

# Kaju (*Anacardium occidentale* L.) Bitki Ekstrelerinin Anksiyolitik Etkisinin Biyoinformatik Temelli Geliştirilen Lipidom Analiz ile Beyin Dokularında Araştırılması: Zebra Balığı Modellemesi

Investigation of Anxiolytic Effect of Cashew (*Anacardium occidentale* L.) Plant Extracts in Brain Tissues by Bioinformatics Based Lipidome Analysis: Zebrafish Modeling (Chemometric Analysis)

öz

**Amaç:** Bu çalışmada, predatör stresi ile zebra balıklarında oluşturulan anksiyete modelinde, kaju (*Anacardium occidentale*) meyvesinin metanol ekstresinin anksiyolitik etkisi ve bu etkinin moleküler mekanizması incelenmiştir. Çalışmanın temel amacı, kaju metanol ekstresinin zebra balığı modelinde anksiyolitik etkisini belirlemek ve bu etkilerin altında yatan biyokimyasal mekanizmaları lipidomik analizleri aracılığıyla moleküler düzeyde açıklamaktır.

**Yöntem:** Deneyde, predatör stresine maruz bırakılan 18 zebra balığı rastgele üç gruba ayrılmıştır. Üç hafta süresince, her gruba farklı bir uygulama yapılmıştır: Birinci gruba farmasötik referans ilaç olarak diazepam, ikinci gruba 100 gram toz haline getirilmiş kaju meyvesinin metanolde maserasyon yöntemiyle hazırlanmış ekstresi, üçüncü gruba ise kontrol grubu olarak yalnızca standart yem verilmiştir. Bu süreç boyunca balıkların davranışsal ve biyokimyasal değişimleri izlenerek anksiyolitik etkinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

**Bulgular:** Deneyler sonucunda, kaju ekstresi ile tedavi edilen deney grubu ve diazepam ile tedavi edilen kontrol grubu başarıyla ayrıştırılmıştır. Gerçekleştirilen ayırım analizlerinin doğruluğu, hassasiyeti ve özgüllüğü ek deneylerle doğrulanmıştır. Anksiyete durumundaki zebra balıklarının beyin dokusunda metabolit profili önemli ölçüde değişim göstermiş olup, çalışmada anlamlı farklılık gösteren toplam 64 metabolit tespit edilmiştir.

**Sonuç:** Zebra balığı modelinde, deney grubu kaju ekstresi ile, kontrol grubu ise diazepam ile tedavi edilmiştir. Yapılan analizler sonucunda, kaju ekstresinin içerdiği anakardik asit ve triptofan bileşikleri sayesinde anksiyolitik etkisinin belirgin olduğu ve bu etkinin bilimsel olarak doğrulandığı gösterilmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** *Anacardium occidentale*, anksiyete, anakardik asit, lipidomiks, tof ms/ms, zebra balığı

## ABSTRACT

**Objective:** In this study, the anxiolytic effect of methanol extract of cashew (*Anacardium occidentale*) fruit and the molecular mechanism of this effect were investigated in an anxiety model induced in zebrafish by predator stress. The main objective of the study was to determine the anxiolytic effect of cashew methanol extract in a zebrafish model and to explain the biochemical mechanisms underlying these effects at the molecular level through lipidomics analyses.

**Methods:** In the experiment, 18 zebrafish exposed to predator stress were randomly divided into three groups. Each group received a different treatment for three weeks: the first group received diazepam as a pharmaceutical reference drug, the second group received 100 grams of powdered cashew fruit extract prepared by maceration in methanol, and the third group received only standard feed as a control group. During this process, the aim was to evaluate the anxiolytic effect by monitoring the behavioral and biochemical changes of the fish. 37.8% of the participants were male.

**Results:** As a result of the experiments, the experimental group treated with cashew extract and the control group treated with diazepam were successfully differentiated. The accuracy, sensitivity and specificity of the discrimination analyses performed were confirmed by additional experiments. The metabolite profile in the brain tissue of zebrafish in the anxiety state showed significant changes, and a total of 64 metabolites were detected that showed significant differences in the study.

**Conclusion:** In the zebrafish model, the experimental group was treated with cashew extract, and the control group was treated with diazepam. As a result of the analyses, it was shown that the anxiolytic effect of cashew extract was evident thanks to the anacardic acid and tryptophan compounds it contained, and this effect was scientifically confirmed.

**Keywords:** Anacardic acid, *Anacardium occidentale*, anxiety, lipidomix, tof ms/ms, zebra fish

Semih ÖZLİ<sup>1</sup> 

Şevval OKUYUCU<sup>1</sup> 

Sare Helin TEPE<sup>1</sup> 

Ekrem SULUKAN<sup>2</sup> 

Saltuk Buğra CEYHUN<sup>2</sup> 

Enes TEKMAN<sup>3</sup> 

Songül KARAKAYA<sup>3</sup> 

Onur ŞENOL<sup>1</sup> 

<sup>1</sup> Atatürk Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Analitik Kimya Anabilim Dalı, Erzurum, Türkiye

<sup>2</sup> Atatürk Üniversitesi, Su Ürünleri Fakültesi, Su Ürünleri Yetiştiriciliği Anabilim Dalı, Erzurum, Türkiye

<sup>3</sup> Atatürk Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Botanik Anabilim Dalı, Erzurum, Türkiye



Geliş Tarihi/Received 04.02.2025  
Kabul Tarihi/Accepted 25.02.2025  
Yayın Tarihi/Publication Date 27.02.2025

Sorumlu Yazar/Corresponding author:  
Onur Şenol

E-mail: onursenol@atauni.edu.tr

Cite this article: Özli S., Okuyucu, Ş., Tepe, S. H., Sulukan, E., Ceyhun, S. B., Tekman, E., Karakaya S., & Şenol, O. (2025). Investigation of Anxiolytic Effect of Cashew (*Anacardium occidentale* L.) Plant Extracts in Brain Tissues by Bioinformatics Based Lipidome Analysis: Zebrafish Modeling (Chemometric Analysis). *Current Research in Health Sciences*, 2(1), 18-26.



Content of this journal is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License.

## Giriş

Bitkisel kaynaklı bileşiklerin farmakolojik potansiyelinin değerlendirilmesi, geleneksel tıptan modern tıbbın uzanan köklü bir geçmişe sahiptir. Özellikle anksiyolitik özelliklere sahip bitkisel tedaviler, anksiyete bozukluklarına yönelik mevcut tedavi seçeneklerine alternatif veya tamamlayıcı yaklaşımlar olarak giderek daha fazla ilgi görmektedir. Bu bağlamda, kaju (*Anacardium occidentale*) bitkisinin anksiyolitik özelliklerine odaklanmak, doğal kaynaklı potansiyel tedavi seçeneklerinin keşfinde önemli bir adım olabilir (Dendena & Corsi, 2014).

*A. occidentale* L., Anacardiaceae familyasına ait tropik bir ağaç olup, özellikle kaju fıstığı ve meyvesiyle tanınmaktadır. Bu bitkinin başlıca biyoaktif bileşenleri arasında anakardik asitler, tanenler, flavonoidler ve diğer fenolik bileşikler yer almaktadır. Söz konusu bileşiklerin anti-inflamatuar ve antioksidan özelliklere sahip olduğu bilinmektedir (Akinpelu, 2001). Ayrıca, yapılan bazı ön çalışmalar, kaju ekstresinin anksiyete üzerinde olumlu etkiler gösterebileceğini ortaya koymuştur. Ancak, bu bulguların daha geniş ölçekli ve kontrollü çalışmalarla doğrulanması gerekmektedir (Konan & Bacchi, 2007; Razali et al., 2008). Araştırmalar, kaju ağacı ekstresinin hem fıstık hem de elma dahil olmak üzere potansiyel sağlık faydaları sunduğunu göstermiştir. Bu faydalar arasında antidiyabetik, kansere karşı koruyucu ve gastroprotektif etkiler bulunmaktadır. Aynı zamanda antiseptik, antioksidan, antiviral ve antifungal gibi farmakolojik etkileri için kullanılmaktadır. Antidepresan etkileri üzerindeki araştırmalar ise hala devam etmektedir. Ağacın kabuğu ve yaprakları, ishal ve diş ağrıları gibi çeşitli rahatsızlıkları tedavi etmek için geleneksel ilaçlarda kullanılmaktadır (Lim, 2010).

Kaju, vitaminler, mineraller, yağ asitleri, proteinler ve anakardik asit, tanenler, saponinler gibi biyolojik açıdan aktif fitokimyasallar içermektedir (Togola et al., 2020). Bu bileşenler, anti-inflamatuar ve nöroprotektif özellikler göstererek sinir sistemi üzerinde olumlu etkilere sahip olabilir. Özellikle anakardik asit ve polifenoller, anksiyete gibi psikolojik rahatsızlıkların hafifletilmesinde potansiyel faydalar sağlayabilir. Anksiyete, zaman zaman normal kabul edilse de aşırı ve kontrol edilemez hale geldiğinde yaşam kalitesini düşüren bir sağlık problemine dönüşebilir. Klinik olarak anksiyete bozukluğu tanısı için, kişinin en az altı ay boyunca belirgin veya belirsiz kaygı yaşaması ve bu durumun günlük işlevselliğini etkilemesi gerekmektedir. Genetik yatkınlık, çevresel faktörler ve beyin kimyasındaki dengesizlikler gibi çeşitli etmenler anksiyetenin gelişiminde rol oynar. Anksiyete bozuklukları; panik bozukluk, sosyal anksiyete ve genelleşmiş anksiyete bozukluğu gibi alt türlere ayrılır (Bandelow et al., 2017).

Anksiyete tedavisinde bireysel farklılıklar göz önünde bulundurularak psikoterapi, özellikle bilişsel davranışçı terapi (BDT), yaygın bir yaklaşım olarak öne çıkmaktadır. Ayrıca, farmakolojik tedavi ve bitkisel bileşiklerin anksiyolitik potansiyeli üzerine yapılan araştırmalar, alternatif yaklaşımların gelişmesini desteklemektedir. Kaju ekstresi gibi doğal bileşiklerin anksiyete üzerindeki etkilerinin incelenmesi, nörolojik sağlık üzerindeki potansiyellerini anlamamıza katkı sağlayabilir (Bandelow et al., 2017).

İlaç tedavisi, anksiyete yönetiminde önemli bir rol oynar. SSRI'lar ve SNRI'lar gibi antidepresanlar, anksiyete semptomlarını kontrol altına almak için sıklıkla kullanılır. Ayrıca, bazı durumlarda benzodiazepinler kısa süreli tedavi için tercih edilebilir, ancak bağımlılık riski taşır. Yaşam tarzı değişiklikleri, düzenli egzersiz, yeterli uyku, sağlıklı beslenme ve meditasyon, anksiyeteyi hafifletebilir. Mindfulness ve yoga gibi teknikler de stres yönetiminde faydalıdır. Anksiyete tedavisi, bireysel ihtiyaçlara göre özelleştirilmeli ve doğru tedavi kombinasyonu, etkili bir yönetim sağlar. Anksiyete bozuklukları, yaşam kalitesini olumsuz etkileyen yaygın bir psikiyatrik rahatsızlıktır (Remes et al., 2016).

Geleneksel anksiyete tedavileri çoğunlukla farmasötik ilaçlar içerir, ancak bu ilaçlar yan etkilere yol açabilir ve her hastada aynı derecede etkili olmayabilir. Bu nedenle, daha az yan etkiye sahip doğal alternatiflerin araştırılması önemlidir. Anksiyolitik ilaçlar, genel anksiyete bozukluğu, sosyal anksiyete bozukluğu, panik bozukluğu ve bazı durumlarda obsesif kompulsif bozukluk gibi farklı anksiyete türlerinin tedavisinde kullanılır. Ayrıca, cerrahi işlemler öncesi veya diğer tıbbi prosedürlerde de tercih edilebilir. Benzodiazepinler, hızlı etki gösterse de uzun süreli kullanımlarda bağımlılık riski taşır, bu nedenle dikkatli kullanılmalıdır (Longo & Johnson, 2000).

Buspiron gibi ilaçlar, bağımlılık riski düşük ve daha yavaş etkili olup uzun tedavi süreçleri gerektirir. Anksiyete tedavisinde ilaçlar ve psikoterapi, özellikle bilişsel davranışçı terapi, daha etkili sonuçlar sağlar. Anksiyolitik ilaçlar benzodiazepinler, SSRI'lar, SNRI'lar ve diğerleri olarak dört gruba ayrılır; her biri farklı etki mekanizmalarına ve yan etki profillerine sahiptir. Benzodiazepinler bağımlılık riski taşırken, SSRI ve SNRI'lar alkolle alınmamalıdır. Yan etkiler genellikle hafif olup sedatif etkiler dikkat gerektiren durumlarda göz önünde bulundurulmalıdır. Bu çalışmada, zebra balığı modeli kullanılarak kaju bitkisinin anksiyolitik etkileri, biyoinformatik temelli lipidom analizleriyle incelenmektedir. Zebra balığı, insan benzeri sinir sistemi yapısı ile anksiyolitik etkilerin lipidomik yollar üzerindeki etkilerini aydınlatmak için ideal bir modeldir (Karasakal, 2021).

Bu çalışmanın amacı, lipidom verilerini istatistiksel analizlerle birleştirerek kaju ekstresinin anksiyolitik etkilerini moleküler düzeyde incelemektir. Elde edilen veriler, kaju bitkisinin beyin dokularındaki lipidomik yolları nasıl etkilediğini ve hangi metabolitlerin düzeylerinde değişiklik meydana geldiğini ortaya koyacaktır. Bu analizlerin ışığında, kaju bitkisinin anksiyolitik etkilerinin mekanizmalarını açıklayacak bir model geliştirilecektir. Çalışma, bitkisel ilaçların anksiyolitik potansiyelini ve tedavi hedeflerini daha iyi anlamının yanı sıra, kaju bitkisinin beyin metabolizması üzerindeki etkilerini değerlendirerek anksiyete bozukluklarının tedavisinde bitkisel tedavi yöntemlerinin potansiyelini açığa çıkarmayı amaçlamaktadır.

## Yöntem

Bu çalışmada, araştırma için AB hattı zebra balığı larvaları (*Danio rerio*) kullanılmıştır. Balıklar, kapalı devre zebra balığı ünitesinde yetiştirilmekte olup, fotoperiyodları 10 saat karanlık ve

14 saat aydınlık olacak şekilde düzenlenmiştir. Döllenenmeden itibaren 10. güne kadar paramecium ile beslenen balıklar, 10. günden sonra günlük olarak canlı Artemia salina ve pul yemle beslenmeye devam edilmiştir. Çalışmada, 72 saatlik larva balıklar kullanılmıştır. Ayrıca çalışmada kullanılan cihaz ve materyallerin kullanım amaçları da Tablo 1’de belirtilmiştir.

**Tablo 1.** Deneide kullanılan cihaz ve materyaller

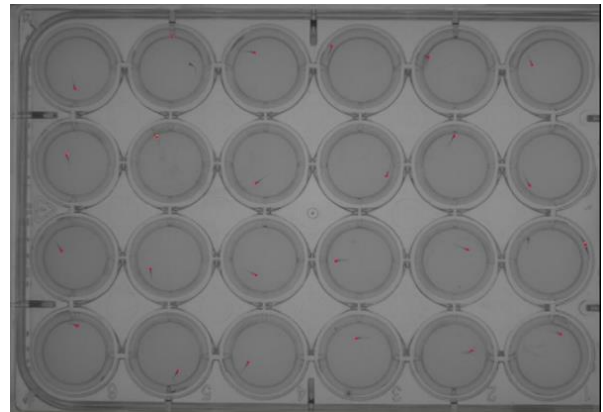
| Kuruluştaki Bulunan                                                           |                                                                                                                   |
|-------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Altyapı/Ekipman Türü, Modeli<br>(Laboratuvar, Araç, Makine-<br>Teçhizat, vb.) | Çalışmada Kullanım<br>Amacı                                                                                       |
| Kapalı devre zebra balığı<br>üretim sistemi                                   | Anaç zebra balıklarının<br>beslenmesi, üremesi ve<br>zebra balığı yumurtası<br>elde etmek için<br>kullanılmıştır. |
| Soğutmalı santrifüj                                                           | Metabolom analizleri için<br>örnek hazırlama<br>aşamasında kullanılmıştır.                                        |
| Otoklav                                                                       | Sterilizasyon için<br>kullanılmıştır.                                                                             |
| -20 derin dondurucu                                                           | Numune hazırlamada<br>inkübasyonda<br>kullanılmıştır.                                                             |
| +4 buzdolabı                                                                  | Isıya duyarlı sarf<br>malzemelerin<br>muhafazasında<br>kullanılmıştır.                                            |
| Ultra sonik su banyosu                                                        | Doku homojenizasyonu<br>aşamalarında<br>kullanılmıştır.                                                           |
| -80 derin dondurucu                                                           | Örneklerinin muhafazası<br>için kullanılmıştır.                                                                   |
| TOF-MS                                                                        | Metabolom analizlerinde<br>kullanılmıştır.                                                                        |
| İnkübatör                                                                     | Alınan yeni nesil balıkların<br>120. saatlerine kadar sabit<br>sıcaklıkta tutulması için<br>kullanılmıştır.       |

### Çalışma Kurgusu ve Düzeni

Çalışmada, toplam üç grup oluşturulmuştur (Tablo 2). Deneide kullanılan predatör strese maruz kalmış 18 zebra balığı üç gruba ayrılmıştır. Pozitif kontrol grubunda, altın standart olarak bilinen diazepam kullanılarak anksiyete modeli oluşturulmuş zebra balıklarına verilmiştir. Denei grubuna, 3 hafta boyunca metanol ekstratı (100 ppm) içeren yem verilmiş, kontrol grubuna ise aynı süre boyunca sadece normal yem verilmiştir. Üç hafta sonunda, tüm gruplar analizlere tabi tutulmuştur. Anksiyete testi, zebra balığındaki anksiyete benzeri davranışları test etmek için literatürde yaygın olarak kullanılan yeni dalma tankı yöntemiyle (Şekil 1) yapılmıştır. Bu testler, kaju ekstresinin anksiyolitik etkilerini değerlendirmek için kullanılmıştır.

**Tablo 2.** Denei grupları

| Denei Grupları                                 | Ekstraksiyon<br>Yöntemi                 | Doz        | Beslenme<br>Süresi | Predatör<br>ör<br>Stresi | Anksiyete<br>Testi |
|------------------------------------------------|-----------------------------------------|------------|--------------------|--------------------------|--------------------|
| <b>Pozitif Kontrol Grubu<br/>(PK)</b>          | Farmasötik<br>Formülasyon<br>(Diazepam) | 10<br>mg/L | 3 Hafta            | Var                      | Var                |
| <b>Denei Grubu (Kaju<br/>Metanol Ekstresi)</b> | Metanol                                 | 100<br>ppm | 3 Hafta            | Var                      | Var                |
| <b>Kontrol Grubu</b>                           | -                                       | -          | 3 Hafta            | Var                      | Var                |



**Şekil 1.** Yeni dalma tankı yöntemi

### Deneide Kullanılan İlaç Uygulaması

Deneide Pozitif Kontrol Grubu'ndaki (PK) zebra balığı larvalarına her 24 saatte bir 10 mg/L Diazepam uygulanmıştır. Uygulama toplam 3 hafta sürdü ve Diazepam larvalara suya eritilmiş formda eklenerek verilmiştir.

### Ekstraksiyon

Kuru kaju meyvesinin 100 gr'ı homojen bir partikül boyutu elde edilene kadar öğütülerek ince toz haline getirilmiştir. Elde edilen toz, her biri 300 mL saf metanol içeren kapalı kaplarda, sürekli hareketli ortamda 3 gün boyunca maserasyona bırakılmıştır. Maserasyon işlemi, her gün 8 saatlik periyotlar halinde gerçekleştirilmiş ve her periyot sonunda çözeltiler süzülerek ayrılmıştır. Elde edilen süzüntüler, çözücünün uzaklaştırılması amacıyla rotary evaporatörde düşük basınç altında buharlaştırılmış ve yoğunlaştırılmış metanol ekstratları elde edilmiştir. Günlük olarak elde edilen konsantre ekstratlar birleştirilmiş, hassas terazide tartılmış ve nihai verimi belirlenmiştir. Ekstraksiyon sürecinin tekrarlanabilirliğini ve ekstraktın kimyasal içeriğinin tutarlılığını değerlendirmek amacıyla, elde edilen ekstraktın toplam fenolik bileşik miktarı, toplam flavonoid içeriği ve belirleyici fitokimyasal bileşenleri spektrofotometrik ve kromatografik yöntemlerle analiz edilmiştir. Bu sonuçlar, literatürde bildirilen benzer çalışmalardaki verilerle karşılaştırılarak metodun geçerliliği değerlendirilmiştir. Son olarak, elde edilen metanol ekstresi, anksiyolitik ajan olarak model organizmada kullanılmak üzere -80°C'de muhafaza edilmiştir. Diyetle kullanılacak miktarın belirlenmesine bağlı olarak ekstraksiyon sürecinde elde edilen ekstre miktarı optimize edilmiştir.

## Lipidom Profili

Zebra balıklarından alınan beyin doku örnekleri, toz haline getirilip homojenize edilmiştir. 1 mL metanol/kloroform karışımı kullanılarak örneklerdeki proteinler çöktürülmüş ve yağ asitleri ekstrakte edilmiştir. Örnekler, analiz süresine kadar  $-80^{\circ}\text{C}$ 'de saklanmıştır. Supernatant kısmı, vakum altında uçurularak izopropanol, su ve metanol içeren mobil fazda çözündürülmüştür. Bu aşamada, her örnekten 10  $\mu\text{L}$  alınarak kalite kontrol (QC) analizi için bir havuz oluşturulmuştur. Lipidomik analiz, ters faz C18 kolon kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Gradyent elüsyonla yapılan analizde enjeksiyon hacmi 4  $\mu\text{L}$ , kolon sıcaklığı ise  $50^{\circ}\text{C}$  olarak ayarlanmış ve QTOF-MS cihazı pozitif modda ESI iyonizasyonu ile çalıştırılmıştır. Cihaz parametreleri, daha önceki çalışmalarımıza dayalı olarak 70-1500 m/z aralığı, 5 Hz tarama frekansı,  $200^{\circ}\text{C}$  kuru gaz sıcaklığı ve nebulizör basıncı 37 psi olarak belirlenmiştir. Bu parametreler, pilot çalışmaya dayalı olarak optimize edilmiştir. Analiz sırasında her 8 örnekte bir kalite kontrol numunesi cihaza verilmiştir. Örnekler, kalite kontrol örnekleriyle normalize edilmiş ve rastgele sıralanarak cihaza verilmiştir. Lipid anotasyonu, iterated DDA yöntemiyle 70-200, 200-350, 350-500, 500-750, 750-1000, 1000-1250 ve 1250-1500 m/z aralığında tandem MS/MS analizleri yapılarak gerçekleştirilmiştir. Prekürsör ve ürün iyonları tespit edilerek her bir lipidin tanımlanması sağlanmıştır. MS/MS spektrumları, Lipidblast, HMDB ve METLIN gibi referans kütüphanelerindeki spektrumlarla karşılaştırılarak pikler tanımlanmıştır. Elde edilen veriler, MATLAB 2021a yazılımında yer alan PLS Toolbox 8.5 ile karşılaştırmalı biyoinformatik analizlere tabi tutulmuştur. XCMS pik dedeksiyonu, m/z değerlerinin listelenmesi ve MS/MS spektrum eşleşmeleri sonrası veriler MATLAB programına aktarılmıştır. MATLAB içerisinde, grubumuzca hazırlanan kodlar kullanılarak, düşük yoğunluklu ( $\leq 5000$ ), tekrarlanabilirliği olmayan ( $\%BSS \geq 30$ ) ve QC örneklerinde yer almayan (false peak) m/z değerleri filtre edilmiştir. Bu işlemlerden sonra, PLS Toolbox yazılımında yer alan OPLS-DA modellemesi ile karar/destek modeli oluşturulmuş ve istatistiksel olarak anlamlı lipidler için VIP skorları ve fold değişimleri hesaplanmıştır. Yolak analizleri için PIUMET ve Metaboanalist 6.0 programları kullanılarak hedeflenmiş ve hedeflenmemiş lipidom analizleri yapılmış, böylece zebra balıklarında anksiyete modeli oluşturulmuş ve lipidomik strateji geliştirilmiştir.

## Bulgular

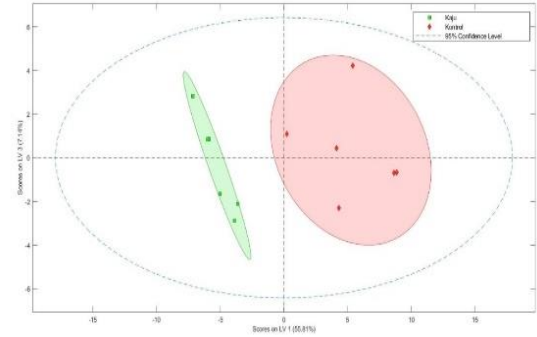
Model organizmada istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermiş anotasyonu yapılan lipid molekülleri Tablo 3'de verilmiştir.

## Kemometrik analizler

### Kısmi en küçük kareler diskriminant analizi (PLS-DA)

Bu analiz, çok değişkenli verilerde gruplar arasındaki farkları ve sınıflandırmayı değerlendirmeye olanak tanır. Grupların

birbirinden nasıl ayrıldığını daha net bir şekilde görmek için ise skor grafiği kullanılabilir (Şekil 2).

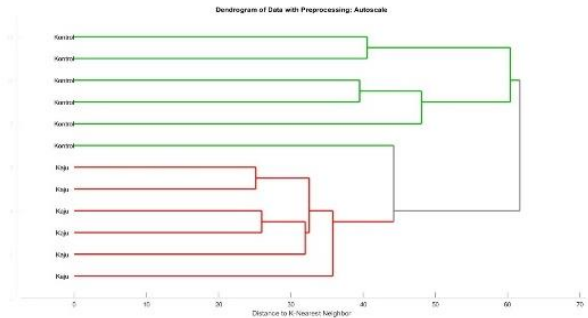


**Şekil 2.** PLS-DA skor grafiği: kaju ekstresi ve diazepam gruplarının lipid profil ayırımı

Yeşil kareler kaju ekstresi ile tedavi edilen zebra balıklarını (Deney Grubu), kırmızı elmaslar ise diazepam ile tedavi edilen zebra balıklarını (Pozitif Kontrol Grubu) temsil etmektedir. Bu dağılım, iki grubun birbirinden ne kadar ayrıldığını veya örtüştüğünü görsel olarak ortaya koyar. PLS-DA model parametreleri ise Tablo 4'de sunulmuştur.

## Hiyerarşik küme analizi

Bu grafik, kontrol ve deney gruplarının belirgin şekilde ayrıldığını ortaya koymaktadır. Yeşil çizgiler diazepam ile tedavi edilen zebra balıklarını (Pozitif Kontrol Grubu), kırmızı çizgiler ise kaju ekstresi ile tedavi edilen zebra balıklarını (Deney Grubu) temsil etmektedir. Şekil 3'deki dendrogramda rastgele oluşturulan grupların birbirinden açıkça ayrıldığı gözlemlenmiştir. Bu çizgilerin birbirine karışmaması ayırımın başarılı şekilde yapıldığının kanıtıdır.

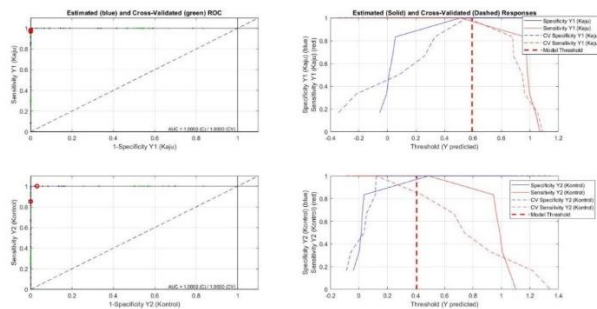


**Şekil 3.** Hiyerarşik küme analizi dendrogramı: kaju ekstresi ve diazepam gruplarının lipid profil kümelenmesi

## Alıcı çalışma karakteristiği (ROC) analizi

Bu grafikler, modelin doğruluğunu ve performansını değerlendirmek için kullanılan ROC eğrilerini ve duyarlılık (sensitivity) ile özgüllük (specificity) analizlerini göstermektedir. ROC eğrilerindeki AUC değerleri hem kalibrasyon hem de çapraz validasyon veri seti için 1.0000'dir (Şekil 4).

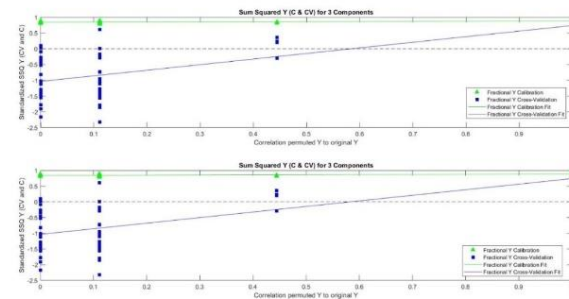




Şekil 4. PLS-DA modeli ROC eğrisi

### Permütasyon analizi

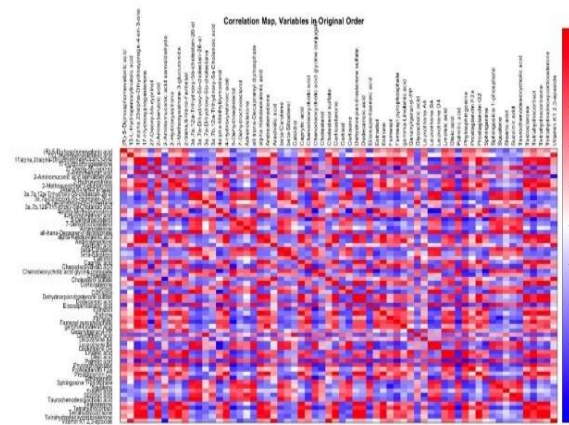
Bu analiz, tedaviyle elde edilen başarının rastgele olup olmadığının anlaşılmasına yardımcı olur. Modelin doğruluğu hakkında bilgi verir. 50 kombinasyon yapılmış ve bunların performansları değerlendirilmiştir (Şekil 5).



Şekil 5. Permütasyon analizi grafiği

### Korelasyon Matrisi

Korelasyon haritası, çalışmada incelenen çeşitli lipidlerin ve metabolitlerin birbirleriyle olan ilişkilerini gösterir. Bu tür haritalar, biyolojik sistemlerdeki moleküler etkileşimlerin anlaşılmasına yardımcı olur ve belirli biyokimyasal yolların potansiyel işlevleri hakkında bilgi sağlar (Şekil 6).



Şekil 6. Korelasyon matrisi

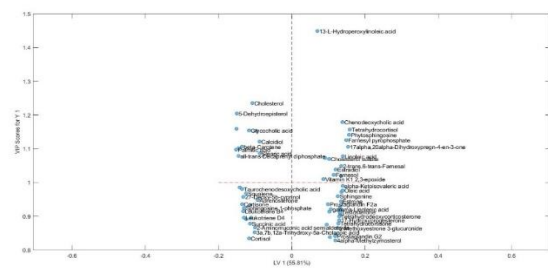
Şekil 6'daki kırmızı kareler, iki değişken arasında yüksek pozitif korelasyonu (1'e yakın) gösterir; bu, her iki değişkenin birlikte arttığını veya azaldığını ifade eder. Mavi kareler ise negatif

korelasyonu (-1'e yakın) simgeler; bu da bir değişken artarken diğersinin azaldığını gösterir. Beyaz kareler, korelasyonun olmadığı (0) veya çok düşük olduğu durumu yansıtır.

Her bir karedeki renk yoğunluğu, korelasyon katsayısının büyüklüğünü belirtir ve katsayının büyüklüğü, iki değişken arasındaki ilişkinin gücünü gösterir. Eğer belirli bir metabolit grubu arasında güçlü bir pozitif korelasyon bulunuyorsa, bu metabolitlerin aynı biyokimyasal yolda yer alabileceğini veya benzer biyolojik işlevler üstlenebileceğini düşündürülebilir.

### Projeksiyonda Değişken Önem (VIP)

Bu analiz sayesinde PLS-DA modelindeki değişkenlerin modelin açıklayıcı gücüne katkıları değerlendirilir. Şekil 7'de çalışmamız için oluşturduğumuz modele katkıları olan lipidler ve bu katkıların dereceleri gösterilmiştir.

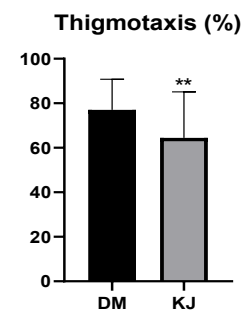


Şekil 7. VIP skorları

### Hareket Eksenine Göre Anksiyete Ölçümü

Thigmotaxis, normal eksenle hareket etmeme olarak tanımlanabilir ve hayvanların anksiyete ve stres düzeylerini değerlendirmede önemli bir göstergedir. Bu yöntem, anksiyolitik ilaçların etkinliğini değerlendirmek için kullanılır. Hayvanlar, anksiyete seviyeleri yüksek olduğunda çevreyi aktif olarak keşfetmek yerine test alanının duvarlarına yakın kalma eğilimindedir (Kankaynar et al., 2023). Zebra balıkları da anksiyete durumunda havuzun kenarlarına yakın yüzme eğilimi göstermiştir (Şekil 8).

Model organizmalar, deney boyunca kamerayla izlenerek hareket eksenlerine göre anksiyete tedavi süreçleri değerlendirilmiştir.



Şekil 8. Diazepam ile tedavi edilen pozitif kontrol grubu (siyah sütun) ve kaju ekstresi verilmiş deney grubunun (gri sütun) Thigmotaxis grafiği

**Tablo 3.** Model organizmada istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermiş lipid molekülleri

|                                           | m/z      | Kat Oranı | p.value | Düzenleme         |
|-------------------------------------------|----------|-----------|---------|-------------------|
| (R)-5-Diphosphomevalonic acid             | 331,0027 | 0,92781   | ,03     | Azalmış düzenleme |
| 13-L-Hydroperoxylinoleic acid             | 295,2271 | 0,073297  | ,02     | Azalmış düzenleme |
| 17alpha,20alpha-Dihydroxypregn-4-en-3-one | 261,2213 | 0,076841  | ,01     | Azalmış düzenleme |
| 17-Hydroxyprogesterone                    | 330,2272 | 0,02293   | ,04     | Azalmış düzenleme |
| 27-Deoxy-5b-cyprinol                      | 219,1743 | 4,178679  | ,01     | Artmış düzenleme  |
| 2-Aminobenzoic acid                       | 138,0538 | 0,06368   | ,01     | Azalmış düzenleme |
| 2-Aminomuconic acid semialdehyde          | 164,0296 | 1,84265   | ,04     | Artmış düzenleme  |
| 2-Hydroxyestrone                          | 309,1559 | 0,092307  | ,03     | Azalmış düzenleme |
| 2-Methoxyestrone 3-glucuronide            | 459,206  | 0,034747  | ,05     | Azalmış düzenleme |
| 4alpha-Methylzymosterol                   | 327,337  | 0,735435  | ,04     | Azalmış düzenleme |
| 4-Hydroxyretinoic acid                    | 300,1806 | 0,031115  | ,04     | Azalmış düzenleme |
| 5-Dehydroepisterol                        | 369,3541 | 2,941342  | ,01     | Artmış düzenleme  |
| 7-Dehydrocholesterol                      | 385,3428 | 9,999824  | ,01     | Artmış düzenleme  |
| Adrenosterone                             | 301,1648 | 2,332575  | ,03     | Artmış düzenleme  |
| all-trans-Decaprenyl diphosphate          | 859,5817 | 5,227941  | ,01     | Artmış düzenleme  |
| alpha-Ketoisovaleric acid                 | 116,0494 | 0,057547  | ,03     | Azalmış düzenleme |
| Androstenedione                           | 287,2029 | 0,06182   | ,05     | Azalmış düzenleme |
| Arachidic acid                            | 335,2792 | 0,432094  | ,02     | Azalmış düzenleme |
| Beta-Carotene                             | 555,4452 | 7,195638  | ,01     | Artmış düzenleme  |
| Beta-Sitosterol                           | 397,3785 | 2,324958  | ,02     | Artmış düzenleme  |
| Calcidiol                                 | 400,3424 | 3,175361  | ,03     | Artmış düzenleme  |
| Caprylic acid                             | 167,1066 | 0,057443  | ,05     | Azalmış düzenleme |
| Cholesterol                               | 369,3524 | 2,14952   | ,01     | Artmış düzenleme  |
| Cholesterol sulfate                       | 423,332  | 0,282695  | ,01     | Azalmış düzenleme |
| Corticosterone                            | 311,2044 | 0,079365  | ,04     | Azalmış düzenleme |
| Cortisol                                  | 345,2096 | 1,322263  | ,04     | Artmış düzenleme  |
| Cortisone                                 | 361,1924 | 3,587769  | ,02     | Artmış düzenleme  |
| Dodecanoic acid                           | 223,1692 | 0,082277  | ,01     | Azalmış düzenleme |
| Eicosapentaenoic acid                     | 325,2201 | 2,599403  | ,01     | Artmış düzenleme  |
| Estradiol                                 | 201,1599 | 0,208228  | ,01     | Azalmış düzenleme |
| Estrone                                   | 293,1389 | 0,035491  | ,05     | Azalmış düzenleme |
| Gamma-Linolenic acid                      | 233,2263 | 0,106889  | ,04     | Azalmış düzenleme |
| Glycocholic acid                          | 448,2907 | 1,313115  | ,01     | Artmış düzenleme  |
| Leukotriene B4                            | 269,2476 | 2,250562  | ,02     | Artmış düzenleme  |
| Leukotriene D4                            | 479,269  | 1,917981  | ,03     | Artmış düzenleme  |
| Linoleic acid                             | 245,2262 | 0,213346  | ,01     | Azalmış düzenleme |
| Oleic acid                                | 153,1275 | 0,297716  | ,01     | Azalmış düzenleme |
| Palmitic acid                             | 279,2304 | 1,921963  | ,01     | Artmış düzenleme  |
| Phytosphingosine                          | 282,2778 | 0,313419  | ,01     | Azalmış düzenleme |
| Prostaglandin F2a                         | 119,0854 | 0,607344  | ,03     | Azalmış düzenleme |
| Sphinganine                               | 284,2944 | 0,237686  | ,01     | Azalmış düzenleme |
| Sphingosine 1-phosphate                   | 402,221  | 2,87104   | ,03     | Artmış düzenleme  |
| Squalene                                  | 411,398  | 1,306625  | ,01     | Artmış düzenleme  |

**Tablo 3.** Model organizmada istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermiş lipid molekülleri (Devamı)

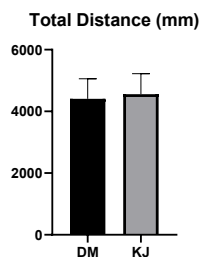
|                               | m/z      | Kat Oranı | p.value | Düzenlenme        |
|-------------------------------|----------|-----------|---------|-------------------|
| Stearic acid                  | 267,268  | 2,144304  | ,02     | Artmış düzenleme  |
| Succinic acid                 | 119,0351 | 1,77832   | ,04     | Artmış düzenleme  |
| Testosterone                  | 271,2053 | 0,110067  | ,05     | Azalmış düzenleme |
| Tetrahydrocortisol            | 283,2817 | 0,21907   | ,01     | Azalmış düzenleme |
| Tetrahydrocortisone           | 347,226  | 0,170456  | ,03     | Azalmış düzenleme |
| Tetrahydrodeoxycorticosterone | 357,25   | 0,2614    | ,04     | Azalmış düzenleme |
| Vitamin K1 2,3-epoxide        | 467,3581 | 0,353988  | ,03     | Azalmış düzenleme |

**Tablo 4.** PLS-DA model performans metriği değerleri

| Özellik                                     | Sınıf 1   | Sınıf 2    |
|---------------------------------------------|-----------|------------|
| Duyarlılık (Cal)                            | 1.000     | 1.000      |
| Özgüllük (Cal)                              | 1.000     | 1.000      |
| Duyarlılık (CV)                             | 1.000     | 1.000      |
| Özgüllük (CV)                               | 1.000     | 1.000      |
| Sınıflandırma Hatası (Cal)                  | 0         | 0 0        |
| Sınıflandırma Hatası (CV)                   | 0         | 0 0        |
| Kalibrasyonun Karekök Ortalama Hatası       | 0.108122  | 0.108122   |
| Çapraz Doğrulamanın Karekök Ortalama Hatası | 0.222994  | 0.222994   |
| Bias                                        | 0         | 0          |
| Çapraz Doğrulama Yanlılığı                  | 0.0130765 | -0.0130765 |
| R <sup>2</sup> (Cal)                        | 0.953238  | 0.953238   |
| R <sup>2</sup> (CV)                         | 0.826215  | 0.826215   |

### Toplam Kat Edilen Mesafeye Göre Anksiyete Ölçümü

Zebra balığı modellerinde, anksiyete ve stres terapilerinin değerlendirilmesi, balığın kat ettiği toplam mesafenin ölçülmesiyle izlenebilir (Şekil 9). Kaygılı veya stresli zebra balıkları sıklıkla daha az hareket ederler veya bir köşede sabit kalma eğilimindedir. Zebra balığındaki kaygı, donma ve düzensiz hareket atakları olarak kendini gösterir. Donma, solungaçlar ve gözler hariç, 2 saniye veya daha uzun süren hareketin tamamen durmasıyla karakterize edilir. Sonuç olarak, toplam kat edilen mesafe dahil olmak üzere lokomotor aktiviteyi değerlendirmek, zebra balığı modellerinde kaygıyla ilişkili davranışları ve olası terapilerin etkinliğini analiz etmek için etkili bir yaklaşımdır (Hamilton et al., 2021; Ranjith et al., 2022).



**Şekil 9.** Diazepam ile tedavi edilen pozitif kontrol grubu (siyah sütun) ve kaju ekstresi verilmiş deney grubunun (gri sütun) kat ettikleri mesafe grafiği

### Tartışma

Anksiyete, yaygın olarak görülen bir ruhsal bozukluktur ve kontrol edilemeyen kaygı ile huzursuzluk durumu olarak tanımlanır. Psikoterapi ve davranışsal tedavinin yanı sıra, anksiyete tedavisinde en yaygın yöntem ilaç kullanımına dayanmaktadır. Ancak ilaçların yüksek yan etkileri ve bırakıldığında yoksunluk sendromuna yol açabilmesi, tedavide beklenen başarıya ulaşamaması, alternatif tedavi yöntemlerine olan talebi artırmıştır. Bu bağlamda, tıbbi bitkiler, görece güvenilirlikleri, düşük yan etkileri ve maliyetleri ile etkili bir tedavi alternatifi olarak öne çıkmaktadır (Bandelow et al., 2017; Bayir et al., 2023; Karaarslan et al., 2024).

Kaju kabuğu (*A. occidentale*), ekonomik olmasının yanı sıra, zengin kimyasal içeriği nedeniyle ilaç endüstrisinde sıkça tercih edilmektedir. İçeriğindeki anakardik asit ve triptofan, antitümör ve antimikrobiyal aktiviteleriyle daha önce çeşitli çalışmalara konu olmuştur. Ancak, kaju kabuğunun anksiyolitik etkileri üzerine yapılmış sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır ve bunlar çoğunlukla kemirgenler üzerinde gerçekleştirilmiştir (Baptista et al., 2018; Baptista et al., 2020; Siracusa et al., 2020). Zebra balıkları ile ilgili ise herhangi bir veri bulunmamaktadır. Bu çalışmamız, kaju kabuğundan elde edilen sekonder metabolitlerin farmakolojik etkilerini araştırarak, anksiyolitik etkileri konusunda önemli veriler sunmayı hedeflemiştir. Elde edilen bulgular, bu metabolitlerin anksiyolitik etki potansiyelini ortaya koymaktadır.

Tablo 3'te, model organizmada tespit edilen 64 farklı lipitin anlamlı farklılıklar gösterdiği belirtilmiştir. Bu veriler, kaju

ekstraktının lipid profili üzerindeki etkilerini net bir şekilde ortaya koymaktadır. Şekil 4'deki Kısmi Bileşen Analizi (PLS-DA) skor grafiği, kaju ve kontrol gruplarının belirgin bir şekilde ayrıldığını göstermektedir. Bu, kaju grubunun kontrol grubuna kıyasla farklı bir bileşen profiline sahip olduğunu ortaya koymaktadır. Şekil 3'teki hiyerarşik küme analizi dendogramında, rastgele oluşturulan grupların birbirinden açıkça ayrıldığını gözlemlenmiştir. Bu ayrımın netliği, analizin başarıyla gerçekleştirildiğinin bir göstergesidir. Şekil 4'teki PLS-DA Modeli ROC eğrilerindeki AUC değerlerinin 1.0000 olması, modelin iki grup arasında mükemmel bir ayırım yapabildiğini ve doğruluğunun çok yüksek olduğunu gösterir. Bu, kaju ekstrası alan ve almayan balıkların yüzde yüz doğrulukla ayırt edilebileceğini kanıtlamaktadır. Bu grafik, kaju verilen deney grubunun diazepam verilen kontrol grubuna göre çok daha farklı bir lipid profiline sahip olduğunu da göstermektedir.

Permütasyon analizi grafiğinin sağında kalan değerler kendi diazepam ve kaju değerlerimiz. Solunda kalanlar ise iterasyonu yapılan değerleri gösterir. İterasyonu yapılan değerlerin hepsi ana modelden daha kötü performans göstermiş. Bu da elde edilen başarının rastgele olmadığını bize kanıtlar (Şekil 5). Şekil 6' daki korelasyon matrisinde, "17-hydroxyprogesterone" ve "17alpha, 20alpha-Dihydroxy-4-pregnene-3-one" bileşenleri arasında yüksek pozitif korelasyon gözlemlenmiştir. Bu, bu bileşenlerin aynı biyokimyasal yolda işlev gördüğünü veya birlikte düzenlendiğini gösterebilir. "Cortisol" ve "17 hydroxyprogesterone" arasındaki negatif korelasyon, bu bileşenlerin farklı biyolojik süreçlerde yer aldığını veya birbirini dengeleyici işlevlere sahip olabileceğini düşündürmektedir. Şekil 7'de kaju ekstresi almış zebra balığı modelinde en fazla artış gösteren lipit olan 13-L-hidroperoksilineleik asit dikkat çekmektedir. Linoleik asit, vücutta araşidonik asite dönüşerek prostaglandinler ve lökotrienler gibi biyolojik olarak önemli bileşiklerin oluşumuna katkı sağlar. Linoleik asit, aynı zamanda anti-enflamatuvar ve anti-seboreik etki gösterdiği bilinen bir bileşiktir (Innes & Calder, 2018; Lin et al., 2017).

Thigmotaksis, zebra balığı larvalarında anksiyete indeksinin belirleyicisi olarak kabul edilir ve genel olarak canlıların çevresel uyarılara duyarlılığının bir göstergesidir (Pir et al., 2024). Şekil 8'deki thigmotaxis oranı, kaju ekstresi verilmiş deney grubunun daha düşük bir orana sahip olduğunu göstermektedir. Bu, kaju ile beslenen model organizmada anksiyete durumunun azaldığını, yani tedaviye yanıt gösterildiğini düşündürmektedir. Şekil 9'da, zebra balıklarının kat ettiği toplam mesafeler kıyaslanarak iyileşme düzeyleri analiz edilmiştir. Diazepam verilen grubun deney grubuna kıyasla daha az hareket ettiği gözlemlenmiştir, bu da kaju ekstresinin diazepam benzeri anksiyolitik etki göstermiştir.

## Sonuç

Elde edilen bulgular, kaju ekstresinin anksiyete tedavisinde potansiyel bir tedavi alternatifi olabileceğini göstermektedir. Yapılan metabolit analizleri ve kemometrik değerlendirmeler, kaju ekstrasının vücutta önemli değişikliklere yol açtığını ve anksiyete tedavisinde faydalı olabilecek metabolitlerin bulunduğunu ortaya koymuştur. Gelecekteki çalışmalar, kaju ekstresinin insanlarda uygulanabilirliğini ve anksiyete tedavisindeki etkinliğini daha ayrıntılı bir şekilde inceleyerek, bu bitkinin tedaviye katkısını daha iyi anlamamıza yardımcı olacaktır.

**Etik Komite Onayı:** Çalışmada beş günlükten küçük larvalar kullanıldığı için etik onaya gerek duyulmamıştır (Direktif 86/609/EEC ve AB Direktifi 2010/63/EU) (<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2024.174614>).

**Hakem Değerlendirmesi:** Dış bağımsız.

**Yazar Katkıları:** Fikir – E.S., S.B.C., S.K., O.Ş.; Tasarım – E.S., S.B.C., S.K., O.Ş.; Denetleme – S.B.C., O.Ş.; Kaynaklar – O.Ş.; Veri Toplanması ve/veya İşlemesi – S.Ö., Ş.O., S.H.T., E.T.; Analiz ve/veya Yorum- S.Ö., Ş.O., S.H.T., S.K., O.Ş.; Literatür Taraması - S.Ö., Ş.O., S.H.T., S.K., O.Ş.; Yazıyı Yazan- S.Ö., Ş.O., S.H.T., E.S., S.B.C., E.T., S.K., O.Ş.; Eleştirel İnceleme – S.B.C., O.Ş.

**Çıkar Çatışması:** Yazarlar, çıkar çatışması olmadığını beyan etmiştir.

**Finansal Destek:** Yazarlar, bu çalışma için finansal destek aldığını beyan etmiştir (TUBITAK 2209 Proje No:1919B012306586).

**Ethics Committee Approval:** Ethical approval was not required as the study used larvae younger than five days old (Directive 86/609/EEC and EU Directive 2010/63/EU) (<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2024.174614>).

**Peer-review:** Externally peer-reviewed.

**Author Contributions:** Concept – E.S., S.B.C., S.K., O.Ş.; Design – E.S., S.B.C., S.K., O.Ş.; Supervision – S.B.C., O.Ş.; Resources – O.Ş.; Data Collection and/or Processing – S.Ö., Ş.O., S.H.T., E.T.; Analysis and/or Interpretation - S.Ö., Ş.O., S.H.T., S.K., O.Ş.; Literature Search - S.Ö., Ş.O., S.H.T., S.K., O.Ş.; Writing – S.Ö., Ş.O., S.H.T., E.S., S.B.C., E.T., S.K., O.Ş.; Critical Review – S.B.C., O.Ş.

**Conflict of Interest:** The authors have no conflicts of interest to declare.

**Financial Disclosure:** The authors declared that they received financial support for this study (TUBITAK 2209 Project No: 1919B012306586).

## Kaynaklar

- Akinpelu, D. A. (2001). Antimicrobial activity of *Anacardium occidentale* bark. *Fitoterapia*, 72(3), 286–287. [https://doi.org/10.1016/S0367-326X\(00\)00310-5](https://doi.org/10.1016/S0367-326X(00)00310-5)
- Bandelow, B., Michaelis, S., & Wedekind, D. (2017). Treatment of anxiety disorders. *Dialogues in Clinical Neuroscience*, 19(2), 93–107. <https://doi.org/10.31887/DCNS.2017.19.2/BBANDELOW>
- Baptista, A. B., Sarandy, M. M., Gonçalves, R. V., Novaes, R. D., Gonçalves da Costa, C., Leite, J. P. V., & Peluzio, M. do C. G. (2020). Antioxidant and anti-inflammatory effects of *Anacardium occidentale* L. and *anacardium microcarpum* D. Extracts on the liver of IL-10 knockout mice. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine: ECAM*, 2020, 3054521. <https://doi.org/10.1155/2020/3054521>
- Baptista, A., Gonçalves, R. V., Bressan, J., & do Carmo Gouveia Pelúzio, M. (2018). Antioxidant and antimicrobial activities of crude extracts and fractions of cashew (*Anacardium occidentale* L.), Cajui (*Anacardium microcarpum*), and pequi (*Caryocar brasiliense* C.): A systematic review. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/3753562>
- Bayir, E., Elgin Cebe, G., Yazar, S., Author, C., & Bayir, E. (2023). Anksiyete ve uyku bozukluklarında kullanılan tıbbi bitkiler. *Ankara*



- Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi, 47(3), 1084–1100. <https://doi.org/10.33483/JFPAU.1270660>
- Dendena, B., & Corsi, S. (2014). Cashew, from seed to market: A review. *Agronomy for Sustainable Development*, 34(4), 753–772. <https://doi.org/10.1007/S13593-014-0240-7/FIGURES/6>
- Hamilton, T. J., Krook, J., Szaszkievicz, J., & Burggren, W. (2021). Shoaling, boldness, anxiety-like behavior and locomotion in zebrafish (*Danio rerio*) are altered by acute benzo[a]pyrene exposure. *The Science of the Total Environment*, 774. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2021.145702>
- Innes, J. K., & Calder, P. C. (2018). Omega-6 fatty acids and inflammation. *Prostaglandins, Leukotrienes, and Essential Fatty Acids*, 132, 41–48. <https://doi.org/10.1016/J.PLEFA.2018.03.004>
- Kankaynar, M., Ceyhun, H. A., Baran, A., Sulukan, E., Yildirim, S., Bolat, İ., Toraman, E., Nadaroglu, H., Arslan, M., & Ceyhun, S. B. (2023). The anxiolytic and circadian regulatory effect of agarwood water extract and its effects on the next generation; zebrafish modelling. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 269, 109621. <https://doi.org/10.1016/J.CBPC.2023.109621>
- Karaarslan, İ., Karaarslan, F., Koca Çalışkan, U., Bilimleri, S., Abdurrahman, Ü., Ankara, Y., Eğitim, O., Hastanesi, A., Sağlığı, R., Abd, H., Gülhane, Ü., Fakültesi, T., Ekoloji, T., Abd, H., Ankara, T., Üniversitesi, D., Fakültesi, E., Abd, F., & Üniversitesi, G. (2024). Sedatif ve anksiyolitik etkili aromaterapötikler: 2011-2023 yılları arası klinik çalışmaların derlemesi: sistematik derleme. *Geleneksel ve Tamamlayıcı Tıp Dergisi*, 7(1), 100–112. <https://doi.org/10.5336/JTRACOM.2023-98324>
- Karasakal, Ö. F. (2021). Bazı antidepresan ilaçların zebra balığı (*Danio rerio*)'ndaki oksidatif stres parametrelerine olan etkilerinin biyokimyasal ve moleküler yöntemler ile değerlendirilmesi / Evaluation the effects of some antidepressant drugs on oxidative stress parameters with biochemical and molecular methods in zebrafish (*Danio rerio*) [Marmara Üniversitesi].
- Konan, N. A., & Bacchi, E. M. (2007). Antiulcerogenic effect and acute toxicity of a hydroethanolic extract from the cashew (*Anacardium occidentale* L.) leaves. *Journal of Ethnopharmacology*, 112(2), 237–242. <https://doi.org/10.1016/J.JEP.2007.03.003>
- Lim, T. K. (2010). Medicinal and Non-medicinal Edible Plants. 10, 26–68.
- Lin, T. K., Zhong, L., & Santiago, J. L. (2017). Anti-inflammatory and skin barrier repair effects of topical application of some plant oils. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(1), 70. <https://doi.org/10.3390/IJMS19010070>
- Longo, L. P., & Johnson, B. (2000). Addiction: Part I. Benzodiazepines—side effects, abuse risk and alternatives. *American Family Physician*, 61(7), 2121–2128.
- Pir, R., Sulukan, E., Şenol, O., Atakay, M., Baran, A., Kankaynar, M., Yıldız, E., Salih, B., & Ceyhun, S. B. (2024). Co-exposure effect of different colour of LED lights and increasing temperature on zebrafish larvae (*Danio rerio*): Immunohistochemical, metabolomics, molecular and behaviour approaches. *Science of the Total Environment*, 951, 175468. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2024.175468>
- Ranjith, C., Alphonse, W., & Rajaretnam, R. K. (2022). Habituation and behavioural response of confinement-induced anxiety conditions in a zebrafish model. *Applied Biosciences*, 1(3), 315–323. <https://doi.org/10.3390/APPL BIOSCI1030020>
- Razali, N., Razab, R., Junit, S. M., & Aziz, A. A. (2008). Radical scavenging and reducing properties of extracts of cashew shoots (*Anacardium occidentale*). *Food Chemistry*, 111(1), 38–44. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2008.03.024>
- Remes, O., Brayne, C., van der Linde, R., & Lafortune, L. (2016). A systematic review of reviews on the prevalence of anxiety disorders in adult populations. *Brain and Behavior*, 6(7). <https://doi.org/10.1002/BRB3.497>
- Siracusa, R., Fusco, R., Peritore, A. F., Cordaro, M., D'amico, R., Genovese, T., Gugliandolo, E., Crupi, R., Smeriglio, A., Mandalari, G., Cuzzocrea, S., Di Paola, R., & Impellizzeri, D. (2020). The Antioxidant and anti-inflammatory properties of *Anacardium occidentale* l. cashew nuts in a mouse model of colitis. *Nutrients*, 12(3). <https://doi.org/10.3390/NU12030834>
- Togola, I., Kaya, Y., Diarra, N., Abdoulaye Konare, M., Denou, A., & Sanogo, R. (2020). Comparative study of the phytochemistry and antioxidant activity of *Anacardium occidentale* (L.) leaf and stem bark extracts. *Journal of Diseases and Medicinal Plants*, 6(3), 72. <https://doi.org/10.11648/J.JDMP.20200603.13>