácsi, M., Kovács, E., Simor, P., Török, C., Gombos, F., Bódizs, R. and Topál, J., 2017. The interrelated effect of sleep and learning in dogs (*Canis familiaris*); an EEG and behavioural study. *Scientific reports*, 7(1), pp.1-6.
- [85]. Wauquier, A., Van Den Broeck, W.A.E., Verheyen, J.L. and Janssen, P.A.J., 1978. Electroencephalographic study of the short-acting hypnotics etomidate and methohexital in dogs. *European journal of pharmacology*, 47(4), pp.367-377.
- [86]. Itamoto, K., Taura, Y., Wada, N., Taga, A., Takuma, T., Matsumura, H. and Miyara, T., 2001. Effect of medetomidine on electroencephalography and use of a quantitative electroencephalograph for evaluating sedation levels in dogs. *Journal of Veterinary Medicine Series A*, 48(9), pp.525-535.
- [87]. Partridge, B. and Rossmeisl Jr, J.H., 2020. Companion animal models of neurological disease. *Journal of neuroscience methods*, 331, p.108484.
- [88]. Dimpfel, W., 2013. Pharmacological classification of herbal extracts by means of comparison to spectral EEG signatures induced by synthetic drugs in the freely moving rat. *Journal of Ethnopharmacology*, 149(2), pp.583-589.

- [89]. Mathersul, D., Williams, L.M., Hopkinson, P.J. and Kemp, A.H., 2008. Investigating models of affect: relationships among EEG alpha asymmetry, depression, and anxiety. *Emotion*, 8(4), p.560.
- [90]. Babiloni, C., Sarà, M., Vecchio, F., Pistoia, F., Sebastiano, F., Onorati, P., Albertini, G., Pasqualetti, P., Cibelli, G., Buffo, P. and Rossini, P.M., 2009. Cortical sources of resting-state alpha rhythms are abnormal in persistent vegetative state patients. *Clinical Neurophysiology*, 120(4), pp.719-729.
- [91]. Jia, M. and Pittman, J., 2015. Deficits in striatal dopamine and hippocampal serotonin following induction of anxiety/depressive-like behaviors by bisphenol A. *Archives of Neuroscience*, 2(1).
- [92]. Mogg, K., Baldwin, D.S., Brodrick, P. and Bradley, B.P., 2004. Effect of short-term SSRI treatment on cognitive bias in generalised anxiety disorder. *Psychopharmacology*, 176(3), pp.466-470.
- [93]. Graimann, B., Allison, B.Z. and Pfurtscheller, G. eds., 2010. *Brain-computer interfaces: Revolutionizing human-computer interaction*. Springer Science & Business Media.
- [94]. Naderi, M., Salahinejad, A., Ferrari, M.C., Niyogi, S. and Chivers, D.P., 2018. Dopaminergic dysregulation and impaired associative learning behavior in zebrafish during chronic dietary exposure to selenium. *Environmental Pollution*, 237, pp.174-185.
- [95]. Rigoldi, C., Molteni, E., Rozbaczylo, C., Morante, M., Albertini, G., Bianchi, A.M. and Galli, M., 2012. Movement analysis and EEG recordings in children with hemiplegic cerebral palsy. *Experimental brain research*, 223(4), pp.517-524.
- [96]. Gross, J., 2014. Analytical methods and experimental approaches for electrophysiological studies of brain oscillations. *Journal of neuroscience methods*, 228, pp.57-66.
- [97]. Michel, C.M. and Murray, M.M., 2012. Towards the utilization of EEG as a brain imaging tool. *Neuroimage*, 61(2), pp.371-385.
- [98]. Sobnosky, J.L., 2014. Overview and management of anxiety disorders. *US Pharmacist*, 39(11), pp.56-62.

- [99]. DeLuca, D.C., Murphree, O.D. and Angel, C., 1974. Biochemistry of nervous dogs. *The Pavlovian journal of biological science: official journal of the Pavlovian*, 9(3), pp.136-148.
- [100]. Blumenthal, J.A. and Smith, P.J., 2010. Anxiety and risk of cardiac events. *Nature Reviews Cardiology*, 7(11), pp.606-608.
- [101]. Miller, A.H., 1998. Neuroendocrine and immune system interactions in stress and depression. *Psychiatric clinics of north america*, 21(2), pp.443-463.
- [102]. Scott, E., 2011. Cortisol and stress: How to stay healthy. *About. com*. Retrieved, 29.
- [103]. Taves, M.D., Gomez-Sanchez, C.E. and Soma, K.K., 2011. Extra-adrenal glucocorticoids and mineralocorticoids: evidence for local synthesis, regulation, and function. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 301(1), pp.E11-E24.
- [104]. Marieb, E.N. and Hoehn, K., 2007. *Human anatomy & physiology*. Pearson education.
- [105]. Herman, J.P., McKlveen, J.M., Ghosal, S., Kopp, B., Wulsin, A., Makinson, R., Scheimann, J. and Myers, B., 2016. Regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenocortical stress response. *Comprehensive physiology*, 6(2), p.603.
- [106]. Narmandakh, A., Roest, A.M., de Jonge, P. and Oldehinkel, A.J., 2021. Psychosocial and biological risk factors of anxiety disorders in adolescents: a TRAILS report. *European child & adolescent psychiatry*, 30(12), pp.1969-1982.
- [107]. Lim, I.S., 2018. Comparative analysis of the correlation between anxiety, salivary alpha amylase, cortisol levels, and athletes' performance in archery competitions. *Journal of exercise nutrition & biochemistry*, 22(4), p.69.
- [108]. Cervenka, S., Hedman, E., Ikoma, Y., Djurfeldt, D.R., Rück, C., Halldin, C. and Lindefors, N., 2012. Changes in dopamine D2-receptor binding are associated to symptom reduction after psychotherapy in social anxiety disorder. *Translational psychiatry*, 2(5), pp.e120-e120.

- [109]. Mathew, S.J., Coplan, J.D. and Gorman, J.M., 2001. Neurobiological mechanisms of social anxiety disorder. *American journal of psychiatry*, 158(10), pp.1558-1567.
- [110]. Freitas-Ferrari, M.C., Hallak, J.E., Trzesniak, C., Santos Filho, A., Machado-de-Sousa, J.P., Chagas, M.H.N., Nardi, A.E. and Crippa, J.A.S., 2010. Neuroimaging in social anxiety disorder: a systematic review of the literature. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 34(4), pp.565-580.
- [111]. Zarrindast, M.R. and Khakpai, F., 2015. The modulatory role of dopamine in anxiety-like behavior. *Archives of Iranian medicine*, 18(9), pp.0-0.
- [112]. Bystritsky, A., Khalsa, S.S., Cameron, M.E. and Schiffman, J., 2013. Current diagnosis and treatment of anxiety disorders. *Pharmacy and Therapeutics*, 38(1), p.30.
- [113]. Ascher, J.A., Cole, J.O., Colin, J.N., Feighner, J.P., Ferris, R.M., Fibiger, H.C., Golden, R.N., Martin, P., Potter, W.Z. and Richelson, E., 1995. Bupropion: a review of its mechanism of antidepressant activity. *The Journal of clinical psychiatry*.
- [114]. Bystritsky, A., Kerwin, L., Feusner, J.D. and Vapnik, T., 2008. A pilot controlled trial of bupropion XL versus escitalopram in generalized anxiety disorder. *Psychopharmacology Bulletin*, 41(1), pp.46-51.
- [115]. Żmudzka, E., Sałaciak, K., Sapa, J. and Pytka, K., 2018. Serotonin receptors in depression and anxiety: Insights from animal studies. *Life sciences*, 210, pp.106-124.
- [116]. Marcinkiewicz, C.A., Mazzone, C.M., D'Agostino, G., Halladay, L.R., Hardaway, J.A., DiBerto, J.F., Navarro, M., Burnham, N., Cristiano, C., Dorrier, C.E. and Tipton, G.J., 2016. Serotonin engages an anxiety and fear-promoting circuit in the extended amygdala. *Nature*, 537(7618), pp.97-101.
- [117]. Curran, K.P. and Chalasani, S.H., 2012. Serotonin circuits and anxiety: what can invertebrates teach us?. *Invertebrate Neuroscience*, 12(2), pp.81-92.

- [118]. Baldwin, D. and Rudge, S., 1995. The role of serotonin in depression and anxiety. *International clinical psychopharmacology*.
- [119]. Engvall, E. and Perlmann, P., 1972. Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA: III. Quantitation of specific antibodies by enzyme-labeled anti-immunoglobulin in antigen-coated tubes. *The Journal of Immunology*, 109(1), pp.129-135.
- [120]. Sakamoto, S., Putalun, W., Vimolmangkang, S., Phoolcharoen, W., Shoyama, Y., Tanaka, H. and Morimoto, S., 2018. Enzyme-linked immunosorbent assay for the quantitative/qualitative analysis of plant secondary metabolites. *Journal of natural medicines*, 72(1), pp.32-42.
- [121]. Wikipedia Contributors (2019b). ELISA. [online] Wikipedia. Available at: <https://en.wikipedia.org/wiki/ELISA> [Ziyaret tarihi: 20 Ağustos 2022].
- [122]. Hosseini, S., Vázquez-Villegas, P., Rito-Palomares, M. and Martinez-Chapa, S.O., 2018. Advantages, disadvantages and modifications of conventional ELISA. In *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)* (pp. 67-115). Springer, Singapore.
- [123]. MBL (2017). *The principle and method of ELISA* | MBL Life Science -JAPAN-. [online] Mbl.co.jp. Available at: <https://ruo.mbl.co.jp/bio/e/support/method/elisa.html> [Ziyaret tarihi: 26 Ağustos 2022].
- [124]. Liu, L., Liu, C., Wang, Y., Wang, P., Li, Y. and Li, B., 2015. Herbal medicine for anxiety, depression and insomnia. *Current neuropharmacology*, 13(4), pp.481-493.
- [125]. McIntyre, E., Saliba, A.J. and Moran, C.C., 2015. Herbal medicine use in adults who experience anxiety: A qualitative exploration. *International journal of qualitative studies on health and well-being*, 10(1), p.29275.
- [126]. Lakhan, S.E. and Vieira, K.F., 2010. Nutritional and herbal supplements for anxiety and anxiety-related disorders: systematic review. *Nutrition journal*, 9(1), pp.1-14.

- [127]. Spelman, K., Sutherland, E. and Bagade, A., 2017. Neurological activity of Lion's mane (*Heridium erinaceus*). *Journal of Restorative Medicine*, 6(1), pp.19-26.
- [128]. Li, T.J., Lee, T.Y., Lo, Y., Lee, L.Y., Li, I., Chen, C.C. and Chang, F.C., 2021. *Heridium erinaceus* mycelium ameliorate anxiety induced by continuous sleep disturbance in vivo. *BMC complementary medicine and therapies*, 21(1), pp.1-10.
- [129]. Chong, P.S., Fung, M.L., Wong, K.H. and Lim, L.W., 2019. Therapeutic potential of *Heridium erinaceus* for depressive disorder. *International journal of molecular sciences*, 21(1), p.163.
- [130]. Nagano, M., Shimizu, K., Kondo, R., Hayashi, C., Sato, D., Kitagawa, K. and Ohnuki, K., 2010. Reduction of depression and anxiety by 4 weeks *Heridium erinaceus* intake. *Biomedical Research*, 31(4), pp.231-237.
- [131]. Ryu, S., Kim, H.G., Kim, J.Y., Kim, S.Y. and Cho, K.O., 2018. *Heridium erinaceus* extract reduces anxiety and depressive behaviors by promoting hippocampal neurogenesis in the adult mouse brain. *Journal of medicinal food*, 21(2), pp.174-180.
- [132]. Li, I.C., Chen, Y.L., Lee, L.Y., Chen, W.P., Tsai, Y.T., Chen, C.C. and Chen, C.S., 2014. Evaluation of the toxicological safety of erinacine A-enriched *Heridium erinaceus* in a 28-day oral feeding study in Sprague–Dawley rats. *Food and chemical toxicology*, 70, pp.61-67.
- [133]. Jang, H.J., Kim, J.E., Jeong, K.H., Lim, S.C., Kim, S.Y. and Cho, K.O., 2019. The neuroprotective effect of *Heridium erinaceus* extracts in mouse hippocampus after pilocarpine-induced status epilepticus. *International journal of molecular sciences*, 20(4), p.859.
- [134]. Orhan, I.E., 2021. A review focused on molecular mechanisms of anxiolytic effect of *Valeriana officinalis* L. in connection with its phytochemistry through in vitro/in vivo studies. *Current Pharmaceutical Design*, 27(28), pp.3084-3090.
- [135]. Del Valle-Mojica, L.M. and Ortíz, J.G., 2012. Anxiolytic properties of *valeriana officinalis* in the zebrafish: a possible role for metabotropic glutamate receptors. *Planta medica*, 78(16), pp.1719-1724.

- [136]. Al-Attraqchi, O.H., Deb, P.K. and Al-Attraqchi, N.H.A., 2020. Review of the Phytochemistry and Pharmacological Properties of *Valeriana officinalis*. *Current Traditional Medicine*, 6(4), pp.260-277.
- [137]. Neuhaus, W., Trauner, G., Gruber, D., Oelzant, S., Klepal, W., Kopp, B. and Noe, C.R., 2008. Transport of a GABAA Receptor Modulator and Its Derivatives from *Valeriana officinalis* L. s. l. Across an in Vitro Cell Culture Model of the Blood-Brain Barrier. *Planta medica*, 74(11), pp.1338-1344.
- [138]. Murphy, K., Kubin, Z.J., Shepherd, J.N. and Ettinger, R., 2010. *Valeriana officinalis* root extracts have potent anxiolytic effects in laboratory rats. *Phytomedicine*, 17(8-9), pp.674-678.
- [139]. Becker, A., Felgentreff, F., Schröder, H., Meier, B. and Brattström, A., 2014. The anxiolytic effects of a Valerian extract is based on valerenic acid. *BMC complementary and alternative medicine*, 14(1), pp.1-5.
- [140]. Felgentreff, F., Becker, A., Meier, B. and Brattström, A., 2012. Valerian extract characterized by high valerenic acid and low acetoxy valerenic acid contents demonstrates anxiolytic activity. *Phytomedicine*, 19(13), pp.1216-1222.
- [141]. Khajehpour, L., Moosapour, S.F. and Seyyednejad, S.M., 2014. The involvement of adrenergic system in the anxiolytic effect of hydroalcoholic extract of *Valeriana officinalis* in male mice.
- [142]. Aryal, S., Baniya, M.K., Danekhu, K., Kunwar, P., Gurung, R. and Koirala, N., 2019. Total phenolic content, flavonoid content and antioxidant potential of wild vegetables from Western Nepal. *Plants*, 8(4), p.96.
- [143]. Shrestha, P.M. and Dhillon, S.S., 2006. Diversity and traditional knowledge concerning wild food species in a locally managed forest in Nepal. *Agroforestry Systems*, 66(1), pp.55-63.
- [144]. Rababah, T.M., Ereifej, K.I., Esah, R.B., Al-u'datt, M.H., Alrababah, M.A. and Yang, W., 2011. Antioxidant activities, total phenolics and HPLC analyses of the phenolic compounds of extracts from common Mediterranean plants. *Natural product research*, 25(6), pp.596-605.

- [145]. Liu, S., Chang, X., Liu, X. and Shen, Z., 2016. Effects of pretreatments on anthocyanin composition, phenolics contents and antioxidant capacities during fermentation of hawthorn (*Crataegus pinnatifida*) drink. *Food chemistry*, 212, pp.87-95.
- [146]. Harris, D.C., 2010. *Quantitative chemical analysis*. Macmillan.
- [147]. Tom, J., 2021. UV-Vis Spectroscopy: Principle, Strengths and Limitations and Application. *Technol. Netw. Anal*, pp.1-20.
- [148]. Lawson-Wood, K., Robertson, I. and Green, S., 2015. Determination of Wine Color and Total Phenol Content Using the LAMBDA PDA UV/Vis Spectrophotometers.
- [149]. Pellegrino, F.C. and Sica, R.E., 2004. Canine electroencephalographic recording technique: findings in normal and epileptic dogs. *Clinical Neurophysiology*, 115(2), pp.477-487.
- [150]. Celly, C.S., McDonell, W.N., Young, S.S. and Black, W.D., 1997. The comparative hypoxaemic effect of four α_2 adrenoceptor agonists (xylazine, romifidine, detomidine and medetomidine) in sheep. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 20(6), pp.464-471.
- [151]. Casanave, E.B. and Affanni, J.M., 1994. Body temperature of the armadillo *Chaetophractus villosus* (Mammalia, Dasypodidae). *Archives internationales de physiologie, de biochimie et de biophysique*, 102(5), pp.243-246.
- [152]. Steiss, J.E., 1988. A survey of current techniques in veterinary electrodiagnostics: EEG, spinal evoked and brainstem auditory evoked potential recording. *Veterinary Research Communications*, 12(4), pp.281-288.
- [153]. James, F.M.K., Cortez, M.A., Monteith, G., Jokinen, T.S., Sanders, S., Wielaender, F., Fischer, A. and Lohi, H., 2017. Diagnostic utility of wireless video-electroencephalography in unsedated dogs. *Journal of veterinary internal medicine*, 31(5), pp.1469-1476.
- [154]. Barahona-Pereira, D., 2016. Evaluation of feature extraction techniques for an Internet of Things Electroencephalogram.

- [155]. Ryynanen, O.R.M., Hyttinen, J.A., Laarne, P.H. and Malmivuo, J.A., 2004. Effect of electrode density and measurement noise on the spatial resolution of cortical potential distribution. *IEEE transactions on biomedical engineering*, 51(9), pp.1547-1554.
- [156]. da Silva, F.L., 2013. EEG and MEG: relevance to neuroscience. *Neuron*, 80(5), pp.1112-1128.
- [157]. Hoehn-Saric, R., 1982. Neurotransmitters in anxiety. *Archives of General Psychiatry*, 39(6), pp.735-742.
- [158]. Bremner, J.D. and Pearce, B., 2016. Neurotransmitter, neurohormonal, and neuropeptidal function in stress and PTSD. *Posttraumatic Stress Disorder*, pp.179-232.
- [159]. Liu, Y., Zhao, J. and Guo, W., 2018. Emotional roles of mono-aminergic neurotransmitters in major depressive disorder and anxiety disorders. *Frontiers in psychology*, 9, p.2201.
- [160]. Aryal, S. (2022). Competitive ELISA Protocol and Animation. [online] Microbe Notes. Available at: <https://microbenotes.com/competitive-elisa-protocol-and-animation> [Ziyaret tarihi: 20 Ağustos 2022].
- [161]. Shahidi, S., Bathaei, A. and Pahlevani, P., 2013. Antinociceptive effects of Valeriana extract in mice: Involvement of the dopaminergic and serotonergic systems. *Neurophysiology*, 45(5), pp.448-452.
- [162]. Chong, P.S., Fung, M.L., Wong, K.H. and Lim, L.W., 2019. Therapeutic potential of *Herichium erinaceus* for depressive disorder. *International journal of molecular sciences*, 21(1), p.163.
- [163]. Al-Ezzi, A., Kamel, N., Faye, I. and Ebenezer, E.G.M., 2020, August. EEG frontal theta-beta ratio and frontal midline theta for the assessment of social anxiety disorder. In *2020 10th IEEE International Conference on Control System, Computing and Engineering (ICCSCE)* (pp. 107-112). IEEE.
- [164]. Li, Z., Wu, X., Xu, X., Wang, H., Guo, Z., Zhan, Z. and Yao, L., 2019. The recognition of multiple anxiety levels based on electroencephalograph. *IEEE Transactions on Affective Computing*.

- [165]. Díaz, H., Cid, F.M., Otárola, J., Rojas, R., Alarcón, O. and Cañete, L., 2019. EEG Beta band frequency domain evaluation for assessing stress and anxiety in resting, eyes closed, basal conditions. *Procedia Computer Science*, 162, pp.974-981.
- [166]. Delorme, A. and Makeig, S., 2004. EEGLAB: an open source toolbox for analysis of single-trial EEG dynamics including independent component analysis. *Journal of neuroscience methods*, 134(1), pp.9-21.
- [167]. Wijaya, C.S., Lee, J.J., Husain, S.F., Ho, C.S., McIntyre, R.S., Tam, W.W. and Ho, R.C., 2018. Differentiating medicated patients suffering from major depressive disorder from healthy controls by spot urine measurement of monoamines and steroid hormones. *International journal of environmental research and public health*, 15(5), p.865.
- [168]. Shabani, S., Dehghani, M., Hedayati, M. and Rezaei, O., 2011. Relationship of serum serotonin and salivary cortisol with sensation seeking. *International Journal of Psychophysiology*, 81(3), pp.225-229.
- [169]. De La Garza II, R. and Mahoney III, J.J., 2004. A distinct neurochemical profile in WKY rats at baseline and in response to acute stress: implications for animal models of anxiety and depression. *Brain research*, 1021(2), pp.209-218.

EKLER

EK 1. Onam Belgesi

....../....../....

ONAM BELGESİ

İlgili bilgileri belirtilmiş olan hayvanıma, adı-soyadı ve diploma numarası aşağıda bulunan Veteriner Hekim'in önerileri doğrultusunda gerçekleştirilecek tüm girişimleri ve sonrasında oluşabilecek komplikasyonlardan doğabilecek olumsuz tüm sonuçları kabul ediyorum.

Hastanın;

Adı:

Türü:

İrki:

Yaşı:

Cinsiyeti:

Hasta Sahibinin:

Adı:

Soyadı:

Adresi:

Telefon numarası:

İmzası:

Veteriner Hekimin:

Adı:

Soyadı:

Diploma Numarası:

İmzası:

EK 3. İlaç Kullanım Takip Formu

İLAÇ KULLANIM TAKİBİ			
İSİM VE DOZAJ :			
GÜNLER	Başlangıç Tarihi:		Ekstrakt İsmi:
1			
2			
3			
4			
5			
6			
7			
8			
9			
10			
11			
12			
13			
14			
15			
16			
17			
18			
19			
20			
21			
22			
23			
24			
25			
26			
27			
28			

EK 4. Anket Formu

ANKET FORMU

Bu anket formunda sizlerden edinilecek bilgiler tamamen bilimsel amaçlı kullanılacaktır. Katkılarınız bizim için önemlidir. Şimdiden değerli katkılarınızdan dolayı teşekkür ederiz.

1	Protokol Numarası	
---	-------------------	--

Hastaya ait bilgiler

1	Ad	
2	İrk	
3	Cinsiyet	
4	Yaş	

Lütfen köpeğinizde görülen durumları yoğunluklarına göre 0 ile 3 arasında puanlayınız. Hiç yok(0), Nadiren(1), Genellikle(2), Sürekli(3)

SORU NO		0	1	2	3
1	Korku durumu	()	()	()	()
2	Aşırı aktivite	()	()	()	()
3	İnsanlara yönelik saldırganlık	()	()	()	()
4	Köpeklerle veya diğer hayvanlara yönelik saldırganlık	()	()	()	()
5	Nefes nefese kalma durumu	()	()	()	()
6	Aşırı havlama, uluma	()	()	()	()
7	Çevresindeki nesnelere zarar verme	()	()	()	()
8	Uygunsuz idrar/dışkı yapımı (ev kirliliği)	()	()	()	()
9	Cinsel davranış sorunları	()	()	()	()
10	Kaprofaji (dışkı yenilmesi)	()	()	()	()
11	Başboşluk	()	()	()	()
12	Utangaçlık	()	()	()	()
13	Kendi kendine zarar verme	()	()	()	()
14	Aşırı tükürük salgısı	()	()	()	()
15	Yemek yememe durumu	()	()	()	()

EK 5. Hericium Erinaceus Analiz Formu



Certificate of Analysis

Material Name	Hericium Extract	Report No	331127/466
Botanical Name	Hericium erinaceus	Production Date	22.03.2021
Party/Lot Number	331127	Exp.Date	22.03.2024
Material	Herbal Extract 100%	Type of extraction	Water/Alcohol
Plant of Material	Mushroom	Form	Powder

ANALYSIS	SPECIFICATION	TEST METHOD	RESULT
	DER 10 to 1 Ratio Form	Organoleptic	Conforms
Physical Control			
Characters/Appearance	Fine Yellow to Brown Powder	Visual	Conforms
Taste	Characteristic	Organoleptic	Conforms
Odor	Characteristic	Organoleptic	Conforms
Mesh Size/Sieve Analysis	N98% Pass 80mesh	Eu.Pharm.v.v.(2.9.12)	80mesh
Solubility	Aqua	Visual	Conforms
Loss on Drying	NMT<10.0%	Eu.Pharm.v.v.(2.8.17)	2,30
Chemical Control			
Heavy Metals	10ppm Max	Eu.Pharm.v.v.(2.4.27)	Conforms
Arsenic(As)	NMT2ppm	Eu.Pharm.v.v.(2.4.27)	Conforms
Lead(Pb)	NMT1ppm	Eu.Pharm.v.v.(2.4.27)	Conforms
Cadmium (Cd)	NMT1ppm	Eu.Pharm.v.v.(2.4.27)	Conforms
Solvent Residues:	Complies with BP	EP9.0<2.4.24> {Eu.Pharm.v.v.(2.4.24)}	Conforms
Pesticide residues	Complies with BP	DFG-S19	Conforms
Aflatoxins	Complies with USP	USP39<S61>	Conforms
Microbiology Control		Specification	Method
Total Plate Count		Max 1000cfu/g	Eu.Pharm.v.v.(2.6.12) <1000cfu/g
Total Yeast & Mold		Max 100cfu/g	Eu.Pharm.v.v.(2.6.12) <100cfu/g
E.Coli		Negative	Eu.Pharm.v.v.(2.6.31) Negative
Salmonella		Negative	Eu.Pharm.v.v.(2.6.31) Negative
Staphylococcus		Negative	Eu.Pharm.v.v.(2.6.31) Negative
Packing&Storage		Packed in 25kg bags inside in box.Store in a well closed container away from moisture.	
Shelf Life		Three years if sealed and store away from direct sun light.(Temperature:15-20C)	
		ISO 9001:2008 ISO 22701:2007 /GMP	
		Naturallya®Chemistry Antalya/TURKEY www.naturallykimya.com	
<i>This document(in full/ a part) cannot be reproduced and used for any informal purpose or without a written permission of NATURALYA.It cannot be written on any product label.NATURALYA keep all legal against any violation. This report can not be used for legal & administrative operations and advertising purposes.Reports are invalid without signature and seal.</i> 			

EK 6. Valeriana Officinalis Analiz Formu



refine
refined nature, better life

Beijing Refine Biology Co., Ltd.

Room 4212, B2, Dingsheng Science & Technology Park,
Haidian District, Beijing 100192, China

T (+86) 10-82155001 F (+86) 10-82414660
www.refinebiology.com

Certificate of Analysis

Product name:	Valerian Extract	Botanic Name:	<i>Valeriana officinalis</i>
Batch No.:	RFXC20200630	Manufacture Date:	2020-06-30
Part Used:	2000kg	Expiration Date:	2022-06-29
Batch Quantity:	Root	Extract Solvent	Ethanol & Water

Item	Specification	Result	Method
Identification	Positive	Conforms	TLC-USP40
Assay	Valerianic Acid $\geq 0.8\%$	0.83%	HPLC
Appearance	Brown fine powder	Conforms	Visual
Odor & Taste	Characteristic	Conforms	Organoleptic
Physical Characteristics			
Particle Size	NLT99%Through 80mesh	Conforms	80 Mesh Sieve
Loss on Drying	$\leq 5.0\%$	2.29%	USP40-NSF35<731>
Ash Content	$\leq 5.0\%$	2.31%	USP40-NSF35<281>
Heavy Metals	$<10\text{ppm}$	Conforms	USP40-NF35<231>
Arsenic (As)	$<2\text{ppm}$	Conforms	ICP-MS
Lead (Pb)	$<3\text{ppm}$	Conforms	ICP-MS
Mercury (Hg)	$<0.1\text{ppm}$	Conforms	ICP-MS
Cadmium(Cd)	$<1\text{ppm}$	Conforms	ICP-MS
Microbiological Tests			
Total Plate Count	$\leq 1,000\text{cfu/g}$	Conforms	USP40-NF35<2021>
Total Yeast&Mold	$\leq 100\text{cfu/g}$	Conforms	USP40-NF35<2021>
E.Coli	Negative	Conforms	USP40-NF35<2021>
Salmonella	Negative	Conforms	USP40-NF35<2021>

Storage Store in Cool & dry place. Keep away from strong light and heat

Shelf Life 24 months if sealed and stored properly.

Tested by: Wei Qian

Date: 2020-07-12

İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI

ANKSİYETELİ KÖPEKLERDE HERİCIUM ERİNACEUS ve
VALERİANA OFFİCİNALİS KULLANIMININ ETKİLERİNİN
ELEKTROENSEFALOGRAFİ YÖNTEMİ İLE ARAŞTIRILMASI

ORJİNALLIK RAPORU

% 9	% 7	% 1	% 4
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	Submitted to The Scientific & Technological Research Council of Turkey (TUBITAK) Öğrenci Ödevi	% 2
2	acikbilim.yok.gov.tr İnternet Kaynağı	% 1
3	www.cafemedyam.com İnternet Kaynağı	% 1
4	Submitted to Eskisehir Osmangazi University Öğrenci Ödevi	<% 1
5	www.openaccess.hacettepe.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	<% 1
6	acikerisim.pau.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	<% 1
7	avesis.istanbulc.edu.tr İnternet Kaynağı	<% 1
8	Submitted to Dumlupinar University Öğrenci Ödevi	<% 1

ETİK KURUL İZİN YAZISI

Uyarı: Canlı denekler üzerinde yapılan tüm araştırmalar için Etik Kurul Belgesi alınması zorunludur.

- ☒ Etik Kurul izni gerekmektedir.
- ☐ Etik Kurul izni gerekmemektedir.

Çağın ÇEVİK



KURUM İZNİ YAZILARI

Uyarı: Canlı ve cansız deneklerle yapılan tüm çalışmalar için kurum izin belgelerinin eklenmesi zorunludur. Gizlilik ve mahremiyet içeren durumlarda kurum adı kapatılmalıdır.

- ☒ Kurum izni gerekmektedir.
- ☐ Kurum izni gerekmemektedir.

Çağın ÇEVİK

