



# Sıçanlarda Kronik Öngörülemez Hafif Stres Kaynaklı Depresyon Modelinde Propolisin Antidepresan Etkisinin Değerlendirilmesi

## Evaluation of the Antidepressant Effect of Propolis in Chronic Unpredictable Mild Stress-Induced Depression Model in Rats

Ali TAŞKIRAN<sup>1</sup>, Fadime CANBOLAT<sup>2</sup>, Sena Nur YÜCELLİ<sup>3</sup>, Burcu ÇEVRELİ<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Üsküdar Üniversitesi Tıp Fakültesi, Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

<sup>2</sup>Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu, Eczacılık Hizmetleri Bölümü, Çanakkale, Türkiye

<sup>3</sup>Pavia Üniversitesi, Beşeri Bilimler ve Yaşam Bilimleri Bölümü, Pavia, İtalya

<sup>4</sup>Üsküdar Üniversitesi, Nöropsikofarmakoloji Araştırma ve Uygulama Merkezi, İstanbul, Türkiye

### ÖZ

**Amaç:** Bu çalışmada, sıçanlarda kronik öngörülemez depresyon modelinde propolisin antidepresan etkisi araştırıldı.

**Gereç ve Yöntem:** Çalışmada Wistar-Albino erkek ratlar kullanıldı ve propolis, stres, stres + propolis, ve kontrol olmak üzere 4 gruba ayrıldı. Her gruba sekiz hayvan atandı. Deney protokolü stres gruplarına 60 gün süreyle uygulandı ve hayvanlar farklı stresörlere maruz bırakıldı. Propolis ekstresi (100 mg/kg) propolis ve stres+propolis gruplarına deney protokolü boyunca oral yoldan verildi. Depresyon modellemesi sonucunda davranışsal değerlendirme için Zorunlu Yüzme Testi, Sükröz Tercih Testi ve Yükseltilmiş Artı Labirent Testi uygulandı. Sıvı kromatografi-tandem kütle spektrometresi yöntemi ile idrarda serotonin 5-hidroksi triptamin (5-HT) ve metaboliti 5-hidroksi indol asetik asidin (5-HIAA) miktarsal analizi için 24 saatlik idrar örnekleri toplandı. Deney işlemi sonucunda hayvanlar sakrifiye edildi.

**Bulgular:** Gruplar arasında davranış testleri açısından istatistiksel olarak anlamlı fark olduğu görüldü ( $p<0,05$ ). Sıçanlara stres altında propolis verilmesinin sıçanlarda şeker tüketimini değiştirdiği gösterildi ( $p<0,05$ ). Zorunlu Yüzme Testi için, stres grubu ile diğer gruplar arasında istatistiksel olarak fark vardı. 5-HT ve 5-HIAA düzeyleri için gruplar arasında anlamlı fark yoktu ( $p>0,05$ ).

**Sonuç:** Bulgular, propolis özütünün antidepresan benzeri etkileri sayesinde depresyonu önlemeye yardımcı olabileceğini göstermiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Serotonin, depresyon, propolis, kronik öngörülemez stres modeli

### ABSTRACT

**Aim:** In this study, the antidepressant effect of propolis was investigated in a model of chronic unpredictable depression in rats.

**Materials and Methods:** Wistar-Albino male rats were used in the study and were divided into four groups as propolis, stress, stress + propolis, and control groups. Eight animals were assigned to each group. The experimental protocol was applied to the stress groups for 60 days, and the animals were exposed to different stressors. Propolis extract (100 mg/kg) was administered orally to propolis and stress + propolis groups throughout the experimental protocol. As a result of depression modeling, the Forced Swimming Test, Sucrose Preference Test, and Elevated Plus Maze Test were applied for behavioral evaluation. Twenty-four hour urine samples were collected for quantitative analysis of serotonin 5-hydroxytryptamine (5-HT) and its metabolite 5-hydroxy indole acetic acid (5-HIAA) in urine by liquid chromatography-tandem mass spectrometry method. The animals were sacrificed as a result of the experiment process.

**Results:** It was seen that there was a statistical difference for behavioral tests between the groups ( $p<0.05$ ). The administration of propolis to rats under stress has been shown to alter sugar consumption in rats ( $p<0.05$ ). For Forced Swimming Test, there was a statistical difference between the stress group and the other groups. For 5-HT and 5-HIAA levels, there was no significant difference between the groups ( $p>0.05$ ).

**Conclusion:** The findings have shown that propolis extract may help to prevent depression, thanks to its antidepressant-like effects.

**Keywords:** Serotonin, depression, propolis, chronic unpredictable stress model

**Yazışma Adresi/Address for Correspondence:** Dr. Fadime CANBOLAT Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu, Eczacılık Hizmetleri Bölümü, Çanakkale, Türkiye

**Tel.:** +90 530 492 33 03 **E-posta:** fadime.canbolat@com.edu.tr **ORCID ID:** orcid.org/0000-0001-6759-7735

**Geliş tarihi/Received:** 22.03.2024 **Kabul tarihi/Accepted:** 07.05.2024



©Telif Hakkı 2024 Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi / Namık Kemal Tıp Dergisi, Galenos Yayinevi tarafından yayınlanmıştır.  
©Copyright 2024 by Tekirdağ Namık Kemal University / Namık Kemal Medical Journal is published by Galenos Publishing House.  
Creative Commons Atıf-GayriTicari-Türetilemez 4.0 (CC BY-NC-ND) Uluslararası Lisansı ile lisanslanmıştır.

## GİRİŞ

Depresyon, toplumda en yaygın görülen duygu durum bozukluklarından biridir. Aynı zamanda, eşlik eden diğer tıbbi bozukluklardan kaynaklanan yüksek ölüm tehdidiyle ilişkili yaygın bir sağlık sorunudur. Depresyon uyanıklık ya da aşırı uyku hali, yorgunluk ya da enerji kaybı, kontrol duygusunun kaybı ve büyük bir işkencenin özel olarak deneyimlenmesi ile karakterize edilir. Kişinin düşünme ve performans süreçlerini etkileyerek sosyal rolünü ve üretkenliğini büyük ölçüde azaltır<sup>1</sup>.

Depresyonun temel fizyolojisi ve patofizyolojisi incelendiğinde beyindeki bazı nörotransmitterlerin bu süreçte doğrudan etkin olduğu görülmüştür. Depresif duygu durumlarında serotonin 5-hidroksi triptamin (5-HT), dopamin ve noradrenalin nörotransmitterlerinin kritik seviyelere düştüğü ve bu kimyasalların çalışma mekanizmalarının sekteye uğradığı bilinmektedir. Bu bakış açısıyla geliştirilen antidepresan ilaç tedavileri, beyindeki bu nörotransmitterlerin seviyelerini sağlıklı duygu durum seviyelerine çıkarmak ve çeşitli inhibisyon ve aktivasyon süreçlerini kontrol etmekle görevlidir<sup>2</sup>.

Son yıllarda mevcut ilaç tedavilerinin yanı sıra alternatif tıp uygulamalarının da tedavi seçeneği olarak kullanıldığı görülmektedir. Bu durumun nedenlerinin alternatif tıp uygulamaları ile kimyasal hasarın azaltılması, tedavi için gerekli ilaca ulaşmada yaşanan sorunlar ve depresyon gibi komorbiditesi yüksek hastalıklarda alternatif tıp uygulamalarının kullanılarak daha az ilaçla tedavi sürecinin sağlanması olduğu düşünülmektedir<sup>3</sup>.

Arı ürünleri arasında üzerinde en çok çalışılan madde olan propolis, vücuda birçok yönden fayda sağlayan bir ürün olarak biliniyor. Propolisin bir tedavi aracı olarak kullanım alanlarına bakıldığında kanser, nörolojik rahatsızlıklar, diş hekimliği, kardiyovasküler, sindirim ve dermatolojik hastalıklarda bir tedavi seçeneği olarak kullanıldığı görülmüştür. Propolis bileşenlerinin (kafeik asit fenetil ester, flavonoidler), indüklenmiş iskemi modelinde ve Alzheimer hastalığı da dahil olmak üzere nörodejeneratif bozukluklarda oksidatif hasara karşı nöroprotektif etkiler gösterdiği bilinmektedir<sup>4</sup>. Merkezi sinir sistemi (MSS) üzerindeki etkisi ile ilgili olarak, çeşitli çalışmalar propolisin hem in vitro hem de in vivo modellerde nöroprotektif etkilere sahip olduğunu öne sürmüştür. Bununla birlikte, propolisin MSS üzerindeki depresan ve anksiyolitik etkileri gibi etkileri yeterince rapor edilmemiştir<sup>5</sup>. Bu nedenle, propolisin davranış ve ruh halini değiştirme ve nörotransmitter seviyeleri üzerindeki etkisinin araştırılması, depresyon ile ilişkisini tanımlamak için önemli görülmektedir. Apiterapi ve fitoterapi gibi alternatif tıp uygulama alanlarının kanıtlanmış aktiviteler sunmasının çok önemli bir gereklilik olduğu bilindiğinden, bu tür çalışmaların hem yeni sonuçlar elde edilmesi hem de mevcut araştırmaları destekleyen sonuçlar sunulması bilimsel açıdan çok değerlidir<sup>6</sup>.

Bu bilgiler göz önünde bulundurularak, bu çalışmada sıçanlarda kronik öngörülemez depresyon modeli kullanılarak propolisin antidepresan etkisinin araştırılması amaçlanmıştır. Deneysel prosedürde sunulan stres faktörlerine maruz kalan hayvanların davranışları, mevcut ruh halleriyle orantılı olarak, belirlenen davranış testleriyle incelenmiş ve hayvanlardan toplanan idrar örneklerinde 5-HT ve metaboliti 5-hidroksi indol asetik asit (5-HIAA) seviyeleri karşılaştırılmıştır.

## GEREÇ VE YÖNTEM

### Kimyasallar

Deneysel süreçte kullanılan %12'lik sukroz çözeltisi Bilgi Kimyevi Laboratuvar Ürünleri İmalat Danışmanlık Analiz Hizmetleri Sanayi ve Ticaret Limited Şirketi'nden (İstanbul, Türkiye) temin edilmiştir. İdrarda 5-HT ve metaboliti 5-HIAA'yı belirlemek için CE-IVD sertifikalı ve valide edilmiş Jasem HVA-VMA-5HIAA in Urine LC-MS/MS Analiz Kiti kullanılmıştır (Sem Laboratuvar Cihazları Pazarlama San. ve Tic. A.Ş., İstanbul, Türkiye). Gliserin (E422) ve propolis ekstraktı (96 mg) Aksu Vital Doğal Ürünler Anonim Şirketi'nden (İstanbul, Türkiye) temin edilerek deneysel süreçte kullanılmak üzere 50 ml'lik cam şişelerde (%192; m/v) propolis ekstraktı hazırlanmıştır. Diğer kimyasallar Sigma-Aldrich, Amerika Birleşik Devletleri' den temin edilmiştir.

### Hayvanlar

Bu çalışmada 12-16 haftalık ve 300-400 g ağırlığında Wistar albino sıçanlar kullanılmıştır. Sıçanlar sıcaklık ve ışık kontrollü bir odada barındırıldı (12 saat karanlık-aydınlık döngüsü, 22±2 °C ve nem oranı %60±5). Tüm hayvanlar su ve pelet mamaya serbestçe erişebilmiş ve deneyler ulusal yasa ve kılavuzlara göre gerçekleştirilmiştir. Laboratuvar Hayvanları Bakım ve Kullanım Kılavuzu dikkate alınmıştır. Bu çalışmada kullanılan protokol Üsküdar Üniversitesi Hayvan Deneyleri Etik Kurulu (ÜÜ-HADYEK) İstanbul, tarafından onaylanmıştır (karar no: 2020-17, tarih: 22.01.2021).

### Deneysel Tasarım

Bu çalışmada, 32 sıçan her grupta sekiz adet olmak üzere dört gruba ayrılmıştır. Kontrol grubu için, grup hayvanlarına 60 gün boyunca gavaj yoluyla 0,4 mL salin (%0,9 NaCl) uygulanmıştır. Propolis grubunda, 0,4 mL/gün (~ 100 mg/kg) propolis ekstraktı (%192; m/v) grup hayvanlarına 60 gün boyunca günlük olarak gavaj yoluyla uygulanmıştır. Verilen propolis dozu (100 mg/kg) benzer bir çalışma<sup>7</sup> dikkate alınarak belirlenmiştir. Stres grubundaki hayvanlar 60 gün boyunca çeşitli stres faktörlerine maruz bırakılmıştır. Aynı zamanda, gruptaki hayvanlara 0,4 mL fizyolojik tuzlu su (%0,9 NaCl) gavaj yoluyla uygulanmıştır. Stres + propolis grubunda, 0,4 mL/gün (~ 100 mg/kg) propolis ekstraktı (%192; m/v) 60 gün boyunca günlük olarak hayvanlara gavaj yoluyla uygulanmıştır. Aynı zamanda, grup hayvanları 60 gün boyunca çeşitli stres faktörlerine maruz bırakılmıştır.

## Depresyon Modeli ve Davranışsal Testler

### Kronik Öngörülemez Stres Modeli

Çalışmada depresyon modeli olarak López-López ve ark.<sup>8</sup> tarafından tanımlanan kronik öngörülemez stres prosedürü uygulanmıştır. Yem kısıtlaması (12 saat), su kısıtlaması (12 saat), sürekli ışık (24 saat), kalabalık kafes (24 saat), stres faktörü uygulanmaması (24 saat), soğuk suda yüzdürme (15 dakika), hareketsiz bırakma (1,5-2 saat), yalıtım (24-48 saat), ıslak talaş (12 saat), kafesin 45° eğilmesi (5 saat), yabancı cisim (5 saat) ve hayvanların kafesler arasında değiştirilmesi (12-24 saat) şeklinde uygulanmıştır.

Yukarıda belirtilen stres prosedürü stres ve stres + propolis grubu deney hayvanlarına 60 gün boyunca her gün uygulanmıştır. Her bir stres prosedürü 8-10 kez uygulanmıştır. Deney hayvanlarının uygulanan stres prosedürünü tahmin etmelerini önlemek için aynı prosedür arka arkaya uygulanmamaya çalışılmıştır. Ayrıca stres prosedürü günün farklı saatlerinde uygulanmıştır. Sıçanların vücut ağırlıkları stres modeline başlamadan önce ve 60 gün maruz kaldıktan sonra belirlenmiştir.

### Zorunlu Yüzme Testi

40 cm yüksekliğinde ve 20 cm çapında silindirik cam kap 30 cm'ye kadar su ile doldurulmuştur. Suyun sıcaklığı 24-26 °C'de tutulmuştur. Tüm gruplardaki hayvanların deney ortamına uyum sağlamaları ve öğrenmeleri için ilk gün 15 dakika yüzmelerine izin verilmiş, ardından kurulanıp tekrar kafeslerine yerleştirilmişlerdir. 24 saat sonra deneklerin beş dakika yüzmelerine izin verilmiştir<sup>9</sup>. Toplam süre boyunca hayvanların hareketsizlik (sadece başın suyun üzerinde olduğu ancak hareketsiz olduğu yüzme periyotları), yüzme ve tırmanma hareketlerini puanlamak için video kaydı yapılmıştır. Kayıtlar, tarafsız bir gözlemci tarafından 5 saniyelik aralıklarla puanlanarak (yüzme, tırmanma ve hareketsizlik) hesaplanmıştır<sup>10</sup>. Kaptaki su her hayvandan sonra değiştirildi. Fenerden alınan hayvanlar kurutulmuş ve sıcak bir kafese getirilmiştir. Sıçanların uzun süreli hareketsizliği, depresyonun önemli belirteçlerinden biri olan çaresizlik davranışı ile ilişkilidir, ancak depresyon benzeri bir davranıştır. Yapılan çalışmalar, uygulanan antidepresan tedaviler sonucunda hareketsizlik süresinin kıaldığını göstermiştir<sup>11</sup>.

### Sükroz Tercih Testi

Sükroz Tercih Testi (STT) deney hayvanlarında hazza karşı isteksizliği (Anhedoni) ölçer. Majör depresyonun ana semptomlarından biri olan Anhedoni, deney hayvanlarında zevkten kaçınmayı Anhedoni ölçmek için kullanılan STT ile ölçülür. Başlangıçta, kafesin sağ ve sol taraflarına iki farklı su şişesi yerleştirilmiştir. Deney hayvanlarının 24 saat boyunca her iki şişeden de su içmelerine izin verilmiş ve su şişeleri her 12 saatte bir değiştirilmiştir. İki eğitim gününden sonra, şişelerden

birine rastgele %2 sükroz içeren 200 mL su konulmuştur. şişeler sıçanlara verilmeden önce ve verildikten 24 saat sonra tartılmıştır. Yüzde sükroz tüketimi aşağıdaki Denklem 1<sup>12,13</sup> formülüne göre hesaplanmıştır.

Sükroz Tüketim Yüzdesi=  $\frac{\text{Sükroz tüketimi} \times 100}{\text{Toplam tüketim}}$   
*Denklem 1*

Toplam tüketim: su ve sükroz tüketimi toplam tüketim olarak değerlendirilmiştir<sup>12,13</sup>.

### Yükseltilmiş Artı Labirent Testi

Yükseltilmiş artı labirent testi için kullanılan aparat "+" şeklinde, karşılıklı iki açık kola (25x5x0,5 cm) ve bir merkeze dik ve platformlu (5x5x0,5 cm) iki kapalı kola (25x5x16 cm) sahiptir. Açık kollar düşme sayısını azaltmak için çok küçük (0,5 cm) bir duvara sahipken, kapalı kollar kolu çevrelemek için yüksek (16 cm) bir duvara sahiptir. Tüm aparat yerden 50 cm yüksekliktedir. Cihaz plastik malzemeden yapılmıştır. Platform siyah ve duvarlar opakdır. Tüm test sıçanları, davranışsal test odasının koşullarına alışmaları için ilk deneye başlamadan 30 dakika önce davranışsal test odasına aktarılmıştır. Bir uygulama hayvanı kullanılarak yapılan bir test denemesinin iki amacı vardır. İlk adım, kayıt defterindeki her şeyin yolunda olduğundan emin olmaktır. Bir diğer önemli husus ise test koşullarını mümkün olduğunca monoton tutmaktır<sup>14,15</sup>. Bir sıçan, başı kapalı bir kola doğru yönlendirilmiş şekilde labirentin orta alanına yerleştirilmiştir. Yükseltilmiş artı labirent testi, uzak bir cihaz tarafından kontrol edilen bir bilgisayara bağlı bir video kamera kullanılarak kaydedilmiştir. Her bir kola giriş sayısı (bir giriş, farenin ağırlık merkezinin kola girmesi olarak tanımlanır) ve açık kollarda geçirilen süre kaydedilmiştir ve bu ölçümler anksiyete benzeri davranışın göstergeleri olarak hizmet etmektedir. Sıçanların labirentte 5 dakika boyunca serbestçe hareket etmelerine izin verilmiştir. Her denemeden sonra, koku alma ipuçlarına dayalı önyargıdan kaçınmak için tüm kollar ve çekirdek alanları, diğer temizlik solüsyonlarına kıyasla nispeten zayıf bir kokuya sahip etkili bir koku giderici madde olan %70 alkol ile temizlenmiştir<sup>14</sup>.

### LC-MS/MS Yöntemi ile İdrarda 5-HT ve Metaboliti 5-HIAA'nın Kantitatif Analizi için Numune Hazırlama Prosedürü

LC-MS/MS yöntemiyle idrardaki 5-HT ve metaboliti 5-HIAA moleküllerini analiz etmek için her gruptaki sıçanların 24 saatlik idrar örnekleri toplanmıştır. İdrar örnekleri kreatin düzeylerini belirlemek için kolorimetrik yöntem kullanılarak analiz edilmiştir. Deney gruplarındaki üç sıçanın idrar örnekleri yetersiz olduğu için bu sıçanlarda kreatin ve kantifikasyon analizleri yapılamamıştır. İdrar örneklerinde 5-HT ve 5-HIAA miktar tayini Sem Laboratuvarları tarafından CE-IVD sertifikalı valide edilmiş JaseM HVA-VMA-5HIAA in Urine LC-MS/MS

Analysis Kit (Sem Laboratuvar Cihazları Pazarlama San. ve Tic. A.Ş., İstanbul, Türkiye) kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

### İdrar Örneklerinde Kolorimetrik -Jaffe Yöntemi ile Kreatin Analizi için Örnek Hazırlama Prosedürü

İdrar örnekleri, idrar örneklerindeki bireyler arası farklılıkları azaltmak için kreatinin seviyesi ile normalize edilmiştir<sup>16</sup>. İdrardaki 5-HT ve metaboliti 5-HIAA miktarını değerlendirmek için idrarın kreatin seviyeleri belirlenmiş ve kreatin miktarları hesaplamaya dahil edilmiştir. Denklem 2 ve Denklem 3'teki formül kullanılarak idrarda normalize edilmiş 5-HT ve 5-HIAA değerleri hesaplanmıştır.

$$\text{Normalize 5HT (mg/g krema)} = \frac{5\text{-HT (ppm)}}{(\text{Kreatin (mg/dL)})/100}$$

*Denklem 2*

$$\text{Normalleştirilmiş 5-HIAA (mg/g krema)} = \frac{5\text{-HIAA (ppm)}}{(\text{Kreatin(mg/dL)})/100}$$

*Denklem 3*

İdrar örnekleri 3500 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Cobas Integra 400 Plus biyokimya otoanalizör cihazına verilen idrar örnekleri cihaz içerisinde 1/25 oranında distile su ile otomatik olarak seyreltilir. Daha sonra 512/583 nm dalga boyunda okuma yapılarak sonuçlar elde edilir. Okuma sonrasında otomatik çarpma işlemi ile sonuca ulaşılır.

### İstatistiksel Analiz

Veri analizi Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) yazılımı kullanılarak yapılmıştır. Verilerin dağılımına bakıldığında normal dağılım gösterdiği görülmüştür ( $p > 0.05$ ). Bu noktadan hareketle, gruplar arasındaki varyasyon miktarını incelemek için t-testi ve tek yönlü varyans analizi (ANOVA) testi kullanılmıştır. İstatistiksel anlamlılık veren ANOVA testlerinde gruplar arası karşılaştırma için popülasyon varyanslarının homojenliği dikkate alınarak post-hoc testleri olan Tukey ve Tamhane testleri kullanılmıştır. Tüm veriler %95 güven aralığında test edilmiştir.

## BULGULAR

### Vücut Ağırlığı

Hayvanların vücutları eğitimin planlandığı günlerin öncesinde olacak şekilde planlanmıştır. Gruplar kendi aralarında

karşılaştırılmış ve analiz Tablo 1'deki t-testi kullanılarak yapılmıştır. Kontrol, propolis ve stres + propolis gruplarında başlangıç ve son ağırlıklar arasında anlamlı bir fark vardı ( $p < 0.05$ ) (Şekil 1).

### Davranışsal Deneylelerin Değerlendirilmesi

Zorunlu Yüzme Testi ile hayvanların hareketsizlik süreleri karşılaştırılmış, gruplardaki değerler incelendiğinde stres grubu ile diğer gruplar arasında istatistiksel olarak fark bulunmuştur (Şekil 2).

Stres prosedürlerine 60 gün boyunca maruz kalan hayvanların depresif ruh hali özelliklerinden biri olan anhedoni davranışını ölçmek için sükröz tercih testi uygulanmış ve sonuçlar ANOVA ile karşılaştırılmıştır. Sükröz tüketimi stres grubunda tüm gruplara göre daha düşüktü ( $p < 0.05$ ) (Şekil 3).

Hayvanların anksiyetelerinin davranışları üzerindeki etkilerini incelemek için yapılan yükseltilmiş artı labirent testinde, kapalı kolda kalma süreleri gruplar arasında karşılaştırılmış ve stres grubu ile propolis ve propolis + stres grupları arasında anlamlı bir fark bulunmuştur (Şekil 4).

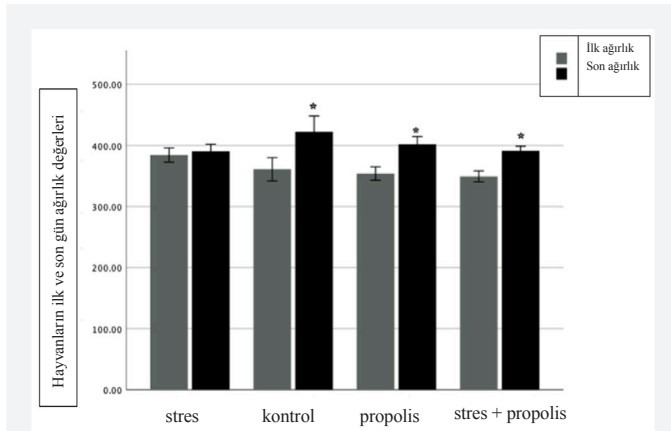
Yükseltilmiş artı labirent testindeki açık kol süreleri gruplar arasında karşılaştırılmış ve propolis ile stres grupları arasında ve stres + propolis grubu ile stres grubu arasında anlamlı bir fark bulunmuştur (Şekil 5).

### İdrarda 5-HT ve Metaboliti 5-HIAA'nın Kantitatif Analizi

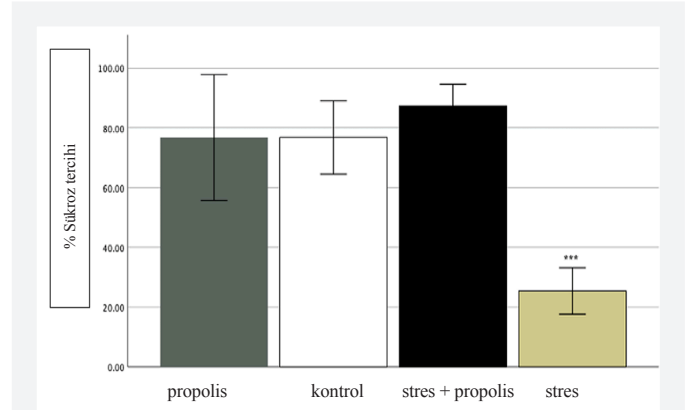
İdrarda analiz edilen 5-HT ve metaboliti 5-HIAA'nın kromatogramları Şekil 6'da verilmiştir. LC-MS/MS yöntemiyle ölçülen ve cihaz analiz sonuçları ile idrar kreatinin seviyelerine göre hesaplanan idrardaki 5-HT ve metaboliti 5-HIAA moleküllerinin miktarsal sonuçları Tablo 2'de verilmiştir. Her bir deney grubunda, birden sekize kadar numaralandırılan sıçanlardan üçünün kreatinin ve miktar belirleme analizleri, çalışma sırasında toplanan idrar örneklerinin yetersiz olması nedeniyle yapılamamıştır. Kontrol 7, propolis 2 ve propolis 5 olarak etiketlenen sıçanların kantitatif tayini için analizler yapılmamış ve bu nedenle hesaplamalara dahil edilmemiştir. Analiz edilen sıçanların kantitatif tayin değerleri Tablo 2'de sunulmuştur. Şekil 7, 5-HT ve 5-HIAA düzeylerinin hesaplanan sonuçlarını göstermektedir. Tablo 2 ve Şekil 7, gruplar arasında anlamlı bir fark olmadığını göstermektedir ( $p > 0,05$ ).

**Tablo 1. Hayvanların ilk ve son günlerdeki ağırlıkları**

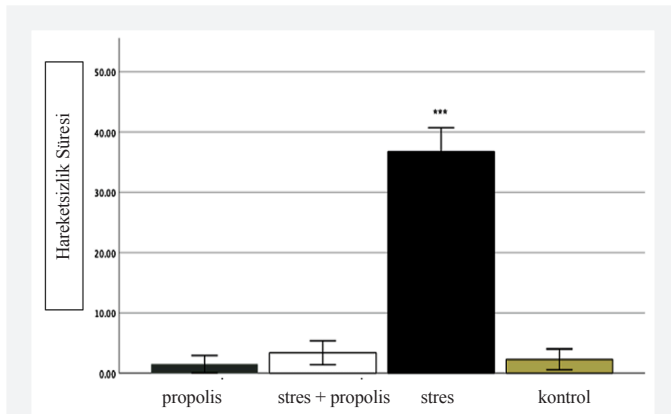
DeneySEL gruplar	0. Gün ölçümleri (g) (ortalama ± standart hata)	60. gün ölçümleri (ortalama ± standart hata)	p değeri (t-testi)
Propolis	354±8,88	402±10,17	<0,05
Stres	384,37±13,85	390,37±13,87	>0,05
Stres+propolis	349,37±10,78	391,31±8,96	<0,05
Kontrol	361,14±20,63	422,28±10,17	<0,05



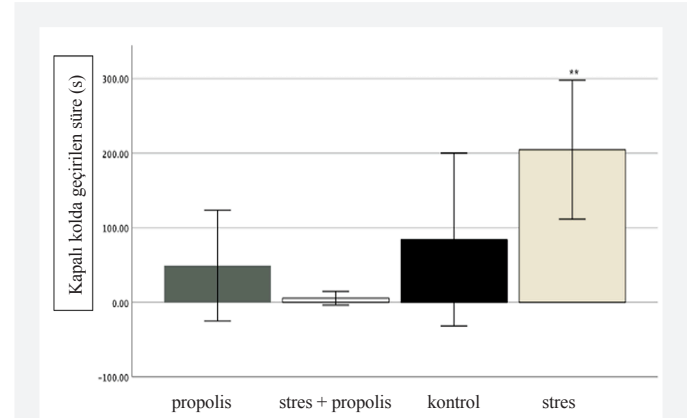
**Şekil 1.** Hayvanların ilk ve son gün ağırlık değerleri. \* $p < 0,05$  kontrol, propolis ve stres+propolis gruplarında ilk ve son ağırlıklar arasında anlamlı bir fark olduğunu göstermektedir (t-testi)



**Şekil 3.** İki deney grubunun sükröz tüketimi. \*\*\* $p < 0,05$  stres grubunun diğer gruplara göre önemli ölçüde daha az sükröz tükettiğini göstermektedir (ANOVA). Tukey testi post-hoc testi olarak kullanılmıştır



**Şekil 2.** Zorunlu yüzme testindeki hareketsizlik süreleri. \*\*\* $p < 0,05$  stres grubunun diğer gruplarla karşılaştırılmasında anlamlı bir fark olduğunu göstermektedir (ANOVA). Gruplar arasındaki farklılaşma durumu Post-Hoc testlerinden Tamhane ile analiz edilmiştir



**Şekil 4.** Yükseltmiş artı 4 labirent testinde kapalı kolda geçirilen süre. \*\* $p < 0,05$  stres grubunun süresinin propolis ve stres+propolis gruplarından anlamlı derecede yüksek olduğunu göstermektedir (ANOVA). Tamhane testi Post-Hoc test olarak kullanılmıştır

## TARTIŞMA

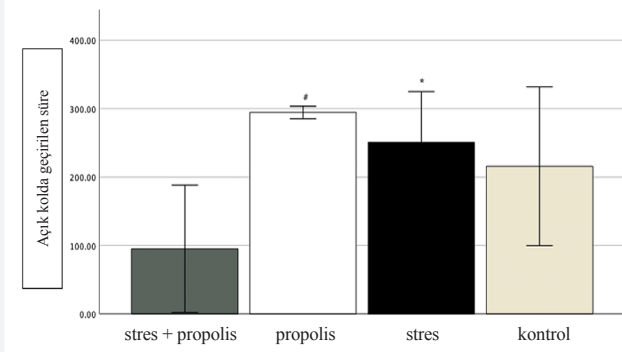
Propolisin başta depresyon olmak üzere duyu durum bozuklukları üzerinde olumlu bir etkisinin olup olmadığı son yıllarda araştırmacıların üzerinde durduğu konulardan biridir. Apigenin içeren bir ürün olarak propolisin potansiyel antidepresan etkisinin bundan kaynaklandığı düşünülmektedir<sup>17-20</sup>. Yapılan çalışmalar apigenin'in dopamin ve norepinefrin üzerinde antidepresan benzeri bir etkiye sahip olduğunu ve farelerle yapılan bir çalışmaya göre depresif ruh haline bağlı olarak azalan sükröz tüketimi ve yüzdürme testlerinde artan hareketsizlik süreleri üzerinde tersine çevirici bir etkiye sahip olduğunu göstermiştir. Alternatif ve kolay uygulanabilir bir tedavi seçeneği olması açısından destekleyici sonuçlar elde etmeyi amaçlayan bu çalışmada, sıçanlarda kronik

öngörülemez hafif stres kaynaklı depresyon modelinde propolisin 5-HT seviyesi üzerindeki etkisi biyokimyasal analizlerle araştırılmıştır. Biyokimyasal parametrelerin yanı sıra propolisin davranışsal testler üzerindeki etkinliği de incelenmiş ve genel olarak propolisin davranışsal testlerde farklılaşma yarattığı görülmüştür. Yine de, biyokimyasal parametrelerde gözlemlenebilir farklılıklara rağmen istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır.

Önceki çalışmalarda, kronik, öngörülemez hafif stres prosedürlerine maruz bırakılan sıçanların vücut ağırlığında azalma olduğu gösterilmiştir. Benzer şekilde, bu çalışmada da Tablo 1'de görüldüğü gibi hayvanların ağırlığında stres kaynaklı bir azalma olmuştur. Elde edilen bulgular Şekil 1'de gösterildiği gibi istatistiksel olarak anlamlıdır. Bununla birlikte,

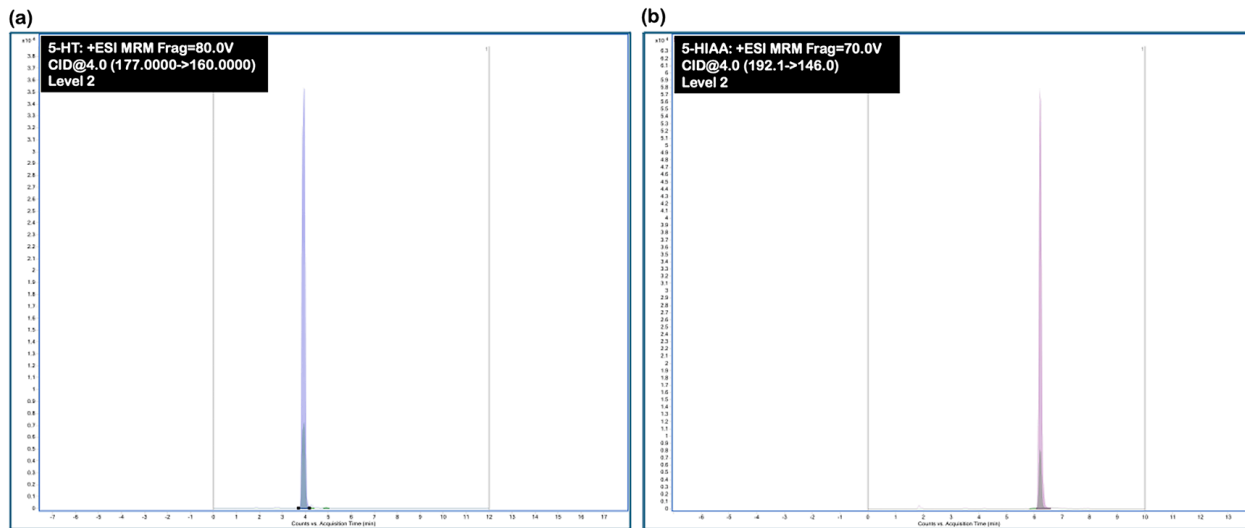


çalışma odağımız olan propolis, hem vücut ağırlıklarındaki azalma hem de anhedoni nedeniyle zorunlu yüzme testi ile yükseltilmiş artı labirent testinde gözlemlenen davranışların iyileşmesi ve normal değerlere dönmesi üzerinde dikkat çekici derecede olumlu ve anlamlı bir etkiye sahipti. Bu, propolisin stres yönetimindeki potansiyelinin umut verici bir göstergesidir. Kronik öngörülemez stres prosedürüne maruz kalan hayvanlarda propolis kullanımı üzerine yapılan bir başka çalışmada, stres grubu hayvanların ağırlığında önemli bir azalma olduğu bildirilmiştir. Propolis uygulandıktan sonra grupların ağırlıklarında bir artış olduğu kaydedilmiştir<sup>8</sup> ve bu da propolisin olumlu etkilerini daha da güçlendirmektedir.



**Şekil 5.** Yükseltilmiş artı labirent testinde açık kol süreleri, \* $p < 0,05$  propolis grubu açık kolda stres grubuna göre daha uzun süre geçirmiştir, # $p < 0,05$  stres+propolis grubu açık kolda stres grubuna göre daha uzun süre geçirmiştir

Zorunlu yüzme testinde hareketsiz kalma süresindeki artış depresif ruh halinin bir göstergesidir. Zangen ve ark.<sup>21</sup> genetik olarak seçilmiş Flinders Duyarlı Suş (FSS) sıçanlarında antidepresan tedavisinin 5-HT ve 5-HIAA seviyelerindeki değişim üzerindeki etkisini incelemiştir. FSS sıçanlarının seçiminde, kronik hafif strese yanıt olarak azalmış hareket, artmış anhedoni, artmış hızlı göz hareketi (REM) uykusu miktarı, azalmış REM uykusu başlangıcı ve bilişsel zorluklar gibi depresyonun karakteristik davranışsal özelliklerini sergilemişlerdir<sup>21</sup>. Çalışmada, hayvanlar antidepresan tedavisinden önce ve sonra zorunlu yüzme testlerine tabi tutulmuştur. Depresyondaki hayvanların kontrol grubuna kıyasla daha uzun süre hareketsiz kaldığı ve tedavi sonrasında bu sürenin kısaldığı gözlenmiştir. Çalışmamızdaki immobilizasyon süreleri değerlendirildiğinde, stres grubunun diğer gruplara kıyasla belirgin şekilde daha uzun süre suda hareketsiz kaldığı sonucuna varılmıştır. Şekil 2'de gösterildiği gibi, elde edilen sonuçlar istatistiksel olarak anlamlıdır ( $p < 0,05$ ). Stres grubundaki hayvanların kontrol grubuna göre daha uzun süre hareketsiz kaldığı ve propolis uygulamasından sonra bu sürenin kısaldığı gözlenmiştir (Şekil 2). Çalışma sonuçlarımız literatürdeki sonuçlarla benzerlik göstermektedir. Zorunlu yüzme testi modeli ile propolisin potansiyel antidepresan aktiviteye sahip olduğu gösterilmiştir. Ayrıca, Şekil 3'te görüldüğü gibi, anhedonik davranış özelliklerinden biri olan düşük sükröz tüketimi, özellikle stres grubunda literatürle uyumludur<sup>22,23</sup>. Propolis gruplarındaki şeker tüketimi kontrol grubundakine benzerdir. Stres altındaki sıçanlara propolis verilmesinin sıçanlarda şeker tüketimini değiştirdiği gösterilmiştir (Şekil 3).



**Şekil 6.** İdrarda serotonin 5-HT ve metaboliti, 5-HIAA kromatogramları. (a) 5-HT (m/z: 177.0>160.0), (b) 5-HIAA (m/z: 192.1>146.0)  
5-HT: 5-hidroksi triptamin, 5-HIAA: 5-hidroksi indol asetik asit

Tablo 2. 5-HT, 5-HIAA ve kreatin analizlerinin sonuçları

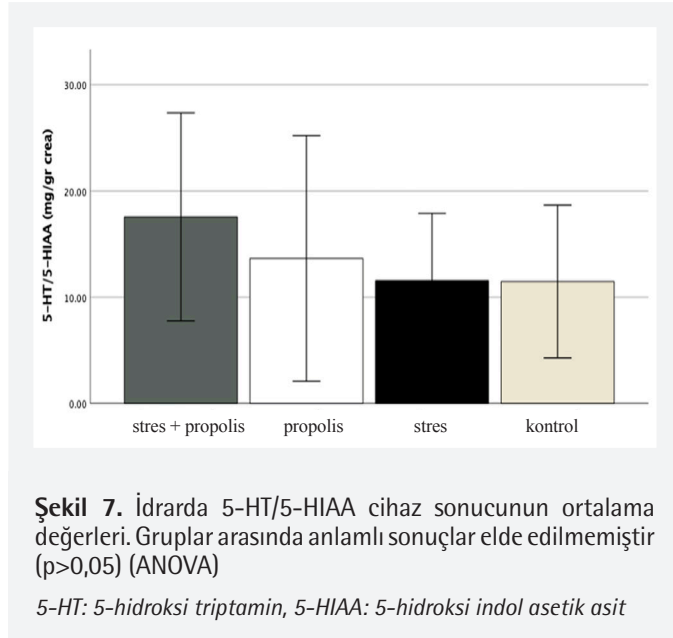
Örnek	5-HT (ppm)	5-HIAA (ppm)	5-HIAA/5-HT	Kreatinin (mg/dL)	Normalize 5-HT(mg/g crea)	Normalize 5-HIAA (mg/g crea)	Normalize (5-HIAA/5-HT)
Stres 1	0,386	4,656	0,01	93,25	0,414	4,993	12,06
Stres 2	2,065	13,708	0,00	250,47	0,825	5,473	6,63
Stres 3	0,373	9,065	0,02	195,88	0,191	4,628	24,23
Stres 4	0,223	1,754	0,00	71,7	0,311	2,447	7,87
Stres 5	ND	14,364	NC	ND	NC	NC	NC
Stres 6	0,676	2,531	0,00	60	1,127	4,219	3,74
Stres 7	0,879	8,992	0,01	156,25	0,563	5,755	10,22
Stres 8	0,932	15,079	0,01	197,55	0,472	7,633	16,17
Stres+propolis 1	0,465	7,890	0,01	129,14	0,360	6,110	16,97
Stres+propolis 2	ND	9,788	NC	ND	NC	NC	NC
Stres+propolis 3	0,287	10,264	0,03	128,41	0,224	7,993	35,68
Stres+propolis 4	0,531	9,241	0,01	138,74	0,383	6,661	17,39
Stres+propolis 5	0,586	7,617	0,01	134,98	0,434	5,643	13,00
Stres+propolis 6	0,535	6,772	0,01	108,52	0,493	6,240	12,66
Stres+propolis 7	0,662	9,577	0,01	ND	NC	NC	NC
Stres+propolis 8	0,722	7,004	0,00	123,08	0,587	5,691	9,69
Kontrol 1	0,385	4,385	0,01	95,42	0,404	4,596	11,38
Kontrol 2	0,979	11,718	0,01	153,14	0,639	7,652	11,97
Kontrol 3	0,415	7,410	NC	111,79	0,372	6,628	17,82
Kontrol 4	1,194	2,693	0,00	62,5	1,911	4,309	2,26
Kontrol 5	0,150	3,402	0,02	74,37	0,203	4,574	22,53
Kontrol 6	1,138	1,062	0,00	35,65	3,194	2,980	0,93
Kontrol 8	0,382	5,157	0,01	107,02	0,357	4,818	13,50
Propolis 1	0,603	2,181	0,00	66,86	0,903	3,262	3,61
Propolis 3	0,440	3,333	0,00	195,88	0,225	1,702	7,56
Propolis 4	0,304	5,889	0,01	71,7	0,425	8,214	19,33
Propolis 7	0,294	3,254	0,01	156,25	0,188	2,083	11,08
Propolis 8	0,216	5,752	0,02	197,55	0,109	2,912	26,71

Şıçanlarda çalışma grupları: Her gruptaki hayvanlar ayrı ayrı birden sekize kadar numaralandırılmıştır. Kontrol 7, propolis 2, propolis 5 ve propolis 6 olarak etiketlenen şıçanların kantitatif tayini için analizler, çalışma sırasında toplanan idrar örneklerinin yetersiz olması nedeniyle yapılmamıştır ve bu nedenle hesaplamalara dahil edilmemiştir. 5-HT: 5-hidroksi triptamin, 5-HIAA: 5-hidroksi indol asetik asit, ND: Tespit edilmedi, NC: Hesaplanmadı, gruplar arasında anlamlı sonuçlar elde edilmemiştir (p>0,05) (ANOVA)

Yükseltilmiş artı labirent testi, deney hayvanlarında anksiyeteyi ölçmek için kullanılan testlerden biridir. Literatürde sunulan kanıtlara göre, anksiyete davranışı gösteren şıçanlarda kapalı kolda geçirilen süre açık kolda geçirilen süreye kıyasla artmaktadır<sup>15</sup>. Çalışmada kapalı ve açık kolda kalan şıçanlar karşılaştırıldığında, bir önceki çalışmadakilerle tutarlı sonuçlar elde edilmiştir. Şekil 4 ve Şekil 5'te elde edilen bulgulara göre, gruplar arasında süre açısından anlamlı bir fark vardı (p<0,05). Propolis gruplarının verileri değerlendirildiğinde, propolis şıçanlarda anksiyete benzeri davranışları azalttığı tespit edilmiştir.

Depresyon ve serotonin metabolizması arasındaki ilişkiyi inceleyen çalışmalar, yüksek 5-HIAA düzeylerinin depresyonla ilişkili olabileceğini ve özellikle majör depresif bozukluğu

olan hastalardaki 5-HT dönüşüm ölçüm sonuçlarına göre, depresyon sırasında hastalardaki 5-HT döngüsünün arttığını göstermiştir<sup>24,25</sup>. 5-HT, sindirim sistemi ve MSS'nin çeşitli dokularında ve trombositlerinde bulunur ve vücudumuzda yaygın olarak dağılır. Hidrofilik bir madde olan 5-HT kan-beyin bariyerini geçemez<sup>26,27</sup>. Monoamin oksidaz, aldehit dehidrojenaz enzimi tarafından ana metabolit olan 5-HIAA'ya dönüştürülen 5-HT'nin metabolizmasından birincil olarak sorumludur. Vücuttaki serotonin miktarını ölçmek için stabil bir araç sağlar<sup>28</sup>. Serotonin seviyelerindeki değişimin özellikle depresyon hastaları için önemli olduğu ve bu durumun serotonin seviyelerindeki düşüşle karakterize olduğu birçok çalışmada gösterilmiştir. Bu azalmanın raphe çekirdeklerinin hafıza ve biliş bölgelerindeki konumundan



kaynaklandığı düşünülmektedir<sup>29</sup>. Serotonin seviyelerinin ve metabolitlerinin farklı biyolojik sıvılarda ölçümü literatürde verilmiştir. Depresyonun olası biyobelirteçlerini belirlemeye yönelik çalışmalar önemli kanıtlar sağlamıştır. Bu amaçla, Zhao ve ark.<sup>30</sup> depresyon modeli sıçanlarda fluoksetin uygulamasından önce ve sonra alınan plazma örneklerinde monoamin nörotransmitterlerinin ve amino asit nörotransmitterlerinin konsantrasyonlarını karşılaştırmıştır. Sonuçlar değerlendirildiğinde, depresif grubun 5-HT, 5-HIAA konsantrasyonlarının sağlıklı kontrollere göre daha düşük olduğu tespit edilmiş ve fluoksetinin 5-HT, 5-HIAA plazma konsantrasyonlarını artırmada önemli bir rolü olabileceği vurgulanmıştır<sup>29</sup>. Ancak bizim çalışmamızda 5-HT ve 5-HIAA düzeyleri için gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır. Çalışmamızda elde ettiğimiz Tablo 2'de gösterilen 5-HT ve 5-HIAA düzeylerinin Şekil 7'de görüldüğü gibi istatistiksel olarak anlamlı olmaması ( $p>0,05$ ), kullandığımız örneğin idrar olmasından kaynaklanıyor olabilir. Metabolit tayini için idrar örneklerinin kullanılması konusunda tutarlı ve güvenilir çalışmalar olsa da, depresyonla ilişkili bir biyokimyasal olarak 5-HT düzeyleri kan ve beyin omurilik sıvısında ölçülebilir ve 5-HT salınımı veya inhibisyonundan sorumlu dokular doğrudan incelenebilir. Bu tür farklı sıvı ve dokularda incelenmesi durumunda 5-HT ve 5-HIAA düzeyleri açısından gruplar arasında anlamlı bir fark elde etmek mümkün olabilir. Literatürde bu örnek ve dokularla yapılan çalışmalardan anlamlı sonuçlar elde edenler bulunmaktadır<sup>27,31</sup>. Öte yandan, bilindiği gibi, majör depresif bozuklukla ilgili en çok kabul gören hipotez olan monoamin hipotezi, depresif durumda sinaptik boşluklardaki dopamin, 5-HT ve noradrenalin nörotransmitterlerinin konsantrasyonunun azaldığını ileri sürmektedir. Bu hipotez, nörotransmitterlerin depresyondaki rolünü anlamak için bir çerçeve sağladığından, majör depresif

bozuklukla ilgili diğer hipotezler bağlamında önemlidir<sup>32</sup>. Dolayısıyla, birden fazla nörotransmitterin sürece dahil olduğu düşünüldüğünde, herhangi bir maddenin antidepresan etkisini araştırırken tek bir nörotransmitterden ziyade diğer nörotransmitterlerin seviyelerini incelemenin önemli olduğu çalışmamızda açıkça görülmektedir. Çalışmamızda davranış testlerinden elde edilen bulgular, propolis özütünün antidepresan benzeri etkileri nedeniyle depresyonu önlemeye yardımcı olabileceğini gösterse de, bu etkilerin nedeni yalnızca serotonin seviyelerine dayalı olarak açıklanmamıştır.

Kronik öngörülemeyen stres modeli sıklıkla depresyon modellenmesi için kullanılmaktadır<sup>23,31</sup>. Doğal stresörlerin kullanılması ve hayvanlarda anhedonik davranışların gözlemlenmesinin mümkün kılınması geçerliliğini artırmaktadır. Öte yandan bu modelin dezavantajı da hayvanların belirli bir süre ve rutin olarak uygulanmasına bağlı olarak stres etkenlerine uyum sağlaması durumunda hayvanların stres ve kaygı düzeylerini beklenen dereceye düşürmemesidir<sup>33</sup>. Bu nedenle deney sırasında sıçanlara farklı zamanlarda farklı stres etkenleri uygulandı.

Son yıllarda yapılan çalışmalarla monoamin hipotezinin geçerliliğini yitirdiği görülmektedir. Majör depresyon tanısı alan kişilerin üçte birinin mevcut monoamin hipotezine dayalı farmakolojik tedavilere yanıt vermemesi, bu hipotezin depresyonu açıklamada tek başına yeterli olmadığını, başka açıklamalara ihtiyaç duyulduğunu göstermektedir. Çalışmamızda incelenen kimyasal testlerde istatistiksel olarak anlamlı sonuçlar elde edilemese de, bu sonuçlar anlamlı davranışsal sonuçları açıklayabilir. Özellikle memelilerde davranışların karmaşık süreçler sonucunda ortaya çıktığı göz önüne alındığında, davranış testlerinde elde edilen anlamlı sonuçlar propolisin etkinliğini göstermektedir<sup>23</sup>.

### Çalışmanın Kısıtlılıkları

Hayvanlardan idrar örnekleri alınırken yaşanan zorluklar nedeniyle bazı hayvanlardan yeterli sayıda örnek alınamadı ve bu örnekler analize dahil edilemedi. Bu gibi nedenlerden kaynaklanan veri kayıplarının çalışmanın sonuçlarını etkilediği düşünülmektedir.

### SONUÇ

Sonuç olarak çalışmanın propolis kullanımına bağlı kronik öngörülemeyen strese maruz kalan hayvanlar ile sağlıklı denekler arasında davranış testleri açısından farklılaşma yarattığı ve bu literatürün bu durumu desteklediği görüldü. Davranışsal testler sonucunda elde edilen bulgular, propolis ekstraktının antidepresan benzeri etkileri sayesinde depresyonun önlenmesine yardımcı olabileceğini gösterdi. Ancak idrar örneklerinde biyokimyasal parametreler incelendiğinde gruplar arasında serotonin ve metabolit



düzeylerinde fark bulunamadı. Biyokimyasal parametrelerde istatistiksel anlamlılık olmamasının nedenleri üzerinde duruldu ve bu doğrultuda ileride yapılacak araştırmalar için farklı vücut sıvıları ve dokularında 5-HT ve 5-HIAA düzeyleri incelenebilir. Hayvanların laboratuvar ortamındaki koşullarının önceden tahmin edilememesi ve boyutlarının kontrol edilebilir olması nedeniyle çalışmaların sonuçlarının daha düşük verimliliğe sahip olabileceği göz önünde bulundurularak deneylerin ilerletilmesi önerilmektedir.

## Etik

**Etik Kurul Onayı:** Bu çalışmada kullanılan protokol Üsküdar Üniversitesi Hayvan Deneyleri Etik Kurulu (ÜÜ-HADYEK) İstanbul, tarafından onaylanmıştır (karar no: 2020-17, tarih: 22.01.2021).

**Bilgilendirilmiş Onayı:** Hayvan deneyi.

## Yazarlık Katkıları

Cerrahi ve Medikal Uygulama: A.T., F.C., S.N.Y., B.Ç., Konsept: A.T., Dizayn: A.T., Veri Toplama veya İşleme: A.T., S.N.Y., B.Ç., Analiz veya Yorumlama: A.T., F.C., Literatür Arama: A.T., Yazan: A.T.

**Çıkar Çatışması:** Yazarlar bu makale ile ilgili olarak herhangi bir çıkar çatışması bildirmemiştir.

**Finansal Destek:** Çalışmamız için hiçbir kurum ya da kişiden finansal destek alınmamıştır.

## KAYNAKLAR

1. Ismail MO, Barakzai Q. Phytotherapy and its role in the treatment of depression. *Pak J Pharm.* 2007;24:67-74.
2. Slattey DA, Hudson AL, Nutt DJ. Invited review: the evolution of antidepressant mechanisms. *Fundam Clin Pharmacol.* 2004;18:1-21.
3. O'Neil MF, Moore NA. Animal models of depression: are there any? *Hum Psychopharmacol.* 2003;18:239-54.
4. Reis JS, Oliveira GB, Monteiro MC, Machado CS, Torres YR, Prediger RD, et al. Antidepressant - and anxiolytic - like activities of an oil extract of propolis in rats. *Phytomedicine.* 2014;21:1466-72.
5. Menezes da Silveira CCS, Luz DA, da Silva CCS, Prediger RDS, Martins MD, Martins MAT, et al. Propolis: A useful agent on psychiatric and neurological disorders? A focus on CAPE and pinocembrin components. *Med Res Rev.* 2021;41:1195-215.
6. Yücel B, Topal E, Akçiçek E, Kösoğlu M. Effects of Propolis on Human Health. *Anadolu J of AARI.* 2014;24:41-9.
7. Özer C. Siçanlarda kronik öngörülme hafif stresle indüklenen depresyon modelinde propolisin öğrenme bellek üzerine etkileri, Kocaeli University, Institute of Science and Technology. Master's Thesis. 2019; Kocaeli.
8. López-López AL, Jaime HB, Escobar Villanueva MDC, Padilla MB, Palacios GV, Aguilar FJA, et al. Chronic unpredictable mild stress generates oxidative stress and systemic inflammation in rats. *Physiol Behav.* 2016;161:15-23.
9. Uzunok B, Kahveci N, Güleç G. Role of Nitric Oxide in The Depression Model Induced By Swim Test in Rats. *Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi.* 2010;36:23-7.
10. Can A, Dao DT, Arad M, Terrillion CE, Piantadosi SC, Gould TD. The mouse forced swim test. *J Vis Exp.* 2012;59:e3638.

11. Petit-Demouliere B, Chenu F, Bourin M. Forced swimming test in mice: a review of antidepressant activity. *Psychopharmacology. Berl.* 2005;177:245-55.
12. Çengil O, Özaçmak HS, Turan I, Özaçmak VH. Effect Of Environmental Enrichment On Depression-Like Behavior, Cortical And Hippocampal BDNF And IL-1  $\beta$  \_In Vascular Dementia Model. *Med J West Black Sea.* 2019;3:42-51.
13. Sarkisova KY, Kuznetsova GD, Kulikov MA, van Luitelaar G. Spike-wave discharges are necessary for the expression of behavioral depression-like symptoms. *Epilepsia.* 2010;51:146-60.
14. Komada M, Takao K, Miyakawa T. Elevated plus maze for mice. *J Vis Exp.* 2008;22:e1088.
15. Mermerci A, Özmerdivenli R, Orallar H, Beyazçiçek E, Sungur MA. Evaluation of the Effect of Galanin and Exercise on Anxiety in Rats by Open Field and Elevated Plus Maze Tests. *Duzce Medical Journal.* 2018;20:63-8.
16. Xu T, Lu C, Feng L, Fan LX, Sun J, Fan B, et al. Liquid chromatography-mass spectrometry-based urinary metabolomics study on a rat model of simulated microgravity-induced depression. *J Pharm Biomed Anal.* 2019;165:31-40.
17. Cermak R, Durazzo A, Maiani G, Böhm V, Kammerer DR, Carle R, et al. The influence of postharvest processing and storage of foodstuffs on the bioavailability of flavonoids and phenolic acids. *Mol Nutr Food Res.* 2009;53(Suppl 2):184-93.
18. Falcone Ferreyra ML, Rius SP, Casati P. Flavonoids: biosynthesis, biological functions, and biotechnological applications. *Front Plant Sci.* 2012;3:222.
19. Nakazawa T, Yasuda T, Ueda J, Ohsawa K. Antidepressant-like effects of apigenin and 2,4,5-trimethoxycinnamic acid from *Perilla frutescens* in the forced swimming test. *Biol Pharm Bull.* 2003;26:474-80.
20. Küşümler AS, Çelebi A. Propolis and Effects on Human Health. *Akademik Gıda.* 2021;19:89-97.
21. Zangen A, Overstreet DH, Yadid G. High serotonin and 5-hydroxyindoleacetic acid levels in limbic brain regions in a rat model of depression; Normalization by chronic antidepressant treatment. *J Neurochem.* 1997;69:2477-83.
22. Çetin D. Depresyon oluşturulmuş siçanlarda glutamat nörotransmitter aktivite değişimlerinin tespiti ve beta laktam antibiyotiklerinin depresyon tedavisindeki muhtemel etkileri, Atatürk University Institute of Health Sciences, Department of Pharmacy. Doctoral thesis. 2014; Erzurum.
23. Arkan G. Siçanlarda kronik öngörülme stres ile oluşturulan depresyon modelinde harmanın rolünün araştırılması, Marmara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Eczacılık Anabilim Dalı. Yüksek Lisans Tezi. 2017; İstanbul.
24. Barton DA, Esler MD, Dawood T, Lambert EA, Haikerwal D, Brenchley C, et al. Elevated brain serotonin turnover in patients with depression: effect of genotype and therapy. *Arch Gen Psychiatry.* 2008;65:38-46.
25. Sekiduka-Kumano T, Kawayama T, Ito K, Shoji Y, Matsunaga K, Okamoto M, et al. Positive association between the plasma levels of 5-hydroxyindoleacetic acid and the severity of depression in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *BMC Psychiatry.* 2013;13:159.
26. Audhya T, Adams JB, Johansen L. Correlation of serotonin levels in CSF, platelets, plasma, and urine. *Biochim Biophys Acta.* 2012;1820:1496-501.
27. Jayamohananan H, Manoj Kumar MK, T P A. 5-HIAA as a Potential Biological Marker for Neurological and Psychiatric Disorders. *Adv Pharm Bull.* 2019;9:374-81.
28. Mazzola-Pomietto P, Aulakh CS, Tolliver T, Murphy DL. Functional subsensitivity of 5-HT<sub>2A</sub> and 5-HT<sub>2C</sub> receptors mediating hyperthermia following acute and chronic treatment with 5-HT<sub>2A/2C</sub> receptor antagonists. *Psychopharmacology (Berl).* 1997;130:144-51.
29. Boldrini M, Underwood MD, Mann JJ, Arango V. Serotonin-1A autoreceptor binding in the dorsal raphe nucleus of depressed suicides. *J Psychiatr Res.* 2008;42:433-42.
30. Zhao L, Zheng S, Su G, Lu X, Yang J, Xiong Z, et al. In vivo study on the neurotransmitters and their metabolites change in depressive disorder

- rat plasma by ultra high performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2015;988:59-65.
31. Yener MD. Investigation of Morphological Effects Of Chronic Stress on The Hippocampus Tissue in Rats, Kocaeli University, Institute of Health Sciences, Master's Thesis. 2016; Kocaeli.
  32. Racagni G, Popoli M. Cellular and molecular mechanisms in the long-term action of antidepressants. *Dialogues Clin Neurosci.* 2008;10:385-400.
  33. Kennett GA, Dickinson SL, Curzon G. Central serotonergic responses and behavioural adaptation to repeated immobilisation: the effect of the corticosterone synthesis inhibitor metyrapone. *Eur J Pharmacol.* 1985;119:143-52.