



**UDİ HUNDİ TOZU SU EKSTRAKTININ
ANKSIYOLİTİK, SİRKADİYEN DÜZENLEYİCİ ETKİSİ
VE GELECEK NESİL ÜZERİNDEKİ ETKİLERİ; ZEBRA
BALIĞI MODELLEMESİ**

Meryem KANKAYNAR

Danışman: Prof. Dr. Saltuk Buğrahan CEYHUN
Yüksek Lisans Tezi
Nanobilim ve Nanomühendislik Ana Bilim Dalı
2023
(Her hakkı saklıdır.)

T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
NANOBİLİM VE NANOMÜHENDİSLİK ANA BİLİM DALI

**UDİ HUNDİ TOZU SU EKSTRAKTININ ANKSİYOLİTİK, SİRKADİYEN
DÜZENLEYİCİ ETKİSİ VE GELECEK NESİL ÜZERİNDEKİ ETKİLERİ; ZEBRA
BALIĞI MODELLEMESİ**

(The anxiolytic and circadian regulatory effect of agarwood water extract and its effects on
the next generation; zebrafish modelling)

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Meryem KANKAYNAR

Prof. Dr. Saltuk Buğrahan CEYHUN

Erzurum
Ocak, 2023

KABUL VE ONAY TUTANAĞI

Meryem KANKAYNAR tarafından hazırlanan “Udi hindi tozu su ekstraktının anksiyolitik, sirkadiyen düzenleyici etkisi ve gelecek nesil üzerindeki etkileri; zebra balığı modellemesi” başlıklı çalışması 12/ 01 /2023 tarihinde yapılan tez savunma sınavı sonucunda başarılı bulunarak jürimiz tarafından Nanobilim ve Nanomühendislik Ana Bilim Dalı, Nanobilim ve Nanomühendislik Bilim Dalında yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı:	Prof.Dr. Hayrunnisa NADAROĞLU <i>Atatürk ÜNİVERSİTESİ</i>	Aslı ısla imzalıdır
Danışman:	Prof. Dr. Saltuk Buğrahan CEYHUN <i>Atatürk ÜNİVERSİTESİ</i>	Aslı ısla imzalıdır
Jüri Üyesi:	Dr. Öğr. Üyesi Mine KÖKTÜRK <i>Iğdır ÜNİVERSİTESİ</i>	Aslı ısla imzalıdır

Bu tezin Atatürk Üniversitesi Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddelerinde belirtilen şartları yerine getirdiğini onaylarım.

Prof. Dr. Saltuk Buğrahan CEYHUN

Enstitü Müdürü

Aslı ısla imzalıdır

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaklardan yapılan bildiriş, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak olarak kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU

Yüksek Lisans Tezi olarak Prof. Dr. Saltuk Buğrahan CEYHUN danışmanlığında sunulan “Udi hindi tozu su ekstraktının anksiyolitik, sirkadiyen düzenleyici etkisi ve gelecek nesil üzerindeki etkileri; zebra balığı modellemesi” başlıklı çalışmanın tarafımızdan bilimsel etik ilkelere uyularak yazıldığını, yararlanılan eserlerin kaynakçada gösterildiğini, Fen Bilimleri Enstitüsü tarafından belirlenmiş olan Turnitin Programı benzerlik oranlarının aşılmadığını ve aşağıdaki oranlarda olduğunu beyan ederiz.

Tez Bölümleri	Tezin Benzerlik Oranı (%)	Maksimum Oran (%)
Giriş	11	30
Kuramsal Temeller	6	30
Materyal ve Yöntem	11	35
Araştırma Bulguları ve Tartışma	6	20
Sonuç ve Öneriler	0	20
Tezin Geneli	8	25

Not: Yedi kelimeye kadar benzerlikler ile Başlık, Kaynakça, İçindekiler, Teşekkür, Dizin ve Ekler kısımları tarama dışı bırakılabilir. Yukarıdaki azami benzerlik oranları yanında tek bir kaynaktan olan benzerlik oranlarının %5'den büyük olmaması gerekir.

Beyan edilen bilgilerin doğru olduğunu, aksi halde doğacak hukuki sorumlulukları kabul ve beyan ederiz.

Tez Yazarı (Öğrenci)	Tez Danışmanı
Meryem KANKAYNAR	Prof. Dr. Saltuk Buğrahan CEYHUN
12.1.2023	12.1.2023
İmza: Aslı ısla imzalıdır	İmza: Aslı ısla imzalıdır

* Tez ile ilgili YÖKTEZ’de yayınlamasına ilişkin bir engelleme var ise aşağıdaki alanı doldurunuz.

☐ Tezle ilgili patent başvurusu yapılması / patent alma sürecinin devam etmesi sebebiyle Enstitü Yönetim Kurulunun/....../.... tarih ve sayılı kararı ile teze erişim 2 (iki) yıl süreyle engellenmiştir.

☐ Enstitü Yönetim Kurulunun/....../.... tarih ve sayılı kararı ile teze erişim 6 (altı) ay süreyle engellenmiştir.

TEŞEKKÜR

Lisansüstü eğitimim boyunca tecrübesiyle bana yol gösteren, ilgi ve anlayışını esirgemeyen, daha ileriye gitmem için yol gösterici olan, ufkumu genişleten, çok kıymetli ve saygıdeğer danışman hocam Sayın Prof. Dr. Saltuk Buğrahan CEYHUN'a,

Tez çalışmamda konumu belirlemede bana yardımcı olan, bilgi, öneri ve desteklerini esirgemeyen çok kıymetli ve saygıdeğer hocam Sayın Dr. Öğr. Üyesi Hacer AKGÜL CEYHUN'a

Lisansüstü eğitimim ve tez çalışmam süresince çok büyük emeği olan, tüm bilgilerini ve tecrübelerini her zaman paylaştan, anlayışını esirgemeyen, yol gösterici olan kendisinden çok şey öğrendiğim çok kıymetli ve saygıdeğer hocam Dr. Ekrem SULUKAN'a

Yüksek lisans dönemimde, bilgi ve deneyimlerini paylaştan, tez yazımda yardımcı olan Sayın Dr. Öğr. Üyesi Alper BARAN'a,

Tez çalışmamda bitki ekstraksiyonun yapılmasında yardım ve ilgisini esirgemeyen Sayın Prof. Dr. Hayrunnisa NADAROĞLU'na; yem formülasyonunun hazırlanmasında yardımcı olan, bilgi ve tecrübelerini paylaştan Sayın Prof. Dr. Murat ARSLAN'a,

Histopatoloji analizlerinin laboratuvar aşamasında çalışılmasında emeği geçen hocalarım Sayın Doç. Dr. Serkan YILDIRIM ve Sayın Dr. Öğr. Üyesi İsmail BOLAT'a,

Tez çalışmamda Histopatoloji analizleri için dokuların toplanması esnasında emeğini ve yardımlarını esirgemeyen Sayın Arş. Gör. Emine TORAMAN'a; yem yapımında değerli zamanını, gerekli yardım ve ilgisini esirgemeyen Sayın Doktora öğrencisi Şeyda TACER TANAS'a,

Tez çalışmamda laboratuvarında yapılan çalışmalarda büyük destek ve yardımlarını gördüğüm değerli zamanını ve emeğini esirgemeyen Sayın Doktora öğrencisi Tuba KIZILTAN ve Sayın Yüksek lisans öğrencisi Rabia PİR'e,

Tez çalışma döneminde manevi desteklerini ve yardımlarını esirgemeyen arkadaşım Sayın Yüksek Mühendis Büşra AYDOĞDU'ya; yüksek lisansa başlarken bilgilerini paylaştan, yardımcı olan Sayın Uzman Diyetisyen Medine TÜRKOĞLU'na teşekkürü bir borç bilirim.

Tez dönemim boyunca ilgi ve alakalarını esirgemeyen arkadaşlarıma, manevi destekleriyle her zaman yanımda olan anneme ve babama çok teşekkür ederim.

Meryem KANKAYNAR

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

UDİ HUNDİ TOZU SU EKSTRAKTININ ANKSİYOLİTİK, SİRKADİYEN DÜZENLEYİCİ ETKİSİ VE GELECEK NESİL ÜZERİNDEKİ ETKİLERİ; ZEBRA BALIĞI MODELLEMESİ

Meryem KANKAYNAR

Danışman: Prof. Dr. Saltuk Buğrahan CEYHUN

Amaç: Bu tez çalışmasında; COVID-19'un da başlamasıyla birlikte dünya çapında en yaygın psikiyatrik semptomlardan biri olan anksiyetenin artışı sonucunda alternatif tedavi olarak udi hindi tozu ekstraktının, allopatrik avcı kaynaklı zebra balığı modeli üzerinde anksiyolitik ve sirkadiyen ritim düzenleyici etkisinin incelenmesi ve aynı zamanda zebra balıklarında davranışsal biyokimyasal morfolojik parametreler incelenerek udi hindi tozu ekstraktının bu balıklardan alınan yeni nesilde de etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

Yöntem: Bu çalışmada, yetişkin zebra balıkları 3 hafta ve 8 hafta boyunca 10 ppm ve 100 ppm udi hindi tozu içeren diyetlerle beslendi. Zebra balığı, udi hindi tozunun anksiyolitik etkisini test etmek için oscar balığı kullanılarak avcı stresine maruz bırakıldı. Süre sonunda avcı stresine maruz kalan zebra balıkları anksiyete ve sirkadiyen testlerine tabi tutuldu. Zebra balığı beyinlerinde BDNF ve 5HT4-R proteinlerinin histopatolojik değerlendirmesi ve immünofloresan analizleri yapıldı. Ayrıca zebra balığından yavru alınarak bir sonraki nesil üzerindeki etkileri morfolojik değişimler, davranış analizleri yapılarak incelenmiştir.

Bulgular: Elde edilen sonuçlara göre, zebra balıklarında allopatrik avcısı kırmızı kaplan oscar balığı ile stres maruziyeti sonucunda anksiyojenik etkisinin olduğu ve udi hindi tozu ekstraktının, kaygı benzeri davranışlar ve uygulanan yırtıcı stresin tetiklediği bozulan sirkadiyen ritim üzerinde iyileştirici etkisinin olduğu gözlemlendi. İlginç bir şekilde, negatif kontrol grubu ile karşılaştırıldığında maternal yırtıcı stresin etkisinin larvalarda daha kısa boy, daha küçük göz çapı, artmış perikardiyal ödem ve total vücut malformasyonu ile sonuçlandığı görüldü. Udi hindi tozu ile beslenen zebra balıklarından alınan yavrularda da yırtıcı stres kaynaklı değişiklikleri önlediği gözlemlendi.

Sonuç: Daha önceki çalışmalarda oscar balığının (*Astronotus ocellatus*) zebra balıkları üzerinde anksiyojenik etkisi ve farklı bitki ekstraktlarının farklı metodlarla denendiğinde anksiyolitik etkisi gösterilmiştir. Çalışmamız COVID-19'un da başlamasıyla oluşan stres sonucunda yaygın hale gelen anksiyetenin iyileştirilmesi için alternatif tedavi olarak udi hindi ekstraktı kullanımının önemini ortaya koymuştur. Sonuçlara göre udi hindi tozu diyetiyle 8 hafta boyunca beslenmenin daha yararlı etkisi olduğu da görülmektedir. Ek olarak, udi hindi tozu ile ilgili yeterince çalışma yapılmaması ile birlikte yararlı etkisiyle ilgili bilgileri geliştirmek kullanımını teşvik etmek için daha fazla çalışmalara ihtiyaç vardır.

Anahtar Kelimeler: Sedatif etki, udi hindi tozu, avcı stresi, sirkadiyen ritim, anksiyete

Ocak 2023, 64 sayfa

ABSTRACT

MASTER THESIS

THE ANXIOLYTIC AND CIRCADIAN REGULATORY EFFECT OF AGARWOOD WATER EXTRACT AND ITS EFFECTS ON THE NEXT GENERATION; ZEBRAFISH MODELLING

Meryem KANKAYNAR

Supervisor: Prof. Dr. Saltuk Buğrahan CEYHUN

Purpose: In this thesis; As a result of the increase in anxiety, which is one of the most common psychiatric symptoms worldwide with the onset of COVID-19, the anxiolytic a circadian rhythm-regulating effect of agarwood extract as an alternative treatment on the allopatric predator-derived zebrafish model, a also by examining the behavioral biochemical morphological parameters in zebrafish. It was aimed to investigate the effect of agarwood extract on the new generation taken from these fish.

Method: In the present study, zebrafish fed with diets containing 10 ppm a 100ppm water extract of Agarwood heartwood (AWE) for 3 weeks a 8 weeks were exposed to predator stress using oscar fish in order to test the potential anxiolytic effect of AWE. At the e of the period, zebrafish exposed to predator stress were subjected to anxiety a circadian tests. Histopathological evaluation a immunofluorescent analyzes of BDNF a 5HT4-R proteins were performed in the brains of zebrafish. In addition, the effects on the next generation were examined by taking offspring from zebrafish.

Findings: According to the results, it was observed that AWE had a healing effect on anxiety-like behaviors a on the disrupted circadian rhythm triggered by the applied predatory stress. Interestingly, the effect of maternal predator stress resulted in shorter stature, smaller eye diameter, increased pericardial edema, a total body malformation in larvae compared to the negative control group. It was observed that it inhibited predatory stress-iuced changes in zebrafish larvae fed agarwood.

Results: In previous studies, anxiogenic effect of predator oscar fish (*Astronotus ocellatus*) on zebrafish a anxiolytic effect of different plant extracts when tested with different methods have been shown. Our study has revealed the importance of using agarwood extract as an alternative treatment for the improvement of anxiety, which has become widespread as a result of the stress caused by the onset of COVID-19. According to the results, it is also seen that feeding with the agarwood diet for 8 weeks has a more beneficial effect. In addition, although there is not enough study on agarwood extract, more studies are needed to improve information about its beneficial effect a to encourage its use.

Keywords: Sedative effect; agarwood; predator stress; circadian rhythm; anxiety

January 2023, 64 pages

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY TUTANAĞI.....	i
ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU	ii
TEŞEKKÜR	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
TABLolar DİZİNİ.....	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	x
GİRİŞ.....	1
KURAMSAL TEMELLER.....	8
MATERYAL VE METOT	14
Materyal	14
Balık materyali ve deney düzeneği	14
Yem formülasyonun hazırlanması	15
Zebra balığının allopatrik avcısı oscar balığı (<i>astronotus ocellatus</i>) ile strese maruz kalması	17
Yetişkin balık davranış testi	18
Yetişkin balıkların organlarının çıkarılması (diseksiyon işlemi)	19
Yetişkin zebra balığı beyin dokularının histopatolojisi	19
Larva Zebra Balıklarının Analizi	20
Besleme sonrası balıkların üremeye bırakılması.....	20
Yavru larvaların reaktif oksijen türevlerini CM-H2DCFDA indikatörü ile boyayarak oksidatif stresin belirlenmesi	20
Apoptotik hücrelerin tayin edilmesi.....	21
Vücüttaki lipid düzeyinin görüntülenmesi	21
Morfolojik ve fizyolojik ölçümler (vücut uzunluğu, göz boyutu, kan akışı ve kalp hızı)	21
Larva lokomotor aktivitesi ve tigmotaksis	22
İstatistik Analiz	23
ARAŞTIRMA BULGULARI	24

Yetişkin Zebra Balığı Davranış Analizleri.....	24
Udi hindi tozunun yetişkin zebra balığında anksiyolitik etkisi.....	24
Udi hindi tozunun yetişkin zebra balığında sirkadiyen ritim üzerindeki dñzenleyici etkisi	25
Udi hindi tozunun yetişkin zebra balığı beyinde histopatolojik ve immñnohistokimyasal etkileri.....	27
Maternal predator stresinin ve udi hindi takviyeli diyetin zebra balığı yavruları üzerindeki etkileri.....	28
TARTIşMA ve SONUÇ	36
Sonuçlar ve Öneriler	40
KAYNAKLAR.....	43
EKLER	53
EK 1. Tezden Üretilen Makale.....	53
ÖZGEÇMİş.....	65

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1. Çalışmada Kullanılan Yem Formülasyonu	16
Tablo 2. Zebra Balığı Beyin Kesitlerinde 5-HT4-R ve BDNF İmmüno pozitifliğinin Skorlama Tablosu.....	28



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Tank düzeneği	14
Şekil 2. Tez çalışması grup organizasyonu	15
Şekil 3. Yem hazırlama aşamaları	17
Şekil 4. Denemede kullanılan oscar balığı	17
Şekil 5. Zebra balığı avcı predator oscar balığına maruziyet deney düzeneği	18
Şekil 6. Çalışma özetinin kurgusu	22
Şekil 7. Yeni tank dalış testi analiz grafikleri, ısı grafiği ve zebra balığı anksiyete test sistemi.....	24
Şekil 8. Sirkadiyen ritim testi analiz sonuçları ve deney düzeneği	26
Şekil 9. Zebra balığı beyin kesitlerinde 5-HT4-R ve BDNF immünopozitifliğinin belirlenmesi	27
Şekil 10. Zebra balığı larvalarının göz çapı malformasyonlarının belirlenmesi	29
Şekil 11. Zebra balığı larvalarının hayatta kalma ve yumurtadan çıkış oranları.....	29
Şekil 12. Zebra balığı larvalarının toplam malformasyon oranı ve 96. Saat boy uzunluğu	29
Şekil 13. Zebra balığı larvalarında perikardiyal alan malformasyonlarının belirlenmesi.....	30
Şekil 14. Zebra balığı embriyolarının mikroskopik görüntüleri. Skala: 200 µm	30
Şekil 15. Zebra balığı larvalarında kan akış aktivitesi ve kalp atış hızı	31
Şekil 16. Tigmotaksis ve yavru larvaların lokomotor aktivite sonuçları	31
Şekil 17. Tigmotaksis sonuçlarına göre ısı grafiği	32
Şekil 18. CMH2DCFDA boyama sonuçlarının ve floresans yoğunluklarının belirlenmesi	33
Şekil 19. Akridin orange (AO) boyama sonuçları ve apoptoza uğramış hücrelerin floresans yoğunluğu.....	34
Şekil 20. Nil red boyama sonuçları ve floresans yoğunluğu	35

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

HPA	Hipotalamik-Hipofiz-Adrenal
CRF	Kortikotropin Salma Faktörü
ACTH	Adrenokortikotropin Salgılayıcı Hormon
Gr	Glukokortikoid Reseptörü
HPI	Hipotalamus-Hipofiz-Böbreklerarası
SSRI	Seçici Serotonin Geri Alım İnhibitörü
REM	Hızlı Göz Hareketi
NE	Norepinefrin
CRH	Kortikotropin Salgılatıcı Hormon
SWS	Yavaş Dalga Uykusu
CM-H2DCFDA	5-krometil-2', 7'-diklorodihidrofloresan diasetat asetil ester
C20-H18-N2-O2	9-dietilamino-5H-benzo (a) fenoksazin-5-o
AO	Akridin Orange
PBS	Phosphate-Buffered Saline
ROS	Reaktif Oksijen Türleri
5HT4	5-Hidroksitriptamin Reseptör 4
LPO	Lipid Peroksidasyonu
BDNF	Beyin Türevli Netrofik Faktör
GABA	Gama aminobütirik asit
CNS	Merkezi sinir sistemi
5HIAA	5-Hidroksiindolasetik Asit
DOPAC	3,4-Dihidroksifenilasetik Asit

GİRİŞ

Anksiyete, bir bireyin potansiyel veya gerçek bir tehlikeyle başa çıkabilmesine yardımcı olan, hayatta kalabilmek için bireyin alarm mekanizmalarını harekete geçiren, şiddeti ayarlanabilen bir uyarılmışlık durumudur (Rosen *et al.* 2022). Anksiyete organizmanın potansiyel olarak tehlikeli durumlara girmesini önlemek için gelişmiştir (Gray, 2019).

Anksiyete %28,8 oran ile dünya çapında en yaygın görülen psikiyatrik belirtidir (Dalvie *et al.* 2020). Anksiyete bozuklukları küresel nüfusunda yaklaşık %7-10'unu etkilemektedir (Collier *et al.* 2017). COVID-19'un başlamasıyla birlikte de birçok çalışmada anksiyete semptomlarında %25,6 oranında büyük artışlar görüldüğü pandeminin etkisiyle dünya genelinde anksiyete bozukluğu vakalarında artışın önemi bildirilmektedir (Santomauro *et al.* 2021; Schafer *et al.* 2022). Epidemiyolojik çalışmalar anksiyete bozukluklarının dünya çapında en yaygın ruhsal bozukluklar olup incelenen tüm psikiyatrik bozuklukların dörtte üçünden fazlasını oluşturduğu bildirilmektedir (Bruce *et al.* 2005). Son on yılda yapılan çalışmalara baktığımızda ise anksiyetenin özellikle çocuklar ve ergenler arasında yaygın olduğu görülmektedir. Ortalama başlangıç yaşı 11'dir ve semptomları genellikle yetişkinliğe kadar devam etmekte ve yüksek nüks olasılığı bildirilmektedir (McGuinn *et al.* 2022). Hastalığın uzayan seyri ve kronik gidişi bireylerin mesleki ve sosyal işlevselliğini önemli ölçüde olumsuz etkilemekte topluma önemli bir yük getirmektedir (Karaytuğ *vd.* 2021). Yakın tarihli bir meta-analizde, anksiyete bozukluğu olan ebeveynlerin çocuklarının, anksiyete bozukluğu olmayan ebeveynlerin çocuklarına kıyasla, 1,76 risk oranıyla anksiyete bozukluğuna sahip olma olasılıklarının daha yüksek olduğu bulunmuştur (Lawrence *et al.* 2019).

Anksiyete bozuklukları; çok sayıda genetik, biyolojik ve çevresel faktörlere sahip özellikle stresin rol oynadığı nöropsikiyatrik hastalıklar dizisidir (Evrensel *et al.* 2020). Hamilelik sırasında da stresörlere yanıt olarak maternal hipotalamik-hipofiz-adrenal (HPA) ekseninin düzensizliği, fetal dönemde stres hormonlarına maruz kalma sonucunda anksiyetenin tetiklenebileceği düşünülmektedir (McGuinn *et al.* 2022). HPA eksen, strese yanıt olarak salınan etkileşimli bir hormon sistemidir. CRF (kortikotropin salgılatıcı faktör) ise glukokortikoid (stres durumua salgılanan hormon) sentez ve salınımını aktive eder ve HPA eksenini etkilemektedir (Balcioglu, 2002). Anksiyete bozukluklarında stres maruziyeti sonucu CRF aktivitesi artar. CRF'nin hipotalamus tarafından salınması, hipofizin adrenokortikotropin salgılayan hormonunun (ACTH) kan dolaşımına dağıtmasını sağlar. ACTH, kortizol gibi

glukokortikoidlerin salınmasını kolaylaştıran adrenal korteks tarafından tespit edilir. Negatif geri bildirim, kortizolün hipotalamus ve hipofizdeki glukokortikoid reseptörlerine bağlanması ve sonraki CRF ve ACTH salınımını baskılaması durumunda oluşur (Mathew *et al.* 2008). HPA ekseninin bozulması da anksiyete ve depresyon da dahil olmak üzere psikiyatrik bozuklukların altında yatan temel biyolojik mekanizmalardan biri olarak kabul edilmektedir (Gądek-Michalska *et al.* 2013).

Hem stresi hem de kaygıyı kontrol eden iç içe geçmiş nöral devreler hem sağlıklı hem de patolojik koşullarda stres deneyimleri ve kaygı arasında güçlü çift yönlü ilişki olduğunu düşündürmektedir (Daviu *et al.* 2019). Hem akut hem de kronik stres türleri, çoklu fizyolojik mekanizmalar aracılığıyla hareket ederek merkezi sinir sistemini etkilemektedir (Journal *et al.* 1976). Anksiyete esas olarak santral sinir sisteminden kaynaklanmaktadır. Beyindeki subkortikal yapılar içinde talamus, hipotalamus, pineal bez, hipofiz ve amigdala gibi önemli nöroanatomik oluşumları içeren limbik sistem; bellek ve duygudurum değişikliklerinden sorumlu önemli bir bölgedir. Amigdala ise korku duygusu ve anksiyete oluşumuna en önemli role sahip olan nöroanatomik bir yapıdır (Phelps and LeDoux, 2005). Tehdit yanıtını koordine eder ve korku uyarısı sonucu amigdala aktive edilir. Beyin korku yanıtı amigdalaya giren ve amigdaladan çıkan çok sayıda nöronal bağlantı tarafından düzenlenir (Mathew *et al.* 2008). Amigdala ile hipotalamus, GABA (Gama aminobütirik asit), glutamat, serotonin reseptörleri ve 5-HT (5-Hidroksitriptamin reseptör) arasında ilişki olduğunu işaret eden önemli veriler de mevcuttur (Uzday, 2002). Amigdala merkezli bu beyin devrelerin işlev bozukluğu sonucunda anksiyete ya da korku belirtileri oluşmaktadır (Mathew *et al.* 2008). İnsanın bedensel ve ruhsal varlığını tehlikede görmesi sonucu tehlike anında hissedilen duygu korku, hiçbir tehlike olmadan yaşanan huzursuzluk tedirginlik hali ise kaygı olarak adlandırılmaktadır (Şahin, 2019).

İnsan stresini incelemek genellikle sınırlı olduğundan, hayvan modelleri stres nörobilimi araştırmalarında güçlü bir araç haline gelmektedir (Demin *et al.* 2020). İnsanlarda olduğu gibi kaygı hayvan modellerinde de görülebilir. Hayvan modelleri yırtıcı hayvan kokusu veya diğer tehlikeli durumlar gibi tehdit edici durumlara doğal bir duygusal tepki gösterebilmektedir (Abreu *et al.* 2021). Hayvan modelleri, anksiyete farmakolojisini ve tedavisini anlamamız için kritik öneme sahiptir (Abreu *et al.* 2021). Kemirgenler şu anda merkezi sinir sistemi hastalık modellemesi için en yaygın kullanılan organizmalar olmasına rağmen, zebra balığı (*Danio rerio*), nörobilim ve merkezi sinir sistemi ilaç keşfi dâhil olmak üzere biyotıpta kemirgen olmayan popüler türlerden biri olarak ortaya çıkmıştır (Demin *et al.* 2020). Aynı zamanda zebra balıkları stres ve kaygı ile ilgili davranışları incelemek için yararlı

kılan çeşitli niteliklere de sahiptir. Nörotransmitter, diensefalon, telensefalon ve serebellum içeren sinir sistemi, motor ve duyuşal bileşenleri olan periferik, enterik ve otonom sinir sistemleri içermektedir. Zebra balığı (*Danio rerio*) bir hayvan modeli olarak davranışsal sinirbilim toksikoloji ve farmakoloji dahil olmak üzere çeşitli alanlarda da kullanımı artmaktadır (Rico *et al.* 2011; Maximino *et al.* 2010; Magno *et al.* 2015). Ayrıca zebra balığı genomu insanların genomu ile genetik homolog göstermektedir (Magno *et al.* 2015). Hem insanlarda hem de zebra balıklarında fizyolojik fonksiyonları düzenleyen kortizol, stres tepkilerinde rol oynayan önemli bir glukokortikoid hormondur. Kortizol hem genetik hem de işlevsel olarak iki tür arasında çok benzer olan glukokortikoid reseptörüne (GR) etki etmektedir. Zebra balığı hipotalamus-hipofiz-böbreklerarası (HPI) eksenini insan hipotalamus-hipofiz-adrenal (HPA) eksenini ile homologdur, kortizol her iki türde de birincil stres hormonudur (Demin *et al.* 2020). Son zamanlarda, zebra balığı alarm maddesi ve yırtıcılara maruz kalma gibi çeşitli stres faktörlerinin yanı sıra güçlü kortizol stres tepkileri, ilaç tedavisine duyarlılıkları nedeniyle de kaygı araştırmaları için umut verici yeni bir organizma olarak ortaya çıkmıştır (Abreu *et al.* 2021). Zebra balıklarında kaygı benzeri durumlarda donma, düzensiz hareketler, tigmotaksis (yeni bir ortamı keşfederken duvarlara yakın durma), geotaksi (tankın dibini tercih etme), hiperaktivite, kaygıda değişiklik, skototaksis (karanlık ortamları tercih etme), saldırganlık ve hafıza kazanımı gibi fenotipik ve davranışsal semptomlar görülmektedir. Zebra balığı ile kaygı analizinde genellikle yeni tank testi ve aydınlık-karanlık kutu testi kullanılarak bu semptomların analizi yapılabilmektedir (Kalueff *et al.* 2013). Zebra balıklarının alışılmamış bir ortamda dalış yaparak ve yeni ortama alıştıklarında dipte kalarak (jeotaksis) korunma, tankın üst kısmına ulaşma gecikmesi, tankın üst kısmında geçirilen süre, tankın üst kısmına geçiş (giriş) sayısı, düzensiz hareketlerin sayısı, donma nöbetleri davranışlarını temsil etmektedir. Artan düzensiz hareketler ve donma ile birlikte keşifte önemli bir azalma (yani, zirveye ulaşmak için daha uzun gecikme, zirveye daha az giriş, daha uzun ve daha sık dondurma) genellikle yüksek stres ve kaygıyı yansıtmaktadır (Stewart *et al.* 2012).

Bir yırtıcı hayvanın varlığı ise, hayvanlar için evrensel bir stres kaynağıdır (Abreu *et al.* 2021). Bu nedenle, stresin zebra balığı davranışı üzerindeki etkileri ve kaygı benzeri davranışları ölçülerek hayvanların yeni ortamları nasıl keşfettikleri ve bunlara nasıl alıştıkları değerlendirilebilir (Cachat *et al.* 2011; Kysil *et al.* 2017). Zebra balığı ayrıca yırtıcı balıkla görsel temastan sonra tüm vücut kortizol seviyelerinde artış ile birlikte artan stres tepkilerini doğrulamaktadır. Zebra balığı avcı balık ile karşılaşmasıyla birlikte zamanın çoğunu tankın dibinde geçirmiş ve bu davranış sonucu gösteriyor ki bir yırtıcı tarafından işgal edilme olasılığı en az olan alana taşınarak zebra balığının belirgin bir öğrenilmiş kaçınma davranışı sergilemektedir (J. M. Cachat *et al.* 2011). Bu durum korku ve kaygının birbiriyle etkileşimini

düşündürmektedir. Fakat kaygı ve korku tepkileri arasında dikkate değer nörobiyolojik farklılıklar vardır ve bu farklı durumlar zebra balıklarında da mevcut olabilir. Örneğin, korku, akut bir çevresel işaretin varlığına doğrudan bir tepkiyi temsil eder (örneğin, zebra balıklarının bir avcıyla görsel temas gibi rahatsız edici uyaranlara maruz kalması), oysa kaygı tehlikenin yokluğunda bile görülebilir (örneğin, zebra balığı, yeni tank testi gibi yeni bir ortama maruz kalması gibi). Korku benzeri uyaranlar (örneğin, alarm maddesine zebra balığı maruziyeti), yetişkin zebra balıklarında kaygı benzeri uyaranlara kıyasla HPI ekseninin daha az uyarılmasına ve sonuç olarak daha az kortizol salınımına neden oluyor gibi görünmektedir. Bu nedenle, zebra balığı modellerinde korku ve kaygının, kemirgenlerdeki ayrımlarına benzer şekilde farklılık gösterme olasılığı vardır (Abreu *et al.* 2021).

Kırmızı kaplan oscar balığı (*Astronotus ocellatus*) ise, zebra balığının allopatrik bir avcısıdır ve böylece odak deneklerde bir korku tepkisi ortaya çıkaracağı tahmin edilmiştir. Bu tahmin, literatür tarafından da doğrulanmıştır (Ladu *et al.* 2015). Zebra balığı oscar balığı tarafından stres altında olduğunda diğer yırtıcılardan daha büyük korkuyla tepki vermektedir ve bu, zebra balığı korku tepkisi üzerinde genetik yani doğuştan gelen bir etkinin önemini ortaya koymaktadır (J. M. Cachat *et al.* 2011).

Anksiyete bozukluklarının geleneksel tedavisi, farmakoterapi ve psikoterapiye dayanmaktadır. Anksiyete bozuklukları ile çalışan klinisyenler için endişeli hastaların dramatik ve acilen sıkıntılarından kurtulmayı talep eden doğası, kısa vadede bu sıkıntıyı yönetmek için yüksek düzeyde psikoterapötik uzmanlık gerektirir (Roy-Byrne, 2015). Antidepresanlar ve anksiyolitikler (anksiyete gidericiler) hem merkezi hem de periferik sinir sistemi işlevinde çok önemli bir rol oynayan nörotransmitterleri modüle ederek etki ederler (Hood *et al.* 2012). Kronik olarak uygulanan seçici serotonin geri alım inhibitörü(SSRI), antidepresanlar ve benzodiazepinler, buspiron gibi anksiyolitik ilaçlar, genel olarak nöronal uyarımı inhibe ederek ve inhibitör nörotransmisyonu teşvik ederek, stres ve klinik kaygıyı azaltmak için yaygın olarak kullanılmaktadır (Abreu *et al.* 2021). Ancak bu maddelerin kas gevşemesi, sedasyon, bulantı, baş ağrıları, nöbetler, uyku bozuklukları, cinsel işlev bozukluğu, amnezi, bilişsel yan etkiler, suistimal riski, bağımlılık ve intiharı içeren önemli yan etkilerle olan ilişkileri, tedaviyi bırakmaya teşebbüs edildiğinde geri çekilme etkileri ve kullanılan diğer ilaçlarla olası etkileşim boyutları endişe verici olabilmektedir (Roy-Byrne, 2015; Simon Yeung *et al.* 2018). Üstelik standart ilaç tedavileri ve psikoterapiler, yalnızca hastaların yarısını tedavi etmede başarılı olmakta ve yalnızca dörtte birinde tam semptomatik iyileşme sağlayabilmektedir (Roy-Byrne, 2015). Bu yüzden, anksiyete de dahil olmak üzere çeşitli rahatsızlıkları tedavi etmek için toksik olmayan doğal ilaçların kullanımında önemli bir artış görülmüştür (Hacke *et al.* 2020). Tıbbi

bitkilerle terapi, kaygı ile ilgili sistemlerin kontrolü dahil olmak üzere çeşitli psikiyatrik bozuklukların tedavisi için etkili bir alternatif olarak görülmektedir (Faustino *et al.* 2010). Bu ürünler, daha düşük yan etki veya geri çekilme riski ile farmakoterapiye daha güvenli alternatifler olarak algılanmaktadır (Sanches *et al.* 2018).

Tedavi sonuçlarını iyileştirmek için yeni psikolojik, antidepresan ve anksiyolitik müdahaleler geliştirmeye yönelik çabalar sürerken, öte yandan, kişinin zihinsel ve fiziksel refahını olumsuz yönde etkileyebilecek ilgili faktörleri hedef alan bireysel olarak uyarlanmış müdahaleleri düşünmek akıllıca yaklaşımlardır. Bu anlamda anksiyete bozukluklarının ortaya çıkmasını ve tekrarlamasını potansiyel olarak etkileyen psikolojik, biyolojik, sosyal, çevresel faktörler ve beslenme, yaşam tarzı gibi ekzojen, anksiyojenik faktörler üzerinden daha düşük maliyetli müdahalelerle nöroprotektif koruyucu önleme stratejiler geliştirilmeye çalışılmaktadır (Norwitz and Naidoo, 2021). Tamamlayıcı ve alternatif tıp yaklaşımlar pek çok tıbbi durumda olduğu gibi anksiyete bozukluklarında da temel tedaviler dışında kişiler tarafından giderek çok fazla kullanılan veya tedavilere eklenen terapiler haline gelmektedir. Beslenme müdahalelerinin klinik psikiyatristler arasında daha geniş çapta düşünülmesi gerektiği konusundaki giderek bir bakış açısı oluşmaktadır (Hacke *et al.* 2020). Nutrasötikler olarak adlandırılan standartlaştırılmış farmasötik besin maddelerinin birlikte uygulanmasının, başta antidepresanların etkilerin veya antidepresan ilacın belirli bir aktivitesinin sinerjik olarak arttırılması gibi stratejilerle etkili ve güvenli bir yaklaşım sağlayabileceği düşünülmektedir (Sanches *et al.* 2018). Nutrasötikler, beyinde veya nörodejeneratif bozukluklarda oksidatif stresi önlemek, inflamasyonu azaltmak, bağırsak mikrobiyal ekosistemini iyileştirmek için farmasötik ajanlar olarak da önem kazanmışlardır (Kao *et al.* 2021; Meo *et al.* 2019). Sarı kantaron (*Hypericum perforatum*), kava (*Piper methysticum*), zerdeçal (*Kurkumin*) ve passiflora (*Pasiflora incarnata*) gibi çeşitli bitkiler ve baharatlar anksiyete bozukluklarının tedavisinde beyin uyarılması ve inhibisyon arasındaki dengeyi modüle etmek için kullanılmaktadırlar (Abreu *et al.* 2021; Meo *et al.* 2019). Bu bitkiler gibi udi hindi (*Aquilaria agallocha*) tozu da, binlerce yıldır tüm dünyada çeşitli amaçlarla kullanılmaktadır. Modern farmakolojik çalışmalar, udi hindi tozunun sinir sistemi üzerinde aktif bir etkiye sahip olduğunu ve beyin sağlığı için muhtemel etkileri olabileceğini göstermiştir (S. Wang *et al.* 2017). *A. agallocha*, Covid-19 döneminde de Türkiye'de oldukça popüler hale gelmiştir (Hashim *et al.* 2016). Aktarlarda tıbbi amaçla satılan bitkilerden udi hindi tozu birçok isimle bilinmektedir; Endonezya ve Malezya'da 'gaharu', Japonya'da 'jin-koh', Hindistan'da 'agar' , Kore'de 'chim-hyung' Tayland'da 'kritisana noi', Malay dilinde, 'agarwood ağacı', latince ismiyle 'A.Agallocha' olarak adlandırılmaktadır (Agrawal *et al.* 2013). *A.agallocha* Thymelaeaceae familyasından olup, genellikle aloe ağacı veya agar ağacı olarak tanımlanan, Güneydoğu

Asya'nın yaprak dökmeyen bir bitkisidir. Geleneksel olarak, kabuk, kök ve öz odun tıbbi özellikleri nedeniyle yüzlerce yıldır halk ilacı olarak kullanılmaktadır (Hacke *et al.* 2020). Bilim adamları genellikle *A. agallocha* ve *A. malaccensis*'in aslında aynı tür olduğunu, morfolojik çalışmaların ardından Japonya'daki araştırmacılar *A. sinensis*, *A. agallocha* ve *A. malaccensis* arasında önemli anatomik farklılıkların olmadığı bildirilmektedir (Blumea, 1964).

A. agallocha; Çin, Güneydoğu Asya ve Orta Doğu'da yüzyıllardır sakinleştirici, analjezik ve sindirim maddesi olarak kullanılmaktadır ve ayrıca antioksidan, anti-diyabetik, antiinflamatuvar ve antibakteriyel aktiviteler gösterdiği, oksidatif stresi ve pro-inflamatuvar sitokin üretimini önemli ölçüde azalttığını ve inflamasyonla ilgili rahatsızlıkları tedavi etmek için geleneksel kullanımının doğrulanmasına katkıda bulunduğu bilinmektedir (Alam *et al.* 2017; Hacke *et al.* 2020). *A. agallocha* esansiyel yağının, CRF inhibisyonu ve HPA ekseninin bozulması ile ilgili anksiyolitik ve antidepresan etkiler uyguladığı da bildirilmektedir (Kao *et al.* 2021).

A. Agallocha'nın birçok sekonder metabolitinin, yatıştırıcı etkiler ortaya çıkardığı ve anti-kanser özellikleri sergilediği ve insanlar için tıbbi değere sahip olduğu bilinmektedir. Bu bitkinin terpenoid içeriği, çeşitli patojenlere direnmek için bir bağışıklık tepkisi olarak biyotik stres altında indüklenir ve bunun türevlerinin anti-mikroorganizma ve anti-tümör fonksiyonları sergilediği bilinmektedir (Chen *et al.* 2014). Udi hindi bıkısının etken maddesi olan cucurbitacin, mantar ve bakteriyel patojenlerle savaşmak için üretilmektedir (Chen *et al.* 2005). Cucurbitacinler daha önce de Çin şifalı bitkilerinde farmakolojik etkileri olduğu gösterilmiştir. Cucurbitacin B sitotoksik, anti-aterosklerotik, antikanser, hipoglisemik ve immünomodülatör özelliklere sahip olduğu özellikle, cucurbitacin I'in aktin dinamiklerini bozarak kanser hücresi motilitesini baskıladığı bilinmektedir (Momma *et al.* 2008). Yapılan çalışmalarda cucurbitacin ön tedavisinin apoptozu ve oksidatif stresini inhibe ettiğini, kanser hücrelerinde apoptozu indükleyerek güçlü anti-kanser aktivitesi sergilediği ayrıca hafıza fonksiyonlarını iyileştirdiği bildirilmektedir (Arel *et al.* 2014; Ju *et al.* 2022; Liu *et al.* 2022).

Anksiyolitikler laboratuvar hayvanlarında denendiğinde stresin indüklediği davranışları ve HPA eksenini aktivasyonunu etkili biçimde tersine çevirebildiği görülmektedir (Balcioglu, 2002). Özellikle kemirgenlerde, stresli uyaranlarla başa çıkmak için ortaya çıkan kaygının biyolojik temelini, anksiyolitiklerin ve anksiyolitik özelliklere sahip bazı antidepresanların etki mekanizmalarının incelenmesinde önemli bir rol oynamaktadır.

Bu çalışmadaki amacımız Covid19'un da etkisiyle artan stres ile oluşan anksiyetenin alternatif tedavi yöntemi olan udi hindi tozu bitki ekstraktı ile anksiyolitik etkisini

değerlendirmek ve zebra balığının allopatrik avcısı oscar balığı (*Astronotus ocellatus*) ile strese maruz bırakılıp davranışsal etkilerini incelemek, yeni nesile olan etkisini de araştırmaktır.



KURAMSAL TEMELLER

Laboratuvar çalışmaları ve tezin yazımında faydalandığımız kaynakların özetleri aşağıda gösterilmiştir.

Epidemiyolojik çalışmalar, anksiyete bozukluklarının oldukça yaygın olduğunu ve işlevsel bozukluğun önemli bir nedeni olduğunu bildirmektedir (Martin 2022). COVID-19 salgını artmasıyla birlikte yaygın anksiyete bozukluğu ve düşük uyku kalitesinin arttığını görülmektedir. Anksiyete semptomlarının 35 yaşından genç kişilerde ve salgına çok fazla odaklanan kişilerde ortaya çıkma olasılığı daha yüksek olduğu görülmektedir (Huang and Zhao, 2020). Ayrıca kadınlar ergenlikte başlayan duygusal bozuklukları geliştirmeye daha yatkın olduğu için anksiyete bozukluğu yaşama olasılıkları erkeklere göre 1,5 ila 2 kat daha fazladır (Thibaut, 2022). Anksiyete bozukluğu olan kişilerde uyku bozukluğu da yaygın bir şekilde görülmektedir. Aynı zamanda bu kişilerde kâbus gibi şikayetler, yaygın anksiyete bozukluğu ve travma sonrası stres bozukluğu da görülmektedir. Örneğin sıçanlarda akut stresin uyku üzerindeki etkileri, REM uykusundaki değişikliklerle kendini göstermektedir. Bu değişiklikler, CRH (kortikotropin salgılatıcı hormon) aracılı mekanizmaların NE (norepinefrin) nöronlarının aktivitesini artırmak için locus coeruleus da (beynin noradrenalin deposu olarak bilinen bölgesi) bir nörotransmitter olarak işlev görür, bu da REM uykusunda artışa yol açmaktadır. Çeşitli kronik stres modellerine maruz bırakılan farelerde uykuda bozulma, REM (hızlı göz hareketi) uykusunda artış ve SWS'de (yavaş dalga uykusu) azalma görülmüştür (Lader 2022).

Bazı epidemiyolojik araştırmalar, genel popülasyonda uyku bozukluklarının ortaya çıkışı ile anksiyete bozukluğu arasındaki ilişkiyi araştırmıştır. Uyku bozukluğu ile ilişkili çeşitli anksiyete bozukluğu tanıları için olasılık oranları %1,2-13,1 arasında değişmektedir. Uykusuzluk vakaların %18'i anksiyete bozukluğundan önce ortaya çıktığını, vakaların %38,6'sında anksiyete ve uykusuzluğun aynı anda ortaya çıktığını göstermektedir. Bu yazarlar, anksiyete bozukluğu da dahil olmak üzere psikiyatrik geçmişin, mevcut uykusuzluğun ciddiyeti ve kronikliği ile yakından ilişkili olduğu sonucuna varmışlardır (Breslau *et al.* 1996; Lader, 2022).

Birden fazla çalışma, bitkilerin uykusuzluk semptomlarını olumlu bir şekilde yönetmedeki etkinliğini bildirmektedir. Ek olarak, uyku bozukluklarının tedavisindeki etkinlikleri, farmakolojik birliktelikleri ile de geliştirilebilir. Yapılan çalışmada, *Valeriana officinalis*, *Ziziphus jujuba*, *Humulus lupulus* ekstraktları, melatonin ve bunların farmakolojik

birlikteliği uykusuzluk tedavisinde potansiyel uygulama açısından incelenmiştir. Sonuçlara göre; *V. officinalis* ve *H. lupulus* dâhil olmak üzere bir karışımın *Drosophila melanogaster*'da uyku davranışını tetiklemedeki etkinliğini göstermiştir, böylece etkinliğin artırılması için bitki özlerinin farmakolojik birlikteliğinin önemini daha da güçlendirmektedir. (Chiavaroli *et al.* 2022)

Bu bitki ekstraktları gibi benzer şekilde etkisi araştırılan ve Asya ülkelerinde yüzlerce yıldır sakinleştirici olarak kullanılan *A. Agallocha* farelerde uyku süresinin gecikmesini azalttığını ve doza bağlı bir şekilde uyku süresini uzattığını ortaya koyduğu bildirilmektedir. 60 mg/kg udi hindi tozu ile tedavi, tedavinin uzunluğuna (1, 7 veya 14 gün) bakılmaksızın uyku süresinin gecikmesini önemli ölçüde azalttığı bildirilmektedir (Wang *et al.* 2017). Udi hindi ekstresi farelerde intraperitoneal enjeksiyonla uygulanmasıyla lokomotor aktivite ve pentobarbital kaynaklı uyku üzerindeki işlevini değerlendirilen çalışmada sonuçlara bakıldığında, önceki raporlardaki sonuçlara benzer şekilde lokomotor aktiviteyi doza bağlı bir şekilde önemli ölçüde azaltabileceğini göstermektedir (Wang *et al.* 2016). Eşzamanlı olarak udi hindi, pentobarbital ile artan uyku oranı, artan uyku süresi ve azalan uyku süresi gecikmesi ile sinerjik bir etki göstermiştir bu da udi hindinin hipnotik benzeri etkisini ortaya çıkarmaktadır. Yapılan bu çalışmada udi hindinin etkisini 7 ve 14 gün çoklu doz uygulamalarıyla değerlendirilmiş. Udi hindinin sedatif-hipnotik işlevini, uzun süreli uygulamadan sonra doza bağlı bir şekilde etkisi olduğunu doğrulamaktadır. Tedaviden sonra lokomotor aktiviteyi belirgin bir şekilde artırmadan, uyku oranını düşürmeden veya uyku süresinin süresini önemli ölçüde azaltmadan sedatif-hipnotik etkiyi sürdürdüğünü de göstermektedir (Wang *et al.* 2017).

Kaygı bozukluklarının biyolojik temelleri hakkında daha fazla bilgi edinmek yeni ve daha etkili farmakolojik, davranışsal tedaviler geliştirmek için hayvan modelleri kullanımı oldukça önemlidir (Steimer, 2022). Aynı zamanda literatürde hayvan modelleri için çok sayıda kaygı paradigması tanımlanmıştır: örneğin, sosyal etkileşim testi, aydınlık-karanlık keşfi, kaygı/savunma testi, açık alan testi, yüksek artı labirent testi, şok sondası gömme, korkuyla güçlendirilmiş irkilme, korku koşullandırma testi vb. Bu paradigmlar genellikle kaygı benzeri davranış, koşulsuz (parlak ışık, açık alanlar, yüksek irtifalar veya avcı kokusu gibi rahatsız edici koşullara maruz kalma) veya koşullu (bir işaret veya nesnenin şoklarla eşleştirilmesi) tepkileri değerlendirmek için kullanılmaktadır (Luyten *et al.* 2011). Kaygı; karmaşık ve çok yönlü bir nöro-davranışsal bozukluktur ve onun tam olarak anlaşılması birden fazla alan ve tür arasında farklı koordineli yaklaşımlarla sağlanabilir. Zebra balığı modelleri, hayvan ve klinik kanıtlarla güçlü bir şekilde paralellik göstermektedir (Stewart *et al.* 2012).

Çalışmamızda zebra balığı modeli kullanılarak ani bir strese maruz kalınması sonucu oluşan kaygı benzeri davranış üzerinde udi hindi tozunun anksiyolitik etkisinin farklı iki dozda, kısa ve uzun sürede etkisi araştırılmaktadır. Zebra balıkları, insan genomuna benzerlik, sinirsel yollar, fizyolojik biyobelirteçler, normal ve patolojik beyin fonksiyonunun genetik temelleri hakkında önemli bilgiler sağladığı için nörodavranışsal araştırmalarda hızla popülerlik kazanmaktadır (Kalueff and Cachat, 2011). Ayrıca deneysel stresörlere ve farmakolojik ajanlara maruz kaldıktan sonra güçlü kaygı benzeri davranış sergilediği bildirilmektedir (Egan *et al.* 2009). Zebra balığı, çok çeşitli deneysel stres faktörlerine karşı hassastır. Örneğin, alarm maddelerine ve yırtıcı hayvana maruz kalmanın zebra balıklarında kaygı ve korku tepkilerini tetikleyebileceği görülmektedir (Spinello *et al.* 2019).

Zebra balıklarında kaygıyı modellemek için gıda yoksunluğu, bir tüpte kısıtlama, alarm feromonu, yırtıcı hayvana maruz kalma, sosyal etkileşim, karanlık kutuya maruz kalma, ağ izleme, havaya maruz kalma, parlak ışığa maruz kalma gibi çok çeşitli stres faktörlerine akut veya kronik maruz bırakıldığı bilinmektedir (Buenhombre *et al.* 2021). Yırtıcı stres, denekleri yapay durumlara ve stres etkeniyle ağırlı temas maruz bırakmayan doğal bir stres modeli olduğu düşünülmektedir (Figueiredo *et al.* 2003).

Çalışmalarda, zebra balığının sempatik bir avcısı olan Hint yaprak balıklarına (*Nandus nandus*) görsel olarak maruz kalma, dipte yaşama (geotaxis), sürü uyumu ve yırtıcı hayvandan kaçınma ile sonuçlandığı görülmektedir (Stewart *et al.* 2012). Aynı zamanda zebra balığı, allopatrik avcısı (*Astronotus ocellatus*) balıkla görsel temastan sonra vücut kortizol seviyelerinde artış olması ve davranışı üzerindeki anksiyojenik etkisi artan stres tepkilerini de doğrular nitelikte olduğu görülmektedir (Cachat *et al.* 2011). Bu nedenle çalışmamızda zebra balıkları allopatrik avcısı olan oscar balığı ile görsel temas sonucu strese maruz bırakılıp kaygı benzeri davranış sergilemişlerdir. Yapılan çalışmalarda zebra balığının oscar balığı ile görsel teması dairesel arenada, avcı (oscar balığı) ile av (zebra balığı) görsel temas etkileşiminin daha fazla olabileceği düşünülmektedir. Uyarıcı tankının nispeten küçük boyut olması, oscar balığının sürekli yüzmek yerine bir yere oturmayı ve yaklaştığında zebra balığına doğru hareket etmeyi tercih ettiği bildirilmektedir (Neri *et al.* 2017).

Spinello ve arkadaşları, zebra balığının avcı ile etkileşimi sonucu korku tepkisi ölçülürken jeotaksi (balık ile tankın tabanı arasındaki ortalama mesafe, tankın alt kısmında geçirilen süre ve tankın alt kısmına giriş sayısı) ve kaçınma davranışında ise (balık ile tankın tabanı arasındaki ortalama mesafe) dikkate alınarak analiz etmektedir. Genel olarak çalışmalarda balık davranışsal tepkisi, klasik kaygı ile ilgili parametrelerin (kaçınma, jeotaksi ve aktivite) entegrasyonu ile incelenmiştir (Spinello *et al.* 2019).

Anksiyete bozuklukları tedavisi ise psikolojik terapi, farmakoterapi veya her ikisinin kombinasyonu ile yapılmaktadır. Birinci basamak ilaçlar olarak seçici serotonin geri alım inhibitörleri (SSRI) ve serotonin-norepinefrin geri alım inhibitörleri kullanılmaktadır. Benzodiazepinler veya pregabalın gibi sedatif özelliklere sahip ilaçlar kombine edildiğinde yan etki olarak depresyon meydana gelebilir ve istenmeyen sedasyon, uyuşukluk veya artan reaksiyon süresi ile sonuçlanabilmektedir. Benzodiazepinler rutin kullanım ise genellikle önerilmemektedir. Mevcut kılavuzlar, potansiyel yan etkileri nedeniyle benzodiazepinleri birinci basamak tedaviler olarak önermemektedir (Bandelow, Michaelis, and Wedekind 2022). Parsaik ve diğerleri, 2016 meta-analizinde, benzodiazepin kullanıcıları arasında kullanmayanlara kıyasla daha yüksek bir ölüm oranı bildirmiştir. Ek olarak, uzun süreli benzodiazepin kullanımıyla (genellikle ≥ 6 ay) ilişkili olarak tolerans gelişimi ve bağımlılık riskinde artış da bildirilmiştir. Uzun süreli benzodiazepin kullananlarda hiç kullanmayanlara kıyasla birkaç yazar tarafından demans riskinin arttığı da bildirilmektedir (Parsaik *et al.* 2016).

Reçeteli ilaçların artan maliyeti ve istenmeyen yan etkilerin ortaya çıkmasıyla birlikte, hastalar psikolojik durumların yönetimi ve tedavisi için bitkisel diğer doğal ilaçları tercih etmektedir. Psikolojik bozukluklar, klinisyenler tarafından en sık görülen durumlardan biridir ve genellikle uzun süreli reçeteli ilaç rejimi gerektirmektedir. Sonuç olarak, çeşitli kaygı türlerinin tedavisinde doğal bir yöntem olarak tamamlayıcı ve alternatif ilaçların kullanımına ilgi artmaktadır. Çarkıfelek çiçeği, kava ve kediotu kökü gibi bitkiler ile amino asit, lizin ve magnezyum yüzyıllardır halk tıbbında ve geleneksel tıpta zihni sakinleştirmek ve ruh halini olumlu yönde iyileştirmek için kullanılmaktadır (Lakhan and Vieira, 2010).

Sceletium tortuosum, sağlıklı bireylerde anti-stres etkilerinin yanı sıra çok çeşitli psikolojik ve psikiyatrik bozuklukları hafifletmesi nedeniyle ilgi duyulan bir bitki olarak kabul edilmiştir ve diğer ekstraktlarla karşılaştırıldığında en yüksek anksiyolitik aktiviteyi göstermiştir. Farklı konsantrasyonlarda *Sceletium tortuosum* lokomotor aktivite ve aydınlık-karanlık geçişleri dikkate alındığında zebra balığı larvaları üzerinde anksiyolitik aktivite (tersthigmotaxis) göstermiştir. *Sceletium tortuosum*'un su ekstraktı, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında 40 dakikalık sürekli aydınlatma sırasında 12.5 ve 25 mg/L konsantrasyonlarında zebra balığı larvaları üzerinde önemli bir anksiyolitik etkiye sahip olduğu görülmektedir (Maphanga *et al.* 2020).

Maerua angolensis, Batı ve Orta Afrika'nın çeşitli bölgelerinde bulunan ve nörolojik bozukluklar için çok sayıda kullanıma sahip yerel bir bitkidir. *M. angolensis* özütü 0.1-0.3 ve 1 mg /mL dozlarında 3 aylık zebra balıklarına uygulandıktan sonra yeni tank testi ve aydınlık karanlık testi ile davranış analizi yapılmaktadır. Sonuçlara göre üst bölümde geçirilen süre ve

ışık bölmesinde geçirilen süre artmaktadır. *M. angolensis* ekstraktının lipofilik fraksiyonunun, GABA ve 5-HT 1-3 reseptörleri ile etkileşime bağlı olarak zebra balığındaki kaygı düzeylerini önemli ölçüde azalttığını görülmektedir (Benneh *et al.* 2017).

Kava kava (*Piper methysticum*), güçlü yatıştırıcı, analjezik ve anti-stres etkisi gösteren kavalaktonlar içeren tıbbi bir bitkidir. Kava özleri gibi, kavalaktonlar da insan merkezi sinir sistemini (CNS) güçlü bir şekilde modüle eder ve anksiyete, uykusuzluk ve ağrıyı hafifletmek için kullanılabilir. Yapılan bu çalışmada kronik stres, zebra balığında tüm beyin dopamin ve 5-HIAA seviyelerini azaltırken kavaya akut maruz kalma, zebra balığındaki dopamin, norepinefrin, serotonin ve 5-HIAA seviyelerini arttırdığı görülmektedir. Ayrıca kava, barbitüratlar ve alprazolam ile sinerjik etkiler gösterdiğinden ve bu tür ilaç kombinasyonları zebra balığında etkili bir şekilde test edilebilmektedir. Kava'nın genel olarak düşük bir bağımlılık yapıcı etkiye sahip olduğu da iyi bilinmektedir (Wang *et al.* 2020).

Zebra balığında uygulanan farklı bir bitki ekstraktına baktığımızda; arekoline akut maruz kalması, norepinefrin, serotonin ve DOPAC beyin seviyelerini arttırdığı ve 5-HIAA/serotonin ve HVA/dopamin oranlarını düşürdüğü görülmektedir. Yapılan bu çalışmada, arekolinin hem akut hem de kronik uygulamada güçlü bir anksiyolitik olarak potansiyel faydasını göstermekte ve monoaminerjik ve nöro-immün süreçleri içerebilen arekolin benzeri moleküllerin bütünleştirici CNS mekanizmalarına dayalı olarak en sonunda yeni anti-stres ilaçlarının geliştirilebileceğini öne sürmektedir. Genel olarak, akut ve kronik arekoline tedavisi, areca fıstığı suyu özlerinin neden olduğu sonuçlara benzer genel lokomotor aktiviteyi ve tüm vücut kortizol seviyelerini etkilemeden anksiyolitik benzeri davranış ürettiği görülmektedir. 5-7 aylık zebra balıklarına 3, 6 ve 12 mg/L dozlarında uygulanan Areca catechu yeni tank testin davranış analizinde üst kısımda yüzdüğü görülmektedir. 7 gün boyunca 1 mg/L arekolin ile kronik tedavide ise, akut arekolin tedavisinde olduğu gibi, yeni tank testi analizlerine benzer anksiyolitik benzeri davranışsal etkiler uyandırdığı bildirilmektedir (Serikuly *et al.* 2021).

Spondias mombin bitkisi Brezilya ve diğer Güney Amerika ülkelerinde yapraklar geleneksel tıpta antiinflamatuvar, antitümör, antidepresif ve anksiyolitik olarak kullanılmaktadır. Oral yolla ve daldırma yöntemiyle uygulanan ekstrakt, 6 aylık zebra balıklarında uygulanan skototaksis ve yeni tank testleri sonucunda beyaz bölmede geçirilen süreyi artırdığı, beyaz bölmeye girme gecikmesi, düzensiz hareket, donma, tigmotaksis davranışlarında azaltıcı etki verdiği görülmektedir. *S. mombin* hipnotik ve yatıştırıcı etkisi nedeniyle de anksiyolitik ve antidepresan etkiler ürettiğini ve bu etkinin oral yolla uygulandığında da iyileştirildiğini göstermektedir. Muhtemelen, *S. mombin* yapraklarında izoquercitrin varlığı, anksiyolitik ve antidepresan etkisi gösterdiği sonucuna varılmaktadır (dos Santos Sampaio *et al.* 2018).

Stresin neden olduğu anksiyete ve depresyon tedavisinde udi hindi yağının etkisine bakılan çalışmada farelerde anksiyete ve depresyonu tetiklemek için art arda 10 gün boyunca günde 3 saatlik bir kısıtlama ile ortaya çıkan kısıtlama stres modeli uygulanmaktadır. Sonuçlar, 10 günlük kısıtlama stresinin farelerde kaygı ve depresyon davranışlarının ortaya çıkmasına yol açtığını göstermektedir. Çalışmada hayvan davranış testi olarak yükseltilmiş artı labirent testi, aydınlık karanlık keşif testi ve açık alan testi kullanılmaktadır. Analiz sonuçlarına göre udi hindi yağının önemli bir anksiyolitik etkiye sahip olduğunu göstermektedir. Kuyruk süspansiyonu testi ve zorunlu yüzme testi, udi hindinin hareketsizlik süresi azaldığında antidepresan bir etkiye sahip olduğunu da göstermektedir. Bu çalışmada udi hindinin CRF'nin gen ekspresyonunu önemli ölçüde azalttığını ve serebral korteks ve hipokampusta CRFR'nin gen transkripsiyonunu ve protein ekspresyonunu önemli ölçüde inhibe ettiğini de bildirmektedir. Bu sonuçlar udi hindinin CRF'nin inhibisyonu ile ilişkili anksiyolitik ve antidepresan etkiler uyguladığını göstermektedir (S. Wang *et al.* 2018).

Japon bilim adamları, udi hindinin motor aktiviteyi azaltmada ve farelerde buhar inhalasyonu ile çeşitli dozlarda sakinleştirici olarak etkili olduğunu göstermektedir. Aynı zamanda udi hindi benzen özü, farelerde spontan hareketler üzerinde azaltıcı bir etkiye sahip olduğu pentobarbital sodyum kaynaklı uyku süresini önemli ölçüde uzatabildiği bildirilmektedir (Miyoshi *et al.* 2013).

Udi hindinin, az (1 fare için 0.4 g), orta (1 fare için 1.2 g) ve çok (1 fare için 3.6 g) doz gruplarındaki farelere oral ve nazal inhalasyon uygulamasının uyku gecikmesini önemli ölçüde kısalttığını ve uyku süresini uzattığını bildirmektedir. Bu çalışmada çeşitli davranış deneyleri ile udi hindi tütsü solumasının uyku ve ruh hali üzerindeki etkileri araştırılmaktadır. Sonuçlar, udi hindi tütsü solumasının (6 fare için 0,3 g ve 6 fare için 0,5 g) normal farelerin uykusunu önemli ölçüde artırdığını ve uykusuz farelerin yaşam kalitesini ve motor becerilerini önemli ölçüde iyileştirdiğini göstermektedir. Aynı zamanda, uykusuz farelere bir ile iki haftalık diazepam ve udi hindi uygulamasından sonra, diazepam verilen grupta diazepam uygulamasının hipnotik etkiyi azalttığı hatta tamamen ortadan kalktığı, udi hindi verilen grupta ise anlamlı bir ilaç direnci olmadığı gösterilmektedir (Chen *et al.* 2022; Wang *et al.* 2018).

MATERYAL VE METOT

Materyal

Balık materyali ve deney düzeneği

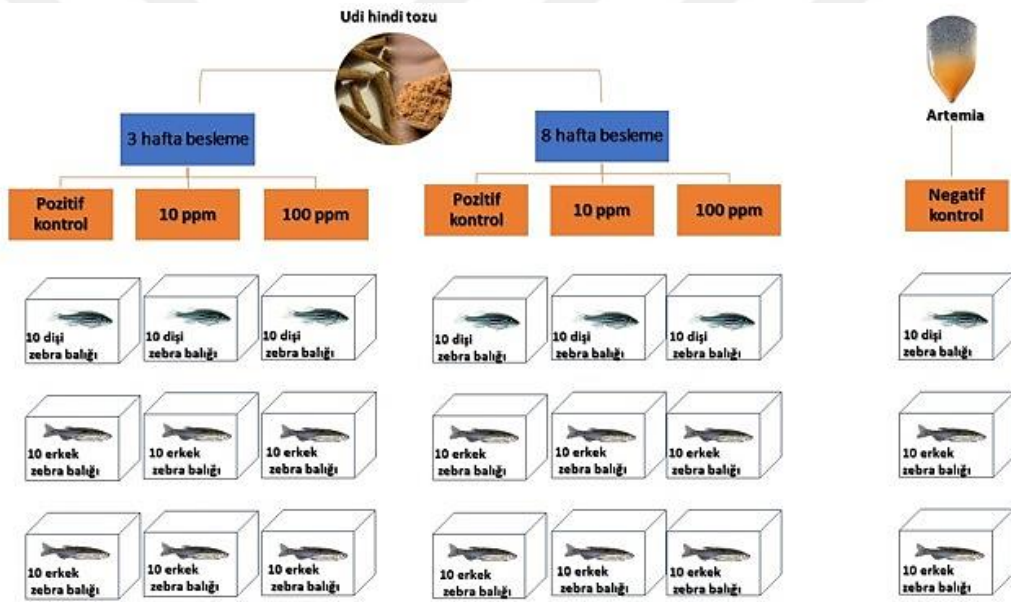
Denemede kullanılan zebra balıkları (*Danio rerio*) Oregon Eyalet Üniversitesi'nden temin edildi. Atatürk Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi Su Ürünleri Deneysel Araştırma Birimi'nde 14 saat aydınlık 10 saat karanlık foto-periyodunda zebra balıklarından yumurta alındı. Alınan yumurtalar petri kaplarında E3 (5mM NaCl, 0,17 mM KCl, 0,33 mM CaCl₂, 0,33 mM MgSO₄, %0.01 metilen mavisi) solüsyonuna aktararak inkübatörün içine konuldu. Etüvde (sıcaklığı 28.5°C olacak şekilde) zebra balıklarının suları her gün yenilenerek bekletildi (Blumea, 1964). 10 günlük zebra balıklarına yavru yemi (Gemma micro 75) verilmeye başlandı. Artemia salina almaya başlayan zebra balığı yavruları sonrasında kapalı devre sistemine alındı. Artemia salina, zebra balıkları beslenmesinde protein değeri yüksek canlı yemdir. Zebra balıkları yaklaşık 4,5 aylık olana kadar kapalı devre sisteminde günde iki kez artemia bir kez pulyem ile beslenilerek büyütüldü.

Deneyin gerçekleştirildiği ana tank içine 20×12×15 cm (genişlik, uzunluk, yükseklik) akvaryumlar yerleştirilerek deney düzeneği hazırlandı. Ana tanka, akvaryum hacminin yaklaşık 2/3'ü kadar su dolduruldu ve su sıcaklığı 28.5°C' ye ayarlandı.



Şekil 1. Tank düzeneği

Her grup için toplam 30 balık (10 dişi 20 erkek) ve her tankta 10 balık olacak şekilde balıklar tanka konuldu. Zebra balıkları 14 gün boyunca deneyin yapılacağı ortama alışmaları için aklımasyon sürecine bırakıldı. Alışma aşamasından sonra, zebra balıkları 6 gruba ayırdı: pozitif kontrol, negatif kontrol ve 10 ppm ve 100 ppm udi hindi tozu içeren diyetlerle 3 ve 8 hafta boyunca beslendi. Negatif kontrol grubu günde iki kez artemia 1 kez pulyem ile beslendi. Diğer gruplar ise formüle edilmiş, konsantrasyonları 0 ppm, 10 ppm ve 100 ppm udi hindi tozu (*A. agallocha*) diyetleri ile günde 3 kez toplam 200 mg olacak şekilde beslendi. Yapılan bu çalışmada diyetin dozları belirlenirken; udi hindi bitkisi ile zebra balıklarında yapılan bir çalışma olmadığı için bu bitkinin anksiyolitik etkisini araştıran başka çalışmalara bakılarak dozlar belirlenmiştir (Wang *et al.* 2017; Alla *et al.* 2007). Udi hindi bitkisi ile yapılan çalışmalarda udi hindi bitkisinin 2000 mg/kg doza kadar toksik olmadığını ve güvenli olduğu bildirilmektedir (Alla *et al.* 2007).



Şekil 2. Tez çalışması grup organizasyonu

Yem formülasyonunun hazırlanması

Udi hindi bitkisi gövde kısmı Erzurum ilinde yerel bir aktardan satın alındı ve Atatürk Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Botanik Anabilim Dalı'nda tanımlanmıştır. Sulu ekstraksiyon hazırlarken 100 gram udi hindi bitkisi gövde kısmı toz haline getirilerek üzerine 500 ml kaynatılmış saf su ilave edildi. 80-90 °C geri soğutucu sisteminde reflüx altında bir gün boyunca karıştırıldı. Reaksiyon bozulduktan sonra karışım önce tülbent bezinden daha sonra da süzgeç kâğıdından süzüldü. Süzüntüler dondurulup liyofilize edildi. Sonrasında ekstre edilen materyal ile yem hazırlandı. (Nadaroğlu, Demir, and Demir 2007).

Zebra balıklarının beslenmesinde kullanılacak olan yemler besin ihtiyaçları göz önüne alınarak formüle edildi. Yemlere tablo 1 çizelgede belirtilen oranlarda udi hindi ekstraktı eklendi.

Tablo 1. Çalışmada Kullanılan Yem Formülasyonu

İÇİNDEKİLER	Pozitif kontrol	10 mg/kg	100mg/kg
Balık unu	50.000	50.000	50.000
Tavuk unu	62.500	62.500	62.500
Soya fasulyesi proteini konsantresi	25.000	25.000	25.000
Mısır gluteni	50.000	50.000	50.000
Kan unu	15.000	15.000	15.000
Buğday unu	19.7500	19.74750	19.7250
CMC	0.250	0.250	0.250
Vitamin karışımı	0.750	0.750	0.750
Mineral karışımı	0.250	0.250	0.250
Balık yağı	12.500	12.500	12.500
Ayçiçek yağı	7.500	7.500	7.500
Lesitin	5.000	5.000	5.000
Kolin klorür	0.750	0.750	0.750
Metiyonin	0.375	0.375	0.375
Lizin	0.375	0.375	0.375
<i>Aquilaria agallocha</i>	0.000	0.0025	0.0250
TOTAL(g)	250.000	250.000	250.000

Yem ham maddeleri hassas terazi ile tartılarak gruplara göre ayrı ayrı kutulara alındı. Vitamin ve mineral katkı maddeleri premix yapılarak yem konteynerlerine eklendi. Mikser yardımıyla homojen bir şekilde karıştırıldı. Yem formülasyonunda belirlenen yağlar tartılarak kuru ham maddelere homojen olarak dağıtıldı. Yemlere ilave edilecek udi hindi ekstraktları kuru halde tartılarak saf su içerisinde çözündürüldü. Sulu çözeltide yeme eklenerek peletlenebilir kıvama getirildi. Yem kıyma makinesinden geçirilerek peletlenmiş ve liyofilizatörde -80°C’de 24 saat süreyle kurutuldu. Kuruyan yemler zebra balığı ağız açıklığına göre fraksiyonlanmış ve tüketim süresince – 20°C de muhafaza edildi.



Şekil 3. Yem hazırlama aşamaları a) Pozitif kontrol yem bileşenlerinin görünümü b) 10 ppm udi hindi ekstresi (sulandırılmış) ve yem bileşenleri görünümü c) 100 ppm udi hindi ekstresi (sulandırılmış) ve yem bileşenleri görünümü d) Yem bileşenlerinin karıştırılması e) Liyoflizatörde kurutma işlemi

Zebra balığının allopatrik avcısı oscar balığı (*astronotus ocellatus*) ile strese maruz kalması

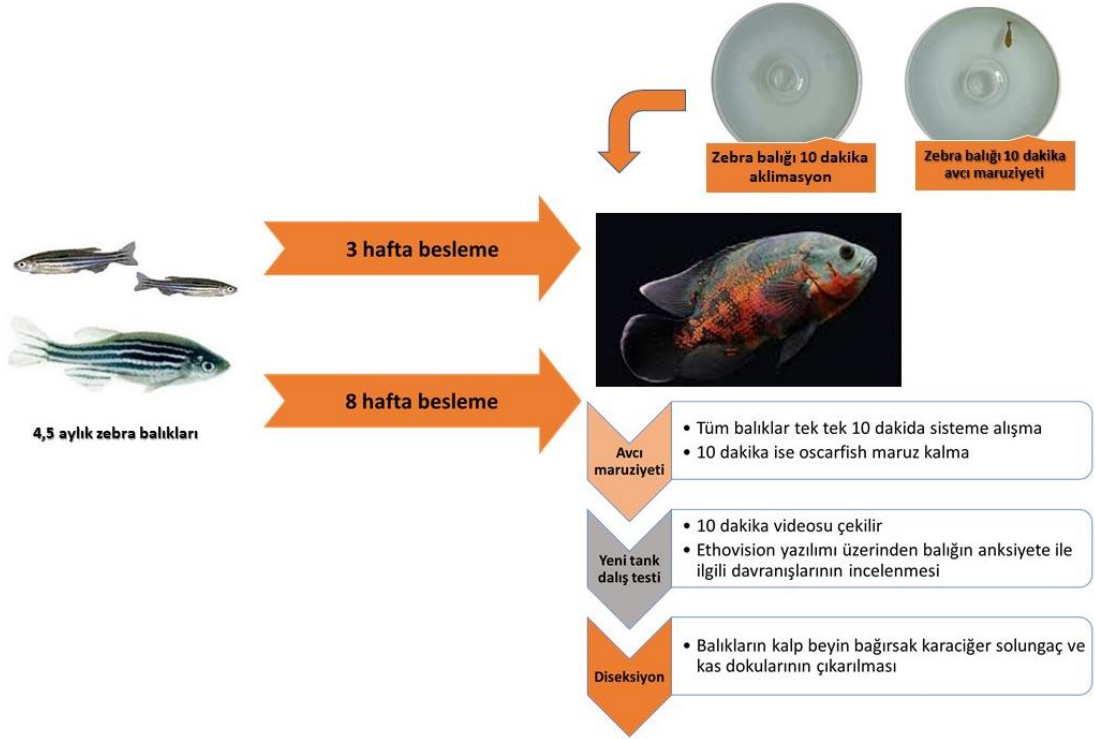
Yırtıcı hayvanlara maruz bırakma, 52,5 cm çapında ve 18 cm yüksekliğinde dairesel beyaz akrilik bir tankta gerçekleştirildi. Tankın ortasına zebra balığının konulacağı 18 cm yüksekliğinde, 18 cm çapında ve 2 mm kalınlığında cam silindir yerleştirilmiştir. Bu sayede balıkların maruz kalma sırasında birbirleriyle sadece görsel temas kurabilecekleri bir arena oluşturulmuştur.



Şekil 4. Denemede kullanılan oscar balığı (*Astronotus ocellatus*)

Yırtıcı hayvanlara maruz bırakılmadan önce, oscar balıkları iki hafta boyunca bir günlük aralıklarla günde 20 dakika test ortamına adapte edildi. 3 ve 8 haftalık yemlemelerin hemen

ardından oscar balıkları test ortamına alınmış ve 10 dakika sonra zebra balığı ortama salınmış ve 10 dakika görsel temas sağlanmıştır. 10 dakika sonra zebra balığı hemen yeni dalış tankı analizine tabi tutuldu (Spinello *et al.* 2019). Negatif kontrol grubu dışındaki tüm gruplar süre sonunda avcı stresine maruz kalmıştır. Zebra balığının oscar balığı ile stres maruziyetinin hemen sonrasında anksiyete analizi için 10 dakikalık video çekimi yapıldı ve sonrasında balıklarda diseksiyon yapılarak dokular muhafaza edildi



Şekil 5. Zebra balığı avcı predator oscar balığına maruziyet deney düzeneği

Yetişkin balık davranış testi

Yeni dalma tank testi

Her doz için ayrı ayrı altı erkek ve üç dişi balık olmak üzere toplam dokuz balık strese maruz kaldıktan sonra 10 dakika boyunca dalma tankında videosu çekildi. 10 dakika çekilen videoların ilk üç ve son bir dakikası kesilerek 6 dakika boyunca balığın davranışları izlendi. EthoVision yazılımı üzerinden tankın alt ve üst kısımları zon olarak belirlenildi ve balığın alt ve üst kısımda kaldığı süre, düzensiz hareketleri (balığın yüzme esnasında yönünün ve hızının keskin ve ani bir şekilde tekrar tekrar değişmesi), alt üst kısımlar arası geçişlerinin sayısı, donma sıklığı (solungaç ve gözler hariç balığın hareketlerinin bir saniye veya daha fazla süreyle tamamiyle durması), balıkların geotaksisini (tankın dibini tercih etme) gibi yüzme davranışları analiz edildi (Egan *et al.* 2009; Sulukan *et al.* 2021; Türkoğlu *et al.* 2022). Bahsi geçen hareketlerden alt kısımda fazla zaman geçirilmesi, en üst kısma ulaşması için gecikmesi veya fazlaca gösterilen düzensiz hareketler ve donmalar gibi davranışlar yazılım üzerinden

değerlendirilerek balıkların anksiyete düzeyleri hakkında yorumlar yapıldı (J. Cachat *et al.* 2011; Nguyen *et al.* 2014; Stewart *et al.* 2012).

Sirkadiyen ritim ölçülmesi

Sirkadiyen analizde deney düzeneğinde kullanılan akvaryumlar kullanıldı. Sirkadiyen test pozitif kontrol, negatif kontrol, 10 ve 100 ppm için her akvaryumda 3 balık olmak üzere 2 tekerrür şeklinde yapıldı. Sirkadiyen analizi için karartma perdesi ile ayrılan test ortamına yerleştirilen beyaz ışık ve kızılötesi LED'ler kullanılarak özel olarak bir bölüm tasarlandı ve LabVIEW (Laboratory Virtual Instrumentation Engineering Work-bench, National Instruments Corp., Austin, TX, ABD) ile yazılmış bir yazılım ile kontrol edildi. Zebra balıkların aktiviteleri 14 saat aydınlık ve 10 saat karanlık olmak üzere toplam 24 saat boyunca kaydedildi. Alınan video verilerini yazmak ve okumak için IdTracker yazılımı kullanıldı. 24 saat kaydedilen verilerden her saatten birer dakikalık kesitler alındı (Audira *et al.* 2019). Daha sonra, kat edilen toplam mesafe (cm), ortalama hız (cm/s), balığın açısız yer değiştirmesinin zaman aralığına oranı olarak hesaplanan ortalama açısız hız (0/s) ve kıvrılma (0/m) parametreleri değerlendirildi.

Yetişkin balıkların organlarının çıkarılması (diseksiyon işlemi)

Zebra balıklarının tek tek strese maruz kalmasının hemen sonrasında her gruptan dokuz balık anksiyete analizi için video çekimi, altı balık sirkadiyen ritmi ölçümü için sisteme balıkların bırakılması ve beş erkek dört dişi olmak üzere dokuz balığın üremeye bırakılması olayları gerçekleşmiştir. Bu olayların bitmesi sonunda diseksiyon işlemi gerçekleşmiştir. Deneyde kullanılan balıklara anestezi uygulandı ve beyin, karaciğer, kalp, kas, solungaç ve bağırsak dokuları diseksiyon işlemi ile alındı. Histopatoloji için alınan dokular paraformaldehid solüsyonuna konulup +4 derecede muhafaza edildi.

Yetişkin zebra balığı beyin dokularının histopatolojisi

Histopatolojik inceleme

Değerlendirme sonunda alınan beyin dokusu örnekleri %10' luk tamponlu formaldehit solüsyonunda 48 saat tespit edilip, rutin doku takip işlemleri sonunda parafin bloklara gömüldü ve 4 mm kalınlığında alınan kesitler hematoksilin-eozin (HE) ile boyanıp ışık mikroskobu ile incelendi (Olympus BX 51, JAPONYA). Kesitler histopatolojik bulgularına göre yok (-), çok hafif (+), hafif (++), orta (+++), şiddetli (++++), ve çok şiddetli (+++++) olarak değerlendirildi.

Double immunofloresan inceleme

İmmunofloresan inceleme için adhezivli (poly-L-Lysin) lamlara alınan doku kesitleri, deparafinize ve dehidre edildi. Ardından %3'lük H₂O₂ de 10 dk tutularak endojen peroksidaz inaktive edildi. Daha sonra dokular %1' lik antijen retrieval (sitrata buffer (pH⁺6.1) 100X) solüsyonunda kaynatıldı. Dokularda nonspesifik zemin boyanmasını önlemek için kesitler protein blok ile 5 dk inkübasyona bırakıldı. Ardından dokulara primer antikorlar (BDNF Kat No:NB100-98682SS, Sulandırma Oranı: 1/100, UK) damlatılıp kullanım talimatlarına uygun inkübe edildi. Sekonder işaretleyici olarak immunfloresans sekonder antikor kullanılıp (FITC Cat No: ab6785 Dilüent Oranı: 1/1000) karanlık ortamda 45 dk bekletildi. Ardından dokulara ikinci primer antikorlar (5HT4 Kat No:ab60359, Sulandırma Oranı: 1/100) damlatılıp kullanım talimatlarına uygun inkübe edildi. Sekonder işaretleyici olarak immunfloresans sekonder antikor kullanılıp (Texas Red Cat No: ab6719 Dilüent Oranı: 1/1000 UK) karanlık ortamda 45 dk bekletildi. Daha sonra kesitlere mounting medium' lu DAPI (Kat no: D1306 Sulandırma Oranı: 1/200 UK) damlatılıp 5 dk karanlık ortamda bekletildikten sonra kesitler lamel ile kapatıldı. Boyanan kesitler floresans ataçmanlı mikroskopta (Zeiss AXIO ALMANYA) incelendi ve veriler ZEISS Zen Imaging Software programında değerlendirildi.

Larva Zebra Balıklarının Analizi

Besleme sonrası balıkların üremeye bırakılması

3 hafta ve 8 hafta şeklinde udi hindi tozu ile beslenen balıklar ile negatif kontrol ve pozitif kontrol balıklarından yumurta alındı. Zebra balıkları için özel yumurtlama tanklarına 5 erkek 4 dişi olacak şekilde konuldu. Balıklar bu yumurtlama tanklarına konuldukları zaman aralarına engel konulmuştur ve bir gece bekletilen balıklar sabah ışıkların açılması ile engel kaldırıldı. Araya engel konulan yumurtlama tanklarında bir gece bekletilen balıklar sabah ışıkların açılması ile engel kaldırıldı. Saat 11.00 gibi yumurtalar alındı. Alınan yumurtalar petri ortamında E3solusyonuna konuldu ve suları beş gün boyunca yenilendi. Yavruların yumurtadan çıkışları anomali durumları ölüm sağ kalımları her gün tek tek not edildi. İki gün yumurta almak için üremeye konuldu. İki farklı besleme şeklinde de ikinci gün yumurta alımı olmadı.

Yavru larvaların reaktif oksijen türevlerini CM-H2DCFDA indikatörü ile boyayarak oksidatif stresin belirlenmesi

Yetişkin balıklardan alınan yavruların 96. saatinde CM-H2DCFDA (5-krometil-2', 7'-diklorodihidrofloresandiasetatsetil ester) indikatörü kullanılarak reaktif oksijen türevleri belirlendi. Her gruptan 10 tane larva alındı ve alınan balıklar 24'lük hücre kültürü kuyucuklu plaklarına beşerli olacak şekilde konuldu. Önce larvalar 3 kez saf su ile yıkandı. Son yıkamada

tüm su uzaklaştırıldı ve 1 µg/ml indikatör eklendi. Etüvde (28,5 °C) de 2 saat, karanlık ortamda inkübe edildi. 2 saat sonra larvalar tekrardan 3 kez saf sudan geçirildi. %3' lük metil selüloz ile lama konulan larvalardan flüoresan mikroskobu (Zeiss, Discovery V12, Germany) ile görüntü alındı (Baran *et al.* 2020).

Apoptotik hücrelerin tayin edilmesi

Çalışmada tüm gruplardan 96. saatte 10 tane larva kullanıldı ve 24'lük hücre kültürü plaklarına 5 larva olacak şekilde konuldu. PBS ile 3-5 kez yıkandı. Larvalardan son yıkamada tüm PBS uzaklaştırıldı ve 30 dk etüvde (28,5° C) karanlık ortamda inkübe edildi. Sonrasında tekrar PBS ile yıkandı, %3' lük metil selüloz ile lama konulan larvalardan flüoresan mikroskobu (Zeiss, Discovery V12, Germany) ile görüntü alındı (Sulukan *et al.* 2023).

Vücüttaki lipid düzeyinin görüntülenmesi

(Nile-Red (C20-H18-N2-O2) Boyama) Nil kırmızısı C20-H18-N2-O2 (9-dietilamino-5H-benzo (a) fenoksazin-5-o) organik bir heterotetrasiklik bileşiktir. Nil kırmızısı, genellikle kırmızı floresan proteini ile paylaşılan uyarma ve emisyon dalga boylarına sahip floresans mikroskop kullanılarak kolayca görüntülenebilen bir membran boya olarak kullanılabilir. Hücre içi lipid damlacıklarını boyar. Tüm gruplardan 96. saatinde 10 ar larva alındı ve 10 ng/ml C20-H18-N2-O2 ile bir gece karanlık ortamda inkübe edildi. Boyama işleminden sonra %3' lük metil selüloz ile lama konulan larvalardan flüoresan mikroskobu (Zeiss, Discovery V12, Germany) ile görüntü alındı (Jones *et al.* 2008).

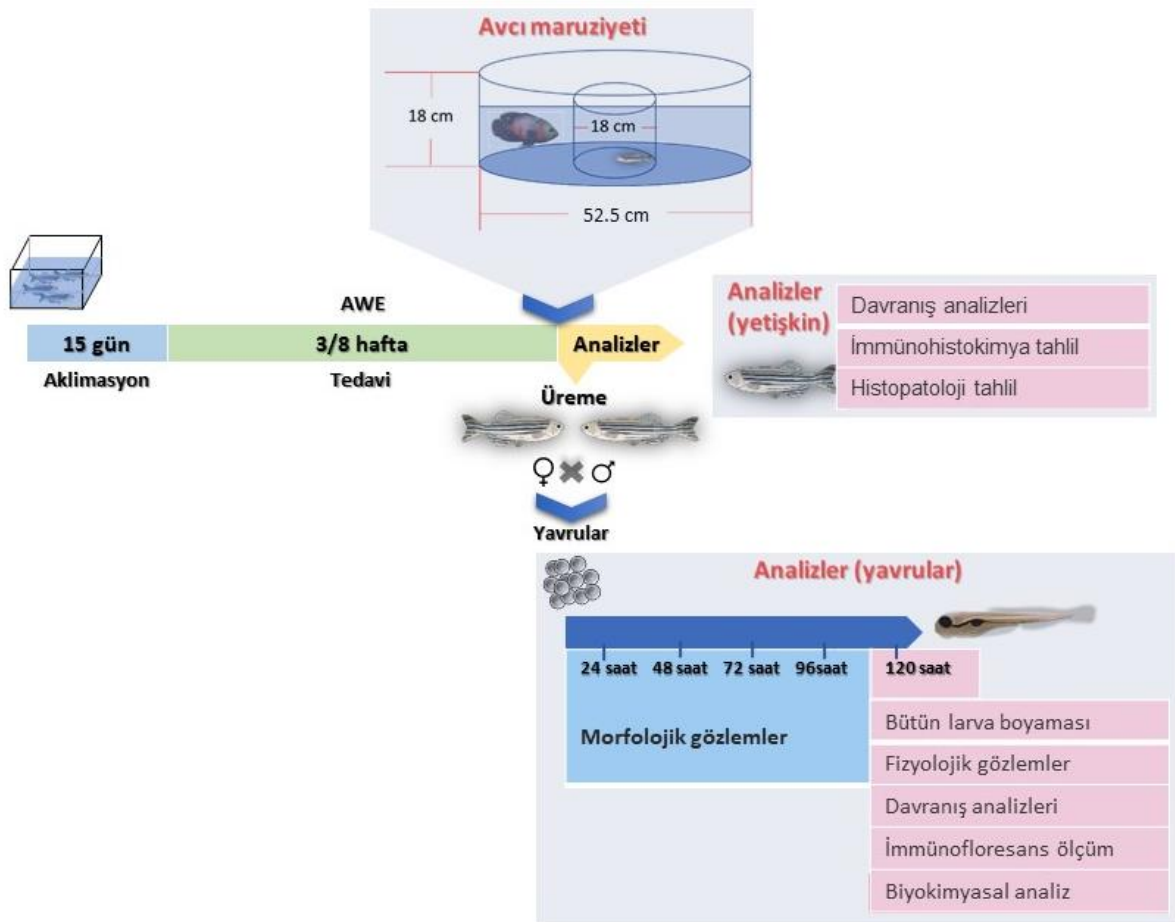
Alınan tüm görüntüler image j kullanılarak analiz edildi.

Morfolojik ve fizyolojik ölçümler (vücut uzunluğu, göz boyutu, kan akışı ve kalp hızı)

Farklı diyetler ile beslenen grupların larvalarında herhangi bir fizyolojik farklılık oluşup oluşmadığını anlamak için tüm gruplardan alınan balıkların; göz çapı, boy uzunluğu, perikardiyak alanı ölçümü Daniovision cihazı Danioscope yazılımı ile yapıldı. Tüm gruplardan en az 15 larva aynı saatte ve aynı büyüklükte olması dikkat edilerek ışık mikroskobunda fotoğraflandı ve analiz edildi. Danioscope yazılımı, zebra balıklarının embriyosunu ve larvasının; aktivitesini, kardiovasküler ölçümlerini, morfolojik parametrelerinin incelenmesini sağlayan bir yazılımdır. Göz çapı, boy uzunluğu, perikardiyal ödem 48., 72. ve 96 saatler için değerlendirildi. Kalp atışı ve kan akışı video çekimi ise 120. saatte yapıldı. Kan akışı ve kardiyak aktivitesi için her gruptan en az 15 larva da aynı pixelde aynı büyütme oranı ile ışık mikroskobu altında kalp atışı için 1 dakika kan akışı için 2 dakika videoları çekildi. Videolar Daniovision cihazı Danioscope yazılımı ile analiz edildi.

Larva lokomotor aktivitesi ve tigmotaksis

Karanlık-aydınlık lokomotor aktivitesi için, pozitif kontrol, negatif kontrol ve udi hindi tozuyla 3 hafta beslenen tedavi gruplarından rastgele seçilen her biri 6 günlük 16 larva (4 tekrür), her bir oyuğa bir larva gelecek şekilde 1 ml damıtılmış su ile 48 gözlü bir plakaya konuldu. Locomotor aktivitelerini kızılötesi analog kamera (25 kare/saniye) ile izlemek için, DanioVision gözlem odasına (Noldus) yerleştirildi. Gözlem odasının sıcaklık koşulu, bir ısıtma/soğutma sistemi (Noldus Co.) kullanılarak 28 °C'de gerçekleştirildi. Sistem 30 dakika bulundukları ortama alıştırdıktan sonra 50 dakika boyunca 10 dakikalık aralıklarla karanlık ve aydınlık periyotlara ayarlandı. Analiz süresi boyunca larvaların lokomotor aktiviteleri EthoVision yazılımı (Noldus) aracılığıyla değerlendirildi (Sulukun *et al.* 2021). Tüm larva hareketleri kaydedildikten sonra karanlık ve/veya aydınlık periyoda ait veriler dikkate alınarak kat ettiği toplam mesafe analiz edildi. Larva zebra balıklarında kaygı indeksinin bir göstergesi olan tigmotaksis ise, Schnörr tarafından açıklanan yöntemle göre belirlenmiştir (Schnörr *et al.* 2012). Tigmotaksis, dış bölgede kat edilen toplam mesafenin tüm test alanına oranı alınarak ölçülmüştür. Zebra balığı larvalarının davranışlarının izlenmesi sonucunda elde edilen veriler EthoVision yazılımı (Noldus) ile analiz edilmiştir (Baran *et al.* 2020).



Şekil 6. Çalışma özetinin kurgusu

İstatistik Analiz

Çalışmamızda tüm ölçümler, her bir zebra balığı ve numune için üç kopya halinde yapıldı. Sonuçların istatistiksel analizi, Prism yazılımı (GraphPad Software, San Diego, CA) kullanılarak tek yönlü ANOVA ve Tukey'nin post-hoc testi ile yapıldı. İstatistiksel olarak anlamlı farklılıklar ns $p > 0.05$ (anlamlı değil); * $p < 0.05$ (anlamlı); ** $p < 0.01$ (çok anlamlı); *** veya **** $p < 0.001$ veya 0001 (son derece önemli) şeklinde sunulmuştur.

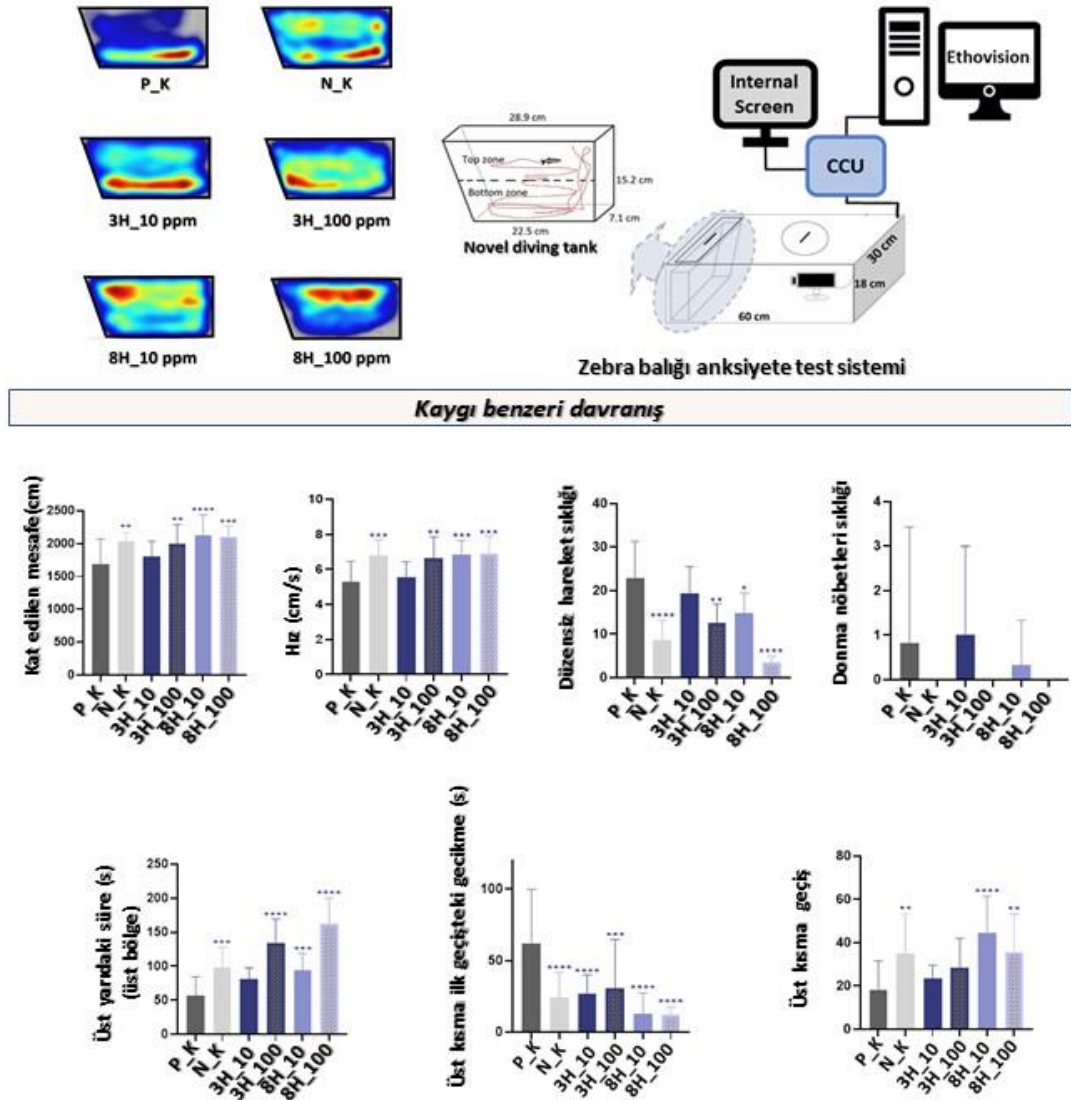


ARAŞTIRMA BULGULARI

Yetişkin Zebra Balığı Davranış Analizleri

Udi hindi tozunun yetişkin zebra balığında anksiyolitik etkisi

Bu çalışmada, zebra balığının allopatrik avcısı olan oscar balığının neden olduğu kaygı üzerinde udi hindi tozunun anksiyolitik etkisi incelenmiştir. Anksiyete analizi için daha önce açıklandığı gibi Ethovision yazılımı tarafından video kayıtlarının analiz edilmesiyle elde edilen yedi parametre kullanılarak kaygı düzeyini değerlendirmek için yeni tank testi kullanıldı. Bu test modeli ile balığın daha fazla zaman geçirdiği tankın kısmı (üst yarı veya alt yarı), bölgeler arası geçiş, düzensiz hareket ve donma nöbetleri gibi davranışlar incelenerek analiz edilir.



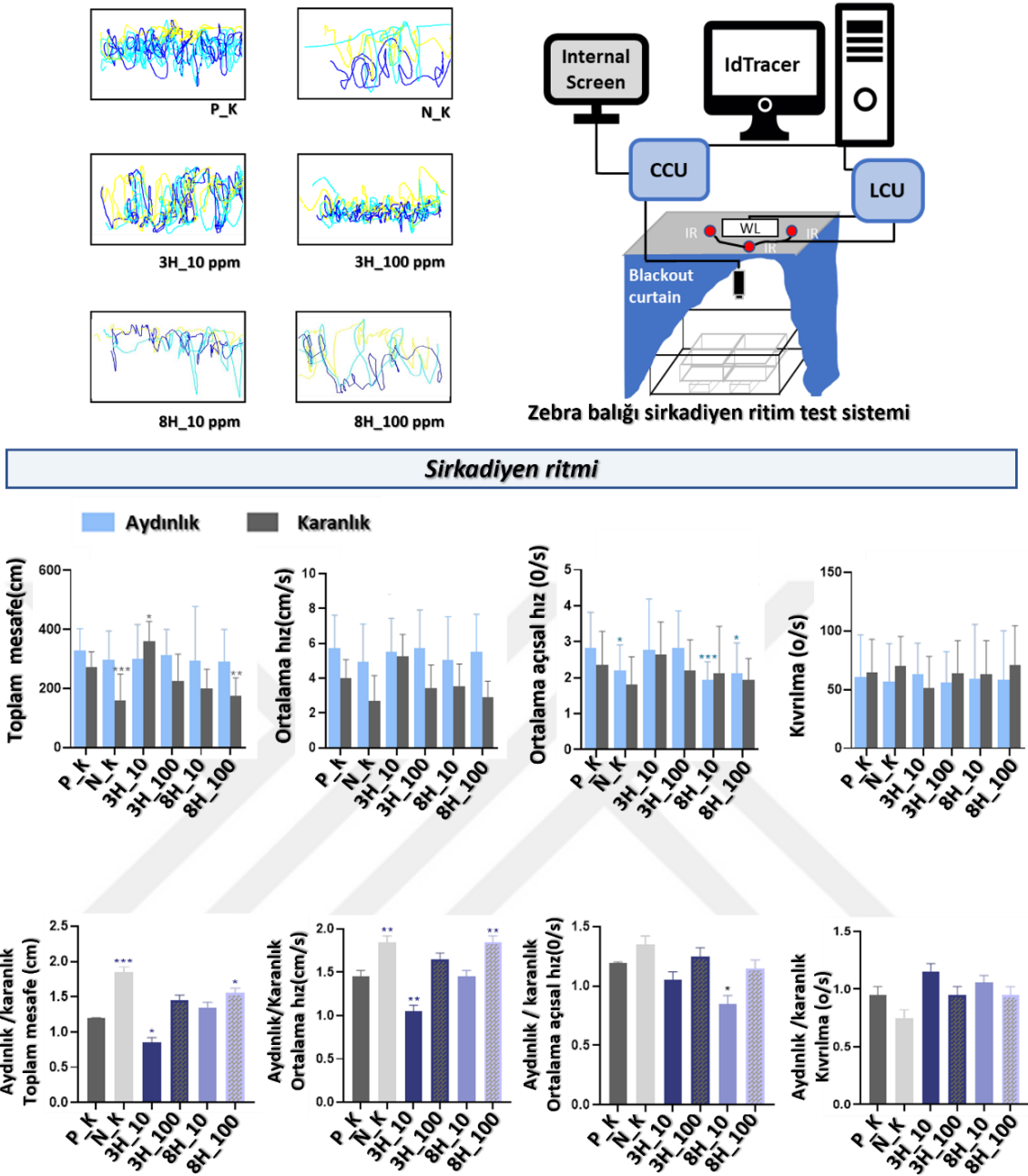
Şekil 7. Yeni tank dalış testi analiz grafikleri, ısı grafiği ve zebra balığı anksiyete test sistemi (P_K: Pozitif kontrol, N_K: Negatif kontrol, 3H_10 ve 100 ppm: 3 hafta udi hindi tozuyla beslenen grup, 8H_10 ve 100 ppm: 8 hafta udi hindi tozuyla beslenen grup)

Elde edilen sonuçlara göre oscar balığının zebra balığı ile görsel temas sonrası anksiyojenik etkisi net bir şekilde görülmektedir. Sonuçlar, akut stresin düzensiz hareketi, donma nöbetlerini ve üst bölgeye geçişte gecikmeyi arttırdığını gösterdi. Pozitif kontrolde ve 3 hafta boyunca udi hindi ile beslenen 10 ppm grubunda düzensiz hareket ve donma nöbeti yüksekti. Düzensiz hareket pozitif kontrol ile karşılaştırıldığında, 8 hafta boyunca beslenen 100 ppm grubunda önemli bir fark vardı. Donma nöbetleri yalnızca pozitif kontrol ve 10 ppm grubunda gözlemlendi. Düzensiz hareket ve donma nöbetinde 10 ppm doz ile pozitif kontrol arasında anlamlı bir fark yoktu.

Zebra balığı için bir diğer önemli kaygı parametresi, üst yarıya gecikme ve üst bölgede geçirilen süredir. Üst bölgeye geçişte gecikme pozitif kontrolde en yüksek iken 8 hafta udi hindi tozu ile beslenen grup arasında anlamlı fark vardı. Tankın üst bölgesinde geçirilen süre incelendiğinde, her iki periyotla beslemenin 100 ppm grubu için pozitif kontrole göre düzenli bir artış gösterdiği görülmektedir (Şekil 7).

Udi hindi tozunun yetişkin zebra balığında sirkadiyen ritim üzerindeki düzenleyici etkisi

Sirkadiyen sistem, Dünya'nın kendi eksenini etrafında dönmesi sonucunda çevredeki düzenli ve öngörülebilir değişikliklere bir uyum olarak gelişmiştir. Bu çevresel değişiklikler, gündüz ve gecenin düzenli değişiminden oluşur. Stres, sirkadiyen ritimler ve uyku mekanizmaları etkileşim halindedir. Örneğin, psikolojik stresörler uykunun bölünmesine, uyku süresinin ve REM uykusunun azalmasına neden olur (Kim, medicine, and 2007 2007).



Şekil 8. Sirkadiyen ritim testi analiz sonuçları ve deney düzeneği

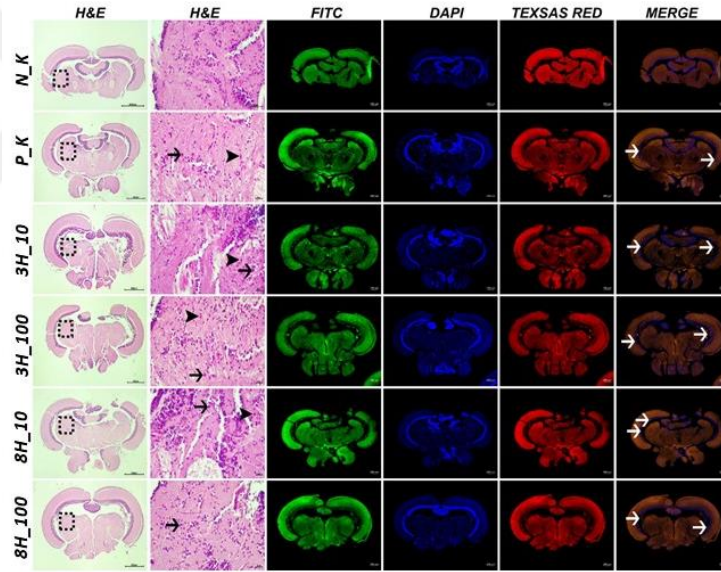
(P_K: Pozitif kontrol, N_K: Negatif kontrol, 3H_10 ve 100 ppm: 3 hafta udi hindi tozuyla beslenen grup, 8H_10 ve 100 ppm: 8 hafta udi hindi tozuyla beslenen grup)

Çalışmamızdan elde edilen sirkadiyen ritim analizi sonuçlarına göre avcı stresine maruz kalan zebra balıklarının özellikle karanlık dönemde daha aktif oldukları görülmektedir. Özellikle aydınlık/karanlık oranı verileri, bu durumu daha net ortaya koymaktadır (Şekil 8). Kat edilen toplam mesafenin toplam zamana bölünmesiyle ölçülen ortalama hız için anlamlı fark olmasada gözle görülür negatif kontrol ile 100 ppm dozlarının benzer sonuçlar verdiği görülmektedir. Gece fazında pozitif kontrole göre kıyaslandığında, udi hindi tozu ile 8 hafta beslenen gruplarda ve 3 hafta beslenen 100 ppm grubunda fiziksel aktivitenin negatif kontrole yaklaştığı görülmektedir. Işık fazında verilerde anlamlı bir fark görülme de gözle görülür

değişikliklerin olduğu görülmektedir. Udi hindi tozunun strese maruz kalan balıklarda uzun süreli beslenme ile yatıştırıcı etkisi olabileceği görülmektedir. Ayrıca bu sonuçlar kaygı ve sirkadiyen arasındaki yakın ilişkinin kanıtı olarak da değerlendirilebilir.

Udi hindi tozunun yetişkin zebra balığı beyinde histopatolojik ve immünohistokimyasal etkileri

Çalışmamızda avcı stresinin tetiklediği anksiyete benzeri davranışların ve bozulan sirkadiyen ritmin altında yatan mekanizmaya ışık tutmak amacıyla zebra balığı beyinlerindeki BDNF ve 5-HT4-R proteinlerinin histopatolojik bulguları ve immünopozitifliği değerlendirilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, predatör stresi sonucu zebra balığı beyinlerinde BDNF ve 5HT4-R proteinlerinin önemli histopatolojik bulguları ve immünopozitifliği saptanmıştır (Şekil 9). Udi hindi tozu ile desteklenmiş diyetle beslenen balıklarda bu histopatolojik bulguların ve immünopozitifliklerin varlığı, udi hindi tozunun dozuna ve beslenme süresine bağlı olarak azalmıştır.

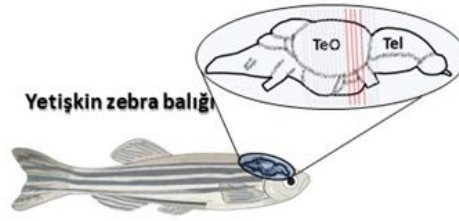


Şekil 9. Zebra balığı beyin kesitlerinde 5-HT4-R ve BDNF immünopozitifliğinin belirlenmesi

Beyin dokuları histopatolojik olarak incelendiğinde; pozitif kontrol grubunda nötrofillerde çok şiddetli şekilde dejenerasyon ve nekroz görüldü. Udi hindi ile tedavi edilen gruplara bakıldığında doz ve besleme süresi arttıkça dejenerasyon ve nekroz seviyelerinin zamanla azaldığı görülmektedir.

Beyin doku örnekleri immunofloresan boyama yöntemi ile incelendiğinde; 8 hafta 100 ppm grubunda hafif düzeyde BDNF ve 5HT4 ekspresyonları gözlemlendi. Pozitif kontrol grubu ile kıyaslandığında anlamlı fark tespit edildi ($p < 0.05$). İmmunofloresan boyama bulgularının skorlanması ve istatistiksel analizleri Tablo 2’ de sunuldu.

Tablo 2. Zebra Balığı Beyin Kesitlerinde 5-HT4-R ve BDNF İmmünopozitifliğinin Skorlama Tablosu



Histopatoloji	Dejenerasyon	Nekroz
N_K	-	-
P_K	++++	++++
3H_10	++++	++++
3H_100	++++	+++
8H_10	+++	++
8H_100	+	-

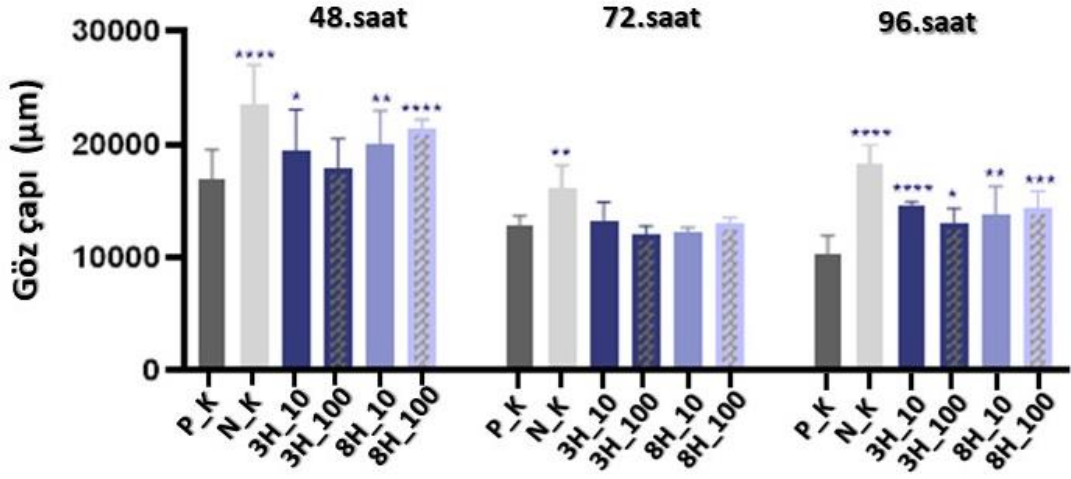
İmmünopozitivite	BDNF	5HT4R
N_K	26.75±0.58 ^a	19.41±1.26 ^a
P_K	132.48±3.75 ^b	115.08±2.71 ^b
3H_10	126.75±3.33 ^b	110.28±3.45 ^b
3H_100	95.84±2.28 ^c	80.39±3 ^c
8H_10	75.29±2.09 ^d	58.79±3.49 ^d
8H_100	48.66±1.96 ^e	33.59±2.76 ^e

(Zebra balığı beyin dokularında hematoksin ve eozin boyamasının (H&E) ve BDNF (FITC) ve 5-HT4R (Teksas kırmızısı) için immüno Floresan reaksiyonlarının mikroskopik görüntüsü. Puanlama tablosu histopatolojik sonuçlardaki dejenerasyon ve nekroz bulgularının ciddiyetinin puanlanmasını gösterir (yok (-), hafif (+), orta (++) , şiddetli (+++), çok şiddetli (++++)) ve 5-HT4R ve BDNF'nin immüno Floresan yoğunluğu)

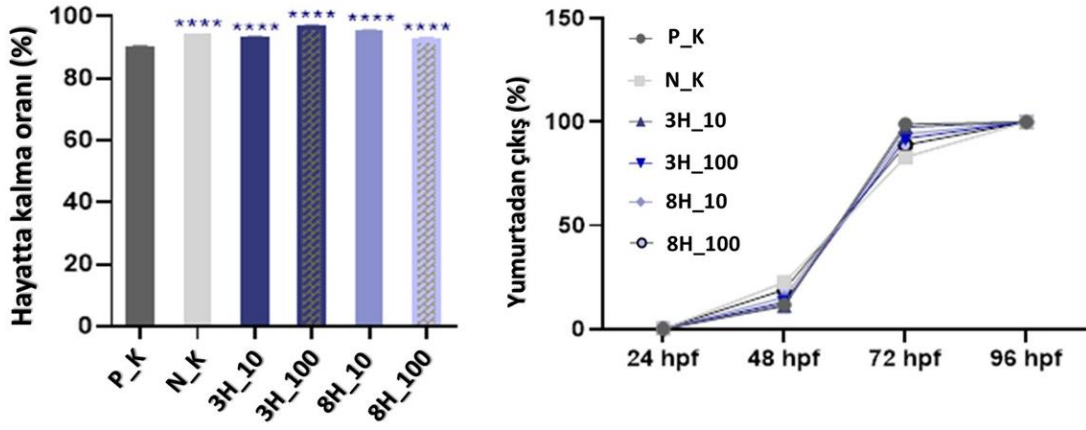
Çalışmamızda predatör stresi ile artan BDNF ve 5HT4-R immünopozitivitesinin, organizmanın bozulan sirkadiyen ritim ve anksiyete bozukluğundan kurtulmak için beyinde verdiği yanıt olduğu düşünülmektedir. Udi hindi destekli diyetle beslenen gruplarda gözlenen hem sirkadiyen ritimdeki hem de anksiyete benzeri davranışlardaki iyileşmeye paralel olarak azalmış immünopozitiflik bu görüşü desteklemektedir.

Maternal predator stresinin ve udi hindi takviyeli diyetin zebra balığı yavruları üzerindeki etkileri

Bu çalışmada, udi hindi ön işleminin hem yetişkin hem de larva parametrelerinde yırtıcı stres kaynaklı değişiklikleri önleme yeteneğini inceledik. Yetişkin zebra balığının yırtıcı strese maruz kalması ve bunun gelecek nesil üzerindeki etkisi, stresin larvalar üzerinde de etkili olabileceğini düşündürmektedir. Negatif kontrol ile karşılaştırıldığında, maternal yırtıcı stres, larvalarda daha kısa uzunluk, daha küçük göz çapı, artan perikardiyal ödem ve toplam vücut malformasyonu ile sonuçlandı.

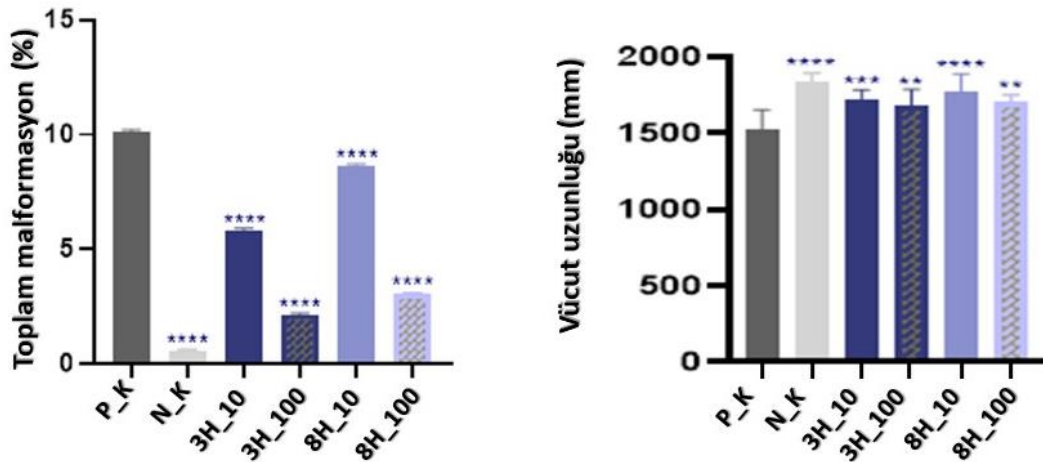


Şekil 10. Zebra balığı larvalarının göz çapı malformasyonlarının belirlenmesi



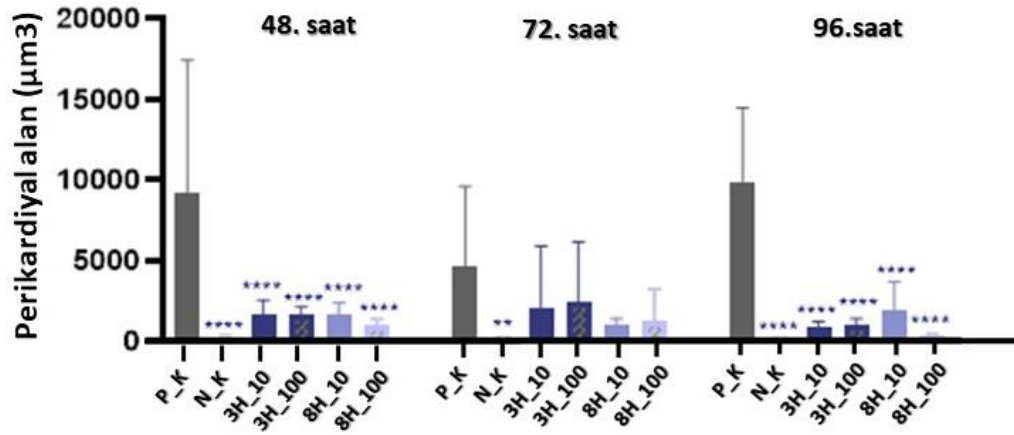
Şekil 11. Zebra balığı larvalarının hayatta kalma ve yumurtadan çıkış oranları

Yumurtadan çıkış ve hayatta kalma oranlarında udi hindi tozunun negatif kontrole benzer sonuçlar gösterdiği yumurtadan çıkış oranlarında bir fark olmadığı görüldü (Şekil 11).

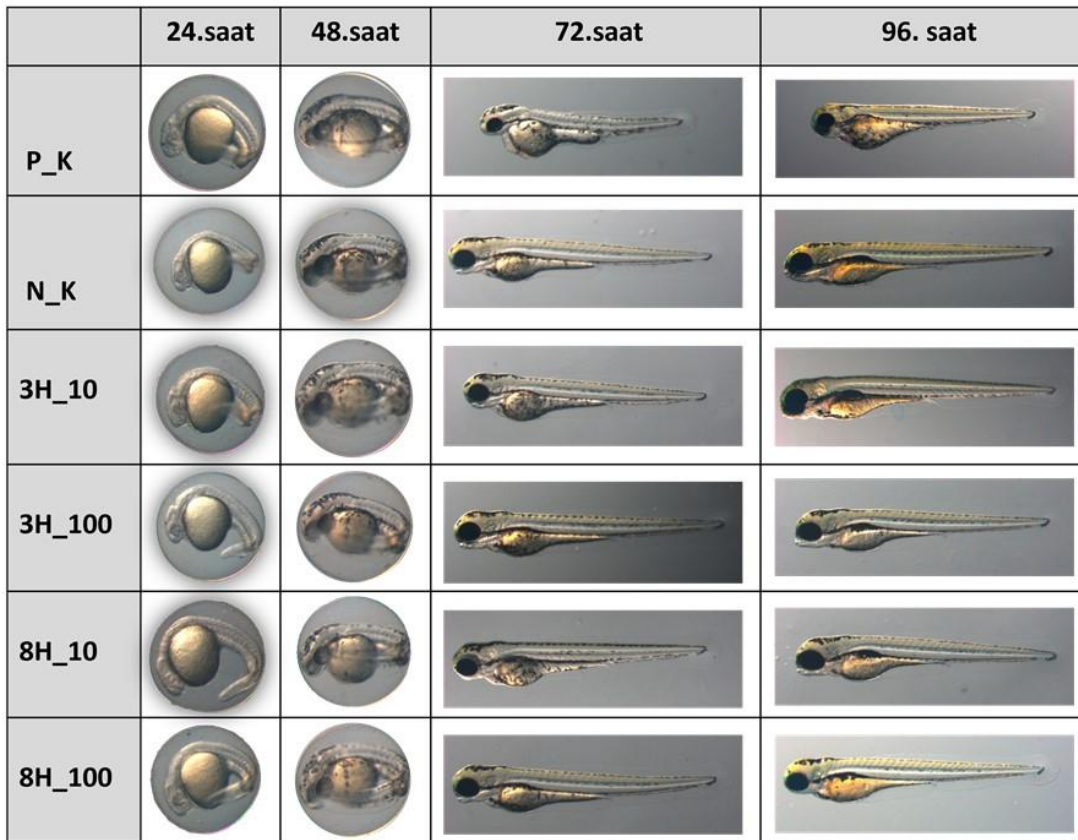


Şekil 12. Zebra balığı larvalarının toplam malformasyon oranı ve 96. Saat boy uzunluğu (P_K: Pozitif kontrol, N_K: Negatif kontrol, 3H_10 ve 100 ppm: 3 hafta udi hindi tozuyla beslenen grup, 8H_10 ve 100 ppm: 8 hafta udi hindi tozuyla beslenen grup)

Pozitif kontrol ile karşılaştırıldığında, udi hindi tozu gruplarında anlamlı olmasa da uzunlukta gözle görülür bir artışa neden oldu. Total malformasyon grafiği incelendiğinde pozitif kontrol ile 10 ppm grubu arasında çok fazla fark olmadığı ancak udi hindi 100 ppm dozlarının negatif kontrole daha yakın olduğu görüldü (Şekil 12). Perikardiyal alan grafiğine bakıldığında pozitif kontrol grubunda maternal stresin yavrularda etkisi olduğunu udi hindi ile beslenen gruplarda maternal stresin yavrularda da yararlı etkisi olabileceği görüldü.

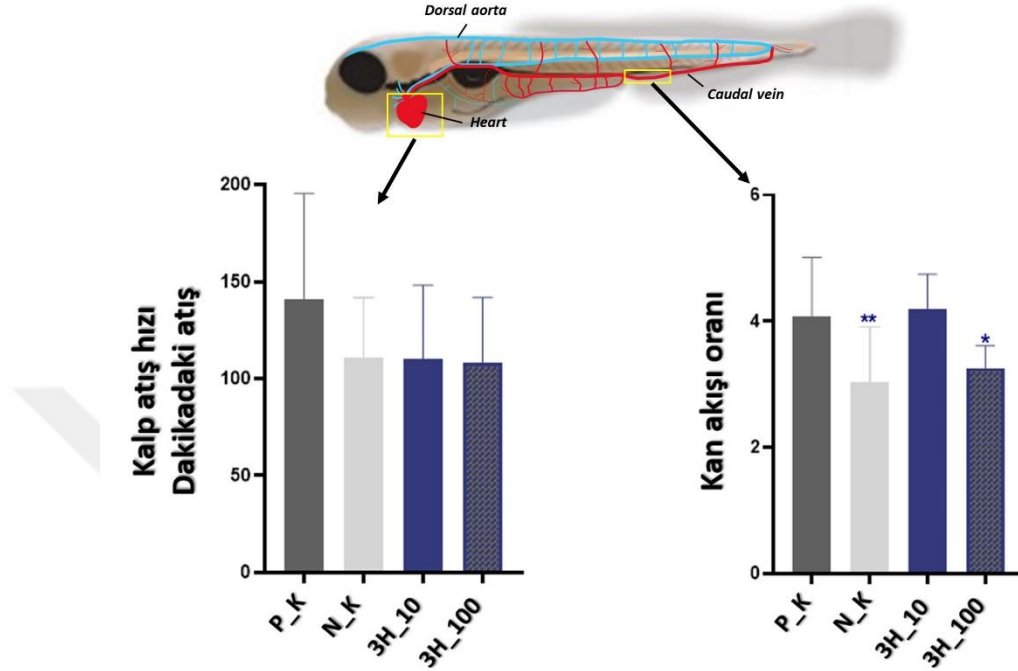


Şekil 13. Zebra balığı larvalarında perikardiyal alan malformasyonlarının belirlenmesi.



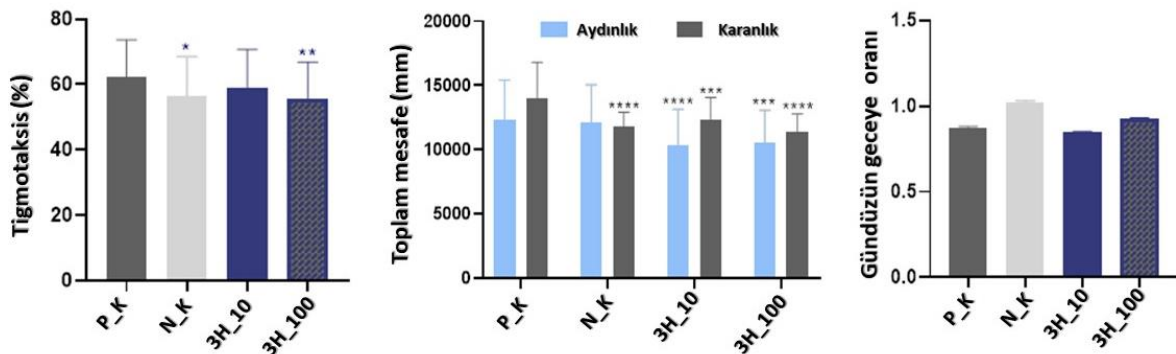
Şekil 14. Zebra balığı embriyolarının mikroskopik görüntüleri. Skala: 200 µm (P_K: Pozitif kontrol, N_K: Negatif kontrol, 3H_10 ve 100 ppm: 3 hafta udi hindi tozu ile beslenen grup, 8H_10 ve 100 ppm: 8 hafta udi hindi tozuyla beslenen grup)

Çalışmamızda, yetişkin zebra balığının yırtıcı strese maruz kalması sonucu olumsuz etkileri, ebeveyn stresinin gelecek nesil üzerinde de etkili olabileceğini ortaya koymuştur. Bu morfolojik sonuçlara göre zebra balıklarında udi hindi katkılı yem ile beslemenin gelecek nesil üzerindeki ebeveyn yırtıcı stresini ortadan kaldırmada etkili olduğu söylenebilir.



Şekil 15. Zebra balığı larvalarında kan akış aktivitesi ve kalp atış hızı
(P_K: Pozitif kontrol, N_K: Negatif kontrol, 3H_10 ve 100 ppm: 3 hafta udi hindi tozuyla beslenen grup)

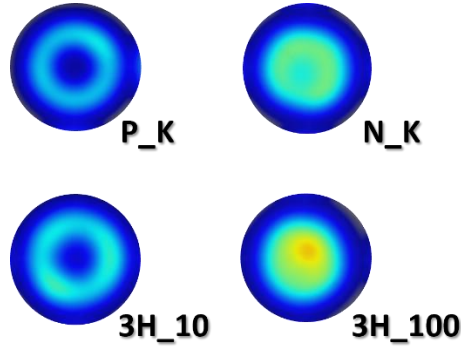
3 hafta boyunca udi hindi destekli diyetle beslenen zebra balığı yavrularında udi hindi dozuna bağlı olarak hem kalp atım hızında hem de kan akış hızında negatif kontrole yakın değerlerin olduğu görüldü. Bu sonuçların gözlemlenmesi udi hindinin terapötik etkisinin bir göstergesi olarak değerlendirildi.



Şekil 16. Tigmotaksis ve yavru larvaların lokomotor aktivite sonuçları
(P_K: Pozitif kontrol, N_K: Negatif kontrol, 3H_10 ve 100 ppm: 3 hafta udi hindi tozuyla beslenen grup)

Larvalarda kaygı benzeri davranışların analizi olarak değerlendirilen lokomotor aktivite analizi ve tigmotaksis analizinde de benzer sonuçlar gözlemlendi. Toplam mesafe grafiğine

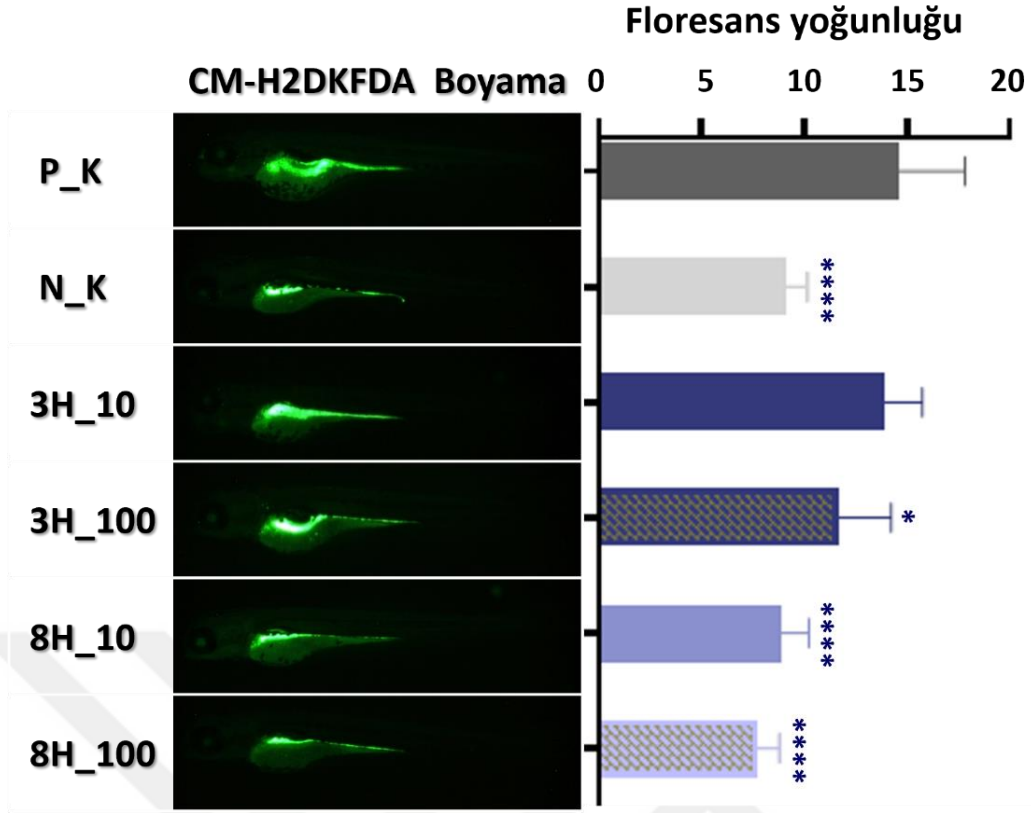
bakıldığında aydınlık ve karanlık faz da udi hindi tozuyla beslenmenin özellikle 100 ppm grubunda negatif kontrole yaklaştığı görülmektedir. Çalışmadan elde edilen sonuçlara göre; ebeveyn yırtıcı maruziyeti yavrularda bile kaygı benzeri sonuçlara neden olabileceği görüldü.



Şekil 17. Tigmotaksis sonuçlarına göre ısı grafiği

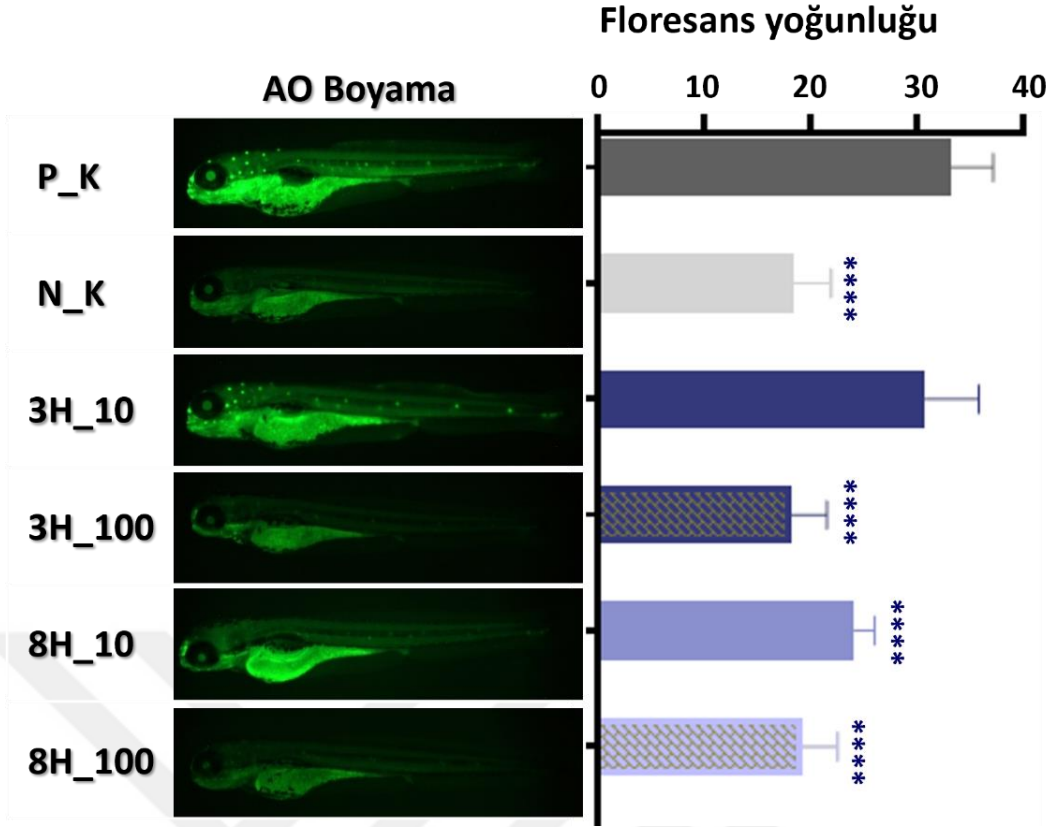
(P_K: Pozitif kontrol, N_K: Negatif kontrol, 3H_10 ve 100 ppm: 3 hafta udi hindi tozuyla beslenen grup)

Tigmotaksis sonuçları kaygı (duvara sarılma eğilimi), keşfetme, korku, cesaret ve saldırganlık gibi davranışsal özelliklerin anne tedavisinden önemli ölçüde etkilendiği bildirilmektedir (Redfern *et al.* 2017). Tigmotaksis, kemirgenlerde kaygıyı değerlendirmek için kullanılan ve zebra balığı ile kullanım için uyarlanmış davranışsal bir testtir. Tigmotaksis, bir hayvanın çevreyi aktif olarak keşfetmek yerine test alanının duvarlarına yakın durma eğilimini ölçer. Beyin hem kortizol stres eksenini hem de davranışsal tepkileri koordine ettiğinden, anne stresine (örneğin, yüksek kortizol birikimi) yanıt olarak değişen nörogenez, davranışta uzun vadeli değişikliklerle sonuçlanan gelişimsel programlama için bir mekanizma olabilir (Best *et al.* 2017). Grubumuzun sadece 3 hafta beslenen larvalarına bakıldığında, stresin larvalarda da endişe verici bir etkiye sahip olabileceği ve udi hindinin 100 ppm dozunun iyileştirici etkisinde önemli bir azalma sergilediği görüldü.



Şekil 18. CMH₂DCFDA boyama sonuçlarının ve floresans yoğunluklarının belirlenmesi (P_K: Pozitif kontrol, N_K: Negatif kontrol, 3H_10 ve 100 ppm: 3 hafta udi hindi tozuyla beslenen grup)

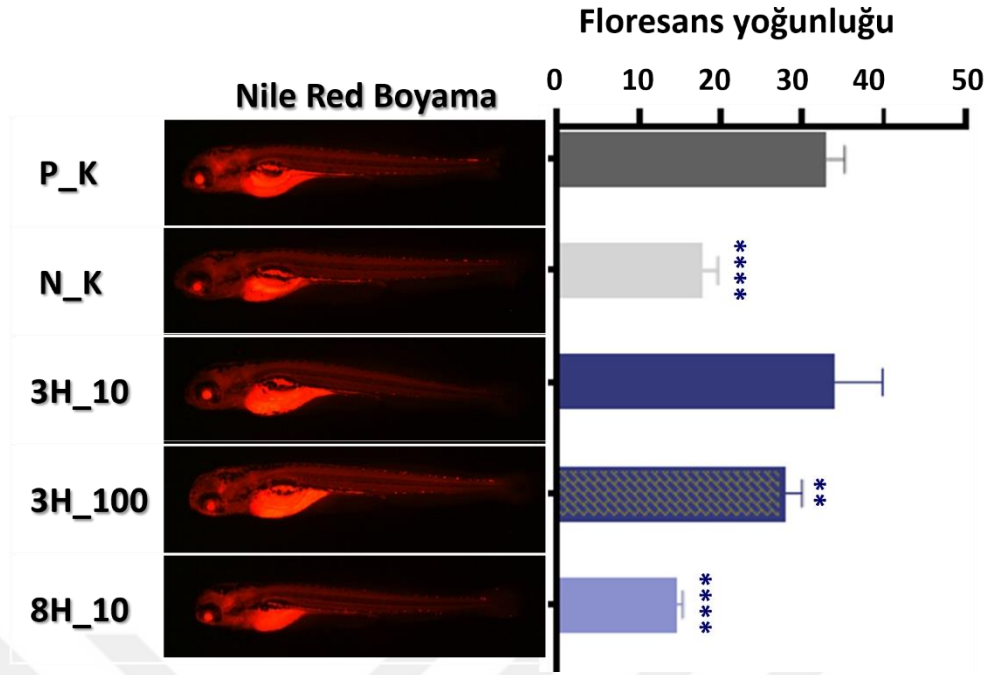
Çalışmamızda ebeveyn predatör stresinin etkilerini ve udi hindinin bu strese karşı yavrular üzerindeki terapötik etkisini değerlendirmek amacıyla, yavru larvalarda reaktif oksijen türleri (ROS), apoptotik hücreler ve lipid damlacıkları floresans boyama ile tespit edildi. Elde edilen sonuçlara göre, ebeveyn predatör stresi, yavru larvalarda ROS oluşumunu, hücre ölümünü ve lipid birikimini tetiklemiş ve ilginç bir şekilde, anne ve babanın yavrularında udi hindi dozuna ve süresine bağlı olarak tüm bu parametrelerde iyileşmeler gözlemlendi. Oksidatif stres tarafından üretilen ROS, apoptoza aracılık edebilir (Radi *et al.* 2014).



Şekil 19. Akridin orange (AO) boyama sonuçları ve apoptoza uğramış hücrelerin floresans yoğunluğu

(P_K: Pozitif kontrol, N_K: Negatif kontrol, 3H_10 ve 100 ppm: 3 hafta udi hindi tozuyla beslenen grup)

Apoptotik hücreler (AO) pozitif kontrol grubunda artarken, 10 ppm grubu 3 hafta besleme sonucunda pozitif kontrol ile bir farkının olmadığı 8 hafta beslemenin ise az da olsa negatif kontrole yaklaştığı, 100 ppm gruplarında ise her iki dönemde de negatif kontrole yaklaştığı görüldü. Apoptoz olayı aslında her zaman gerçekleşebilir. Normalde vücut içinde kontrollü ölüm gerçekleşir fakat fazla olması vücutta bazı hücrelerde DNA hasarı olduğunu göstermektedir (Kuang *et al.* 2014).



Şekil 20. Nil red boyama sonuçları ve floresans yoğunluğu
(P_K: Pozitif kontrol, N_K: Negatif kontrol, 3H_10 ve 100 ppm: 3 hafta udi hindi tozuyla beslenen grup)

Nil red boyama sonuçları incelendiğinde, floresans yoğunluğunun pozitif kontrolde ve 3 hafta beslenen 10 ppm grubunda daha yüksek olduğunu ve 100 ppm grubunda azaldığını gösterdi.

TARTIŞMA ve SONUÇ

Modern hayatın hızlanan temposu ve artan mesleki rekabet, buna COVID-19'un da eklenmesiyle birlikte kaygı ve depresyon sıklığı artmaktadır. Mevcut veriler anksiyolitik etkili bitki ekstraktlarının anksiyete tedavisinde kullanımının giderek arttığını göstermektedir (Abreu *et al.* 2021). Çalışmamızda zebra balığı modeli kullanılarak ani bir strese maruz kalınması sonucu oluşan kaygı benzeri davranış üzerinde udi hindi tozunun anksiyolitik etkisinin farklı iki dozda, kısa ve uzun sürede etkisi araştırılmaktadır. Uzun süreli beslemenin udi hindi 100 ppm dozunda daha çok anksiyolitik etkisi olduğu görülmektedir. Zebra balığı, allopatrik avcısı (*Astronotus ocellatus*) balıkla görsel temastan sonra vücut kortizol seviyelerinde artış olması ve davranışı üzerindeki anksiyojenik etkisi artan stres tepkilerini de doğrular nitelikte olduğu görülmektedir (Cachat *et al.* 2011). Bu nedenle çalışmamızda zebra balıkları allopatrik avcısı olan oscar balıkları ile görsel temas sonucu strese maruz bırakılıp kaygı benzeri davranış sergilemişlerdir. Zebra balığının oscar balığı ile görsel teması merkezî tankta zebra balığı yan tankta olmak üzere oscar balığı ile birbirlerini görebilecek şekilde bir panel ile ayrılarak konulmaktadır (Spinello *et al.* 2019). Çalışmamızda yırtıcı balık; iç uyaran tankından ziyade dairesel bir arenanın dış kısmında yüzmektedir. Dairesel arenada avcı (oscar balığı) ile av (zebra balığı) görsel temas etkileşiminin daha fazla olabileceği düşünülmektedir. Uyarıcı tankının nispeten küçük boyut olması, kırmızı kaplan oscar balığının sürekli yüzmek yerine bir yere oturmayı ve yaklaştığında zebra balığına doğru hareket etmeyi tercih ettiği bildirilmektedir (Neri *et al.* 2017). Bizim sonuçlarımızla uyumlu olarak, çalışmalar zebra balığının oscar balığıyla görsel temastan sonra tankın dibinde daha fazla zaman geçirdiğini ve tankın üst bölgesine geçişte daha kısa gecikme ile öğrenilmiş kaçınma davranışı sergilediğini bildirmiştir (Collier, Kalueff, and Echevarria 2017). Bulgularımız, zebra balığında anksiyojenik etkiler oluşturan çalışmalarla tutarlıdır (Giacomini *et al.* 2021; Thompson *et al.* 2020). Kaygı düzeyini değerlendirmek için yeni tank testi kullanılarak daha önce tarif edildiği gibi Ethovision yazılımı aracılığıyla video kayıtlarının gözlemlenmesi/hesaplanmasından elde edilen yedi parametre kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Egan *et al.* 2009; Cachat *et al.* 2011). Bu test modeli ile balığın tankta daha fazla zaman geçirdiği kısım (üst yarı veya alt yarı), bölgeler arası geçiş, düzensiz hareket ve donma hareketi gibi davranışlar incelenerek analiz edilmektedir. Zebra balığındaki düzensiz hareket, bir yırtıcı hayvan modeline veya bir alarm ajanına maruz kalmaktan etkilenir ve bunun kaygıdan çok korku ile ilişkili olabileceği de bildirilmiştir (Barcellos *et al.* 2007). Av, bir avcı ile karşılaştığında, içsel fizyolojik yapısı gereği kaçmaya çalışır. Bununla birlikte,

kaçan hayvan kaçmayı azaltmak için köşeye sıkıştırılırsa, hayvan aniden ölüyormuş gibi görünür ve donma nöbeti gösterebilir (Brandão *et al.* 2008).

Nitekim fareler üzerinde kısıtlama stresi ile indüklenen çeşitli davranış testleri kullanılarak udi hindi esansiyel yağının anksiyete ve depresyon tedavisinde umut verici olabileceği bildirilmiştir. Udi hindi esansiyel yağının 10 gün boyunca uygulanan 10-20 ve 40 mg/kg dozlarının anksiyete üzerine etkileri incelenmiş ve anksiyete için kullanılan davranış testlerinde 40 mg/kg dozunun diğer dozlara göre daha etkili olduğu görülmüştür (Wang *et al.* 2017). Alla Handral tarafından yapılan çalışmada *A. agallocha*'nın fareler üzerinde 30-100 ve 300 mg/kg dozlarında anksiyolitik ve antikonvülzan etkileri incelendiğinde 100 mg/kg dozunun daha etkili sonuçlar verdiği bildirilmiştir (Alla *et al.* 2007). Genellikle insanlarda anksiyete tedavisi için reçete edilen buspirone diazepamın zebra balığı üzerindeki anksiyolitik etkilerinin araştırıldığı çalışmalarda elde edilen sonuçlar bizim çalışmamızla benzerlik göstermekte ve udi hindi tozunun alternatif bir tedavi olarak kullanılabileceğini göstermektedir. Udi hindi dozu belirlenirken çalışmalara uyumlu olarak belirlenmiştir. Bildiğimiz kadarıyla literatürde udi hindi tozunun anksiyolitik etkisiyle ilgili az sayıda çalışma olup ayrıntılı moleküler çalışma bulunmamaktadır.

Stres yanıtlarının uyku ve sirkadiyen ritim bozukluğu ile kesiştiği önemli bir alan HPA eksen ve kortizol seviyeleridir (Phan *et al.* 2019). Kortizol, uyku ve uyanıklık arasındaki geçiş sırasında, sabah altı ile sekiz arasında artan bir sirkadiyen ritim ile karakterize edilir (Neumark *et al.* 1985). Melatonin ise beyindeki uyku yapıları üzerindeki olası etkilerinden ziyade doğrudan ana saati sıfırlayarak çalışan önemli bir uyku düzenleyici hormondur. Çalışmalar ayrıca stres koşullarında yüksek kortizol konsantrasyonlarının epifiz bezinden melatonin salgılanmasını azalttığını göstermiştir (Agorastos *et al.* 2020). Melatonin ve kortizol, bir organizmanın zamansal yapısını kontrol etmemize izin veren iki yararlı belirteç ritmidir, çünkü her ikisi de sirkadiyen senkronizasyon bozukluğuna, yani sirkadiyen sistemin faz ilerlemesine, faz gecikmesine veya bozulmasına neden olur (Selmaoui and Touitou, 2021). Zebra balığı ise, özel saat ve fotoreseptör bölgeleri ve beynin fonksiyonel gelişiminin moleküler temelli aydınlatılması nedeniyle sirkadiyen ritim araştırmalarında ortaya çıkan bir model haline gelmiştir. (Vatine *et al.* 2011) Bu çalışmada predator stresine maruz kalan zebra balıklarının anksiyolitik etki gösteren udi hindi tozu arasındaki sirkadiyen ritim ve hareket aktivitesi değerlendirilmiştir. Udi hindi tozu ile çok sayıda çalışma olmamasıyla birlikte udi hindi esansiyel yağının farelerde yatıştırıcı ve sedatif hipnotik etkiye sahip olduğu bildirilmektedir. Gerçekten de udi hindi esansiyel yağının sedatif-hipnotik etkisi, gama-aminobutirik asit (GABA) reseptörlerinin gen ekspresyonunu düzenleyerek aracılık etmektedir. Udi hindi

esansiyel yağı sıçanlarda anksiyolitik ve antidepresan etkilere sahiptir ve etki mekanizmasının kortikotropin salan faktörün inhibisyonu ve HPA ekseninin hiperaktivitesi yoluyla olduğu bildirilmektedir (Peeraphong, 2021). Okugawa tarafından yürütülen bir araştırma, petrol eteri, benzen, kloroform ve *A. agallocha* elde edilen su ekstraktlarının yatıştırıcı etkilerini karşılaştırmış ve sonuçlar sadece benzen ekstraktının yatıştırıcı etkiye sahip olduğunu göstermiştir. Özellikle, benzen agarwood özütünün spontan hareketliliği azalttığı, bir barbitüratla birlikte uygulandığında uyku süresini artırdığı, rektal sıcaklığı düşürdüğü ve ağrıyı hafifletme potansiyeline sahip olduğu görülmektedir (Okugawa *et al.* 1993). Önceki çalışmalar, etolojik olarak ilgili bir stres etkeni olan avcı stresinin nöroenflamasyon ve davranışta değişikliklere neden olabileceğini öne sürmektedir (Barnum *et al.* 2012; Roseboom *et al.* 2007; Zhao *et al.* 2007). Bu bağlamda predatör stres modeli, psikolojik stresin neden olabileceği inflamasyon içeren hastalıkların mekanizmalarının aydınlatılmasında yararlı olabilir (Barnum *et al.* 2012).

Bugüne kadar yapılan çalışmalar, udi hindi bitkisinin, HPA eksen hiperaktivitesinin inhibisyonu, nörotransmitter değişiklikleri, nöroproteksiyon, antioksidan, anti-inflamasyon, asetilkolinesteraz inhibitör aktivitesi ve diğerleri dahil olmak üzere zihinsel bozuklukların tedavisinde farklı etki mekanizmalarını bildirmiştir (Chen *et al.* 2022). Antidepresan kaynaklı P12 hücre hasarının in vitro modelinde, udi hindinin P12 ile hasar görmüş hücreler üzerinde önemli koruyucu etkilere sahip olduğu öne sürüldü (He *et al.* 2021). Benzer şekilde, udi hindinin glutamat ve kortikosteron ile indüklenen P12 kromofob hücrelerde ve insan U251 glioma hücrelerinde hücre sağ kalımını büyük ölçüde iyileştirdiği ve ayrıca pozitif ilaç fluoksetininkine benzer nöroprotektif aktivite sergilediği bildirilmiştir (Yang *et al.* 2012). Bildiğimiz kadarıyla, bu çalışma udi hindi tozunun avcı stresine maruz kalmanın neden olduğu nötrofillerin dejenerasyonu ve nekrozu üzerindeki iyileştirici etkisini gösteren ilk çalışmadır.

BDNF, beyindeki nöronal bakım, nöronal sağkalım, plastisite ve nörotransmitter düzenlemesi ile ilişkilidir. Ayrıca zebra balığı üzerinde yapılan bir çalışmada, BDNF'nin sirkadiyen ritim üzerindeki düzenleyici rolünü göstermiştir. Öte yandan, hayvan deneysel çalışmaları, biliş ve ruh halinde yer aldığı bilinen striatal ve limbik alanlarda bulunan sinaptik sonrası bir reseptör olan 5-HT₄-R'nin aktivasyonunun, depresyon ve bilişsel bozukluğun tedavisi için yeni bir hedef olduğunu göstermektedir (Murphy *et al.* 2021). Bilindiği üzere balıklarda farklı stres türleri, (bir avcıya maruz kalma) beyin serotonerjik aktivitesinde artışa neden olur (Winberg, Myrberg, and Nilsson 1993).

Annelerin hamilelik sırasında stresöre maruz kaldığı anne predasyon stres paradigmlarında bile, hepsi olmasa da bazı araştırmalar, anne deneyiminin yavru

kortikosteronunun kısıtlama stresine tepkisi üzerindeki etkilerini bildirmektedir (Brass *et al.* 2020; St-Cyr and McGowan, 2015). Artmış maternal kortizol düzeylerinin mortalitede artışa, yolk sac hacminde azalmaya, yolk sac kullanımında yavaşlamaya ve morfolojik malformasyon prevalansında artışa neden olduğu bildirilmektedir (Eriksen *et al.* 2006). Bir balık bir stres kaynağına maruz kaldığında, hipotalamik-hipofiz-interrenal (HPI) eksenini aktive olur ve bu da kortizol üretiminin artmasına neden olur. Bu glukokortikoid (GC) stres hormonu, kortizolün yumurtalarda depolanan anne fonksiyonlarını ve balıklarda erken gelişim sırasında etkilediğinden, yavrular üzerindeki anne stresi etkilerinin bir aracıdır ve göz oluşumu, HPI eksenini oluşumu, iskelet ve kalp kası oluşumunda organizasyonel bir rol oynar (Redfern *et al.* 2017). Kortizol, embriyolojik gelişimi doğrudan etkiler, daha yüksek kortizol seviyeleri tüm gelişim ritimlerini hızlandırır, ancak gelişimin kendisini etkilemez (McCormick, Zoology, and 2002 2002). Anneden geçen bu tür hormonal kaynakların, yavruların optimal gelişim yörüngelerini etkilediği ve hatta engellediği gösterilmiştir. *Pomacentrus amboinensis* yetişkin balığı yüksek kortizol seviyeleri, yumurta ölümlerinde artışa ve yavrularda daha büyük asimetriye neden olmaktadır, bu da balığın normal veya homeostatik durumunun strese olumsuz etkilendiğini düşündürür. Yüksek kortizol seviyelerine maruz kaldığında yumurtadan çıkmanın arttığı görülmektedir. Bunun nedeni kortizolün gelişimsel ritimleri hızlandırması olabilir. Çalışmamızda anlamlı olmamakla birlikte ebeveyn yırtıcı stresinin yavrularda yumurtadan çıkmayı hızlandırdığı gözlenmiştir. Daha yüksek kortizol konsantrasyonlarına maruz kalan embriyoların, yumurtadan çıkmadan hemen önce daha yüksek kalp hızları sergiledikleri bildirilmektedir. Yumurtadan çıkışı geciken balıkların, yumurtada geçirdikleri fazladan gün boyunca büyümelerinin durduğu bildirilmektedir. Bu, kortizolün neden olduğu stresin, muhtemelen büyümeden ziyade daha yüksek hareket seviyelerinin sürdürülmesi için artan metabolik harcamadan kaynaklanan, enerji kaynaklarının daha hızlı tükenmesini başlattığını göstermektedir. Balıkların fizyolojik stres tepkisi, memelilerde bulunana benzer şekilde ve bu nedenle, çevresel zorlukların balıklarda da ebeveyn durumunu etkileme ve yavrularının gelişimini değiştirme potansiyeli bulunmaktadır (Gagliano and McCormick, 2009). Bu bilgi, çalışmamızda gözlemlenen pozitif kontrol grubunun yavrularında artan kan akışı ve kalp atış hızını açıklamaktadır. Kemirgenlerde, gebelik sırasında kronik avlanma tehdidine maruz kalan dişilerin yavruları genellikle strese duyarlıdır ve artan kaygı ile ilgili davranışlar sergilemektedir (St-Cyr and McGowan, 2015). Spesifik olarak, predasyona maruz kalan erkeklerin yavrularının, akut dönemde daha yüksek kortikosteron seviyelerine sahip olduğu, kontrol erkeklerinin yavrularına göre daha az keşfedici davranış ve artan kaygı benzeri davranışlar ve daha fazla kaçınma sergilediği rapor edilmiştir (Faught *et al.* 2018; St-Cyr and McGowan, 2015). Ayrıca, bazı balık türlerinde, yumurta kortizol konsantrasyonları,

dolaşımdaki maternal plazma kortizol konsantrasyonları ile pozitif olarak ilişkilidir (Nesan and Vijayan, 2013; Best *et al.* 2017).

Glukokortikoidlerin üreme süreçleri üzerindeki etkisi kapsamlı bir şekilde incelenmiştir. Genel olarak fizyolojik stresin üremeyi inhibe edici etkiye sahip olduğu bildirilmektedir (Faught *et al.* 2018). Bizim çalışmamızda ise aksine predatör stresine maruz kalan anaç balıklardan elde edilen yumurta sayısı diğer gruplardan elde edilen yumurta sayısına yakın veya daha fazla olmuştur. Yapılan bir çalışmada maternal kortizol artışı ile larva boyutlarının küçüldüğü bildirilmiştir (McCormick *et al.* 2002). Pozitif kontrol larvalarına baktığımızda diğer çalışmalara benzer şekilde larva boylarının diğer gruplara göre daha küçük olduğu görülmektedir (Gagliano and McCormick, 2009).

Stresin neden olduğu nörodavranışsal bozukluklarla ilgili olarak, son zamanlarda kaygı ve oksidatif stres arasında yakın bir bağlantı tanımlanmıştır (Rammal *et al.* 2008). Stres hormonlarının oksidatif stresi etkileyebileceğine ve oksidatif stresin hayatta kalma süresinin azalmasıyla ilişkili olduğuna dair artan kanıtlar göz önüne alındığında, maternal glukokortikoidlerin yavruların yaşlanma etkilerini şekillendirmesi mümkündür. Yüksek glukokortikoidler tavuk, kerkenez ve baykuşlarda oksidatif hasarı artırırken, sıçanlarda kronik glukokortikoid uygulamasının lipid peroksidasyonunu arttırdığı ve antioksidan aktiviteyi azalttığı bildirilmektedir (Hausmann *et al.* 2012). Toumi ve arkadaşlarının sıçanlarda yaptığı çalışmada yırtıcı hayvan stresine maruz kalmadan önce anksiyolitik etkilere sahip olan quersetin uygulamasının, stres kaynaklı kortikosteron salınımını bloke ettiğini ve maternal anksiyete ölçümlerini hafifleterek beyin oksidatif stresini azalttığını bildirmiştir. Hamilelik sırasında orta dozda quercetin alımı, anne ve çocuğu üzerindeki travmatik stresin olumsuz etkilerini hafifletebilir. Udi hindi tozu benzer şekilde, daha uzun beslemenin ve yüksek dozların uygulanmasının, annenin yırtıcı stresinin bir sonucu olarak yavrularda üretilen reaktif oksijen türlerini (ROS) azaltma eğiliminde olduğunu gösterdi (Toumi *et al.* 2013).

Sonuçlar ve Öneriler

Son dönemlerde Covid19 'un da çıkmasıyla birlikte insanlarda stresten kaynaklı oluşan anksiyete bozukluğu görülme sıklığı giderek artmıştır ve insanların yaşam kalitesini olumsuz yönde etkilemektedir. Bu nedenle sentetik ilaç sınıfı, stres ve kaygıyı tedavi etmek için dünyada en çok reçete edilen kaygı giderici ilaçlardan olmaktadır. Bununla birlikte, bağımlılık, yoksunluk sendromu ve motor reflekslerin azalması gibi birçok risk ilaç kullanımları sonucunda görülmektedir. Bu nedenle udi hindi türleri de dâhil olmak üzere bitkisel ilaçların ve nutrasötiklerin bu amaç için kullanımı ve önerilmesi doktorlar ve hastalar arasında artmaktadır. Bitki ekstraktların biyoeşdeğerliğini belirlemek için in vitro ve in vivo çalışmalara ihtiyaç

vardır (Fonseca *et al.* 2020). Hayvanların ve insanların duyguları ifade etme konusunda benzer özelliklere sahip olduğuna dair kanıtlar, hayvan modelleri ile psikiyatrik bozuklukların mekanizmalarını inceleme olasılığını artırmaktadır. Anksiyete ve strese ilişkin hayvan modellerinin geliştirilmesi, çeşitli bitki ekstraktlarının mekanizmalarını ve potansiyel klinik etkilerini belirleme konusunda yardımcı olmaktadır. Hayvan modellerinin bir diğer avantajı ise, beyindeki biyolojik değişikliklerin ölçülebilmesi ve insanlarda kolayca ölçülemeyen etki mekanizmaları hakkında fikir veriyor olmasıdır (Campos *et al.* 2013).

Yapılan çalışmalardan elde edilen veriler dikkate alındığında; zebra balıklarında kaygıyı modellemek için alarm feromonu, yırtıcı hayvana maruz kalma gibi çok çeşitli stres faktörlerine akut veya kronik maruz bırakıldığı bilinmektedir (Buenhombre *et al.* 2021). Çalışmamızda oscar balığının zebra balıkları üzerinde av avcı etkileşiminden kaynaklanan anksiyojenik etkisi görülmektedir. Çalışmalarda hayvan modelleri ile korku ve kaygının biyolojik bağıntılarının altında yatan nedenleri araştırılarak kaygının etiyojisine ilişkin kanıtlar bildirilmektedir (Steimer, 2022).

Anksiyete için alternatif tedavi olarak çeşitli bitki özleri kullanılsa da udi hindi tozunun, Covid 19'un da ortaya çıkmasıyla son zamanlarda popüleritesi artan bir ürün haline gelmektedir. Udi hindi tozu ve yağının antioksidan, antiinflamatuvar, antidiyabetik, yatıştırıcı ve sakinleştirici etkisi bildirilmektedir. Udi hindinin fizyolojik aktivitesi ve etki mekanizması hakkında araştırmalar devam etmektedir. Udi hindinin genel olarak halk tarafından artan kullanımıyla ilgili bitki-ilaç etkileşimleri dikkat gerektirmektedir. Bitki ilaç etkileşimi de dikkate alınarak daha fazla çalışmaya ihtiyaç olduğu görülmektedir. Bununla birlikte, şimdiye kadar yapılan araştırmalar, udi hindinin kendi başına sakinleştirici etkiye sahip olduğunu ve bu geleneksel bitkinin strese ve stres ile ilişkili nöropsikiyatrik rahatsızlıklara karşı dayanıklılık sağlama potansiyeline katkıda bulunduğunu göstermektedir. İncelenen çalışmalarda anksiyolitik etki gösterebileceği bildirilse de doza bağlı ya da kısa ve uzun süre kullanımı ile ilgili bilgi bulunmamaktadır. Çalışmamızda elde edilen sonuçlar, udi hindinin anksiyolitik, sedatif etkiye sahip olduğunu ve anne stresinin yeni nesil üzerinde etkisi olduğunu ve udi hindi tozu ile tedavi edilen anaç balıkların yavruları üzerinde kaygıyı azaltmak için yararlı bir etkiye sahip olabileceğini göstermiştir. İncelenen araştırmalarda maternal predator stresin avcı kokusuna maruz kalma durumunda bile yavrularda korku ve kaygı benzeri davranışa karşı duyarlı hale geldiği ve yavru gelişiminde ve davranış hareketinde etkileri olabileceği bildirilmektedir. Bildiğimiz kadarıyla yapılan çalışmalarda udi hindinin yeni nesil üzerinde etkisi ile ilgili bilgi bulunmamaktadır. Literatürdeki bu eksiklik göz önüne alındığında yaptığımız bu çalışmadan udi hindinin gelecek nesillerde de etkisi olduğunu göstermiştir.

Aynı zamanda çalışmamızda udi hindinin 8 hafta 100 ppm kullanımının daha yararlı etkisi olduğu görülmektedir. Çalışmamızda udi hindi tozu ekstraktı diyetle verilmektedir. İncelenen araştırmalarda ise zebra balıklarına bitki ekstraktı kullanımını daldırma yöntemiyle (suya verilerek) kısa sürede uygulandığı görülmektedir (del Valle-Mojica and Ortíz, 2012; Lira *et al.* 2020). Bu nedenle gözlenen terapötik etkinin altında yatan mekanizmanın daha net aydınlatılabilmesi için gelecekteki çalışmalarda bağırsak mikrobiyotasının nasıl etkilendiğinin araştırılmasına ihtiyaç olduğu düşünülmektedir.



KAYNAKLAR

- Abreu, M. S., Giacomini, A. C., Demin, K. A., Galstyan, D. S., Zabegalov, K. N., Kolesnikova, T. O., ... Kalueff, A. V. 2021. "Unconventional anxiety pharmacology in zebrafish: Drugs beyond traditional anxiogenic and anxiolytic spectra." *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 207, 173205.
- Agorastos, Agorastos, Nicolas C. Nicolaides, Vasilios P. Bozikas, George P. Chrousos, and Panagiota Pervanidou. 2020. "Multilevel Interactions of Stress and Circadian System: Implications for Traumatic Stress." *Frontiers in Psychiatry* 10:1003.
- Agrawal, Jyoti, Anil Kumar Maurya, Dharmendra K. Yadav, Vipin Mudgal, Anil K. Maurya, Dnyaneshwar U. Bawankule, Chandan S. Chanotiya, Feroz Khan, and Sanjog T. Thul. 2013. "Molecular Docking and ADME Studies of Natural Compounds of Agarwood Oil for Topical Anti-Inflammatory Activity." *Ingentaconnect.Com* (9):360–70.
- Alam, J., Mujahid, M., Jahan, Y., Bagga, P., Rahman, M. A. 2017. "Hepatoprotective potential of ethanolic extract of *Aquilaria agallocha* leaves against paracetamol induced hepatotoxicity in SD rats." *Journal of traditional and complementary medicine*, 7(1), 9-13.
- Alla, T., Handral, M., Nandakumar, K., Venkatrao, N., & Shantakumar, S. M. (2007). "Anxiolytic and anticonvulsant activity of alcoholic extract of heartwood of *Aquilaria agallocha* roxb, (Thymelaeaceae) in mice." *Pharmacologyonline*, 1, 564-572.
- Arel-Dubeau, A. M., Longpré, F., Bournival, J., Tremblay, C., Demers-Lamarche, J., Haskova, P., ... & Martinoli, M. G. 2014. Cucurbitacin E has neuroprotective properties and autophagic modulating activities on dopaminergic neurons. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2014.
- Audira, G., Sampurna, B. P., Juniardi, S., Liang, S. T., Lai, Y. H., Han, L., Hsiao, C. D. 2019. "Establishing simple image-based methods and a cost-effective instrument for toxicity assessment on circadian rhythm dysregulation in fish." *Biology open*, 8(6), bio041871.
- Balcioglu, I. 2002. "Anksiyete bozukluklarinin psikoendokrinolojisi/The psychoendocrinology of anxiety disorders." *Anadolu Psikiyatri Dergisi*, 3(1), 45.
- Bandelow, Borwin, Sophie Michaelis, and Dirk Wedekind. 2022. "Treatment of Anxiety Disorders." 19(2):93–107.
- Baran, A., Köktürk, M., Atamanalp, M., & Ceyhun, S. B. 2018. "Determination of developmental toxicity of zebrafish exposed to propyl gallate dosed lower than ADI (Acceptable Daily Intake)." *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 94, 16-21.
- Baran, A., Sulukan, E., Türkoğlu, M., Ghosigharehagaji, A., Yildirim, S., Kankaynar, M., ... Ceyhun, S. B. 2020. "Is sodium carboxymethyl cellulose (CMC) really completely innocent? It may be triggering obesity." *International Journal of Biological Macromolecules*, 163, 2465-2473.
- Barcellos, L. J. G., Ritter, F., Kreutz, L. C., Quevedo, R. M., da Silva, L. B., Bedin, A. C., ... Cericato, L. 2007. "Whole-body cortisol increases after direct and visual contact with a predator in zebrafish, *Danio rerio*." *Aquaculture*, 272(1-4), 774-778.
- Barnum, Christopher J., Thaddeus W. W. Pace, Fang Hu, Gretchen N. Neigh, and Malú G. Tansey. 2012. "Psychological Stress in Adolescent and Adult Mice Increases

- Neuroinflammation and Attenuates the Response to LPS Challenge.” *Journal of Neuroinflammation* 9.
- Benneh, Charles Kwaku, Robert Peter Biney, Priscilla Kolibea Mante, Augustine Tandoh, Donatus Wewura Adongo, and Eric Woode. 2017. “Maerua Angolensis Stem Bark Extract Reverses Anxiety and Related Behaviours in Zebrafish—Involvement of GABAergic and 5-HT Systems.” *Journal of Ethnopharmacology* 207:129–45.
- Best, C., Kurrasch, D. M., & Vijayan, M. M. 2017. “Maternal cortisol stimulates neurogenesis and affects larval behaviour in zebrafish.” *Scientific reports*, 7(1), 1-10.
- Brandão, M. L., Zanoveli, J. M., Ruiz-Martinez, R. C., Oliveira, L. C., Landeira-Fernandez, J. 2008. “Different patterns of freezing behavior organized in the periaqueductal gray of rats: association with different types of anxiety.” *Behavioural brain research*, 188(1), 1-13.
- Brass, K. E., Herndon, N., Gardner, S. A., Grindstaff, J. L., Campbell, P. 2020. “Intergenerational effects of paternal predator cue exposure on behavior, stress reactivity, and neural gene expression.” *Hormones and Behavior*, 124, 104806.
- Breslau, N., Roth, T., Rosenthal, L., & Andreski, P. 1996. “Sleep disturbance and psychiatric disorders: a longitudinal epidemiological study of young adults.” *Biological psychiatry*, 39(6), 411-418.
- Bruce, Steven E., Kimberly A. Yonkers, Michael W. Otto, Jane L. Eisen, Risa B. Weisberg, Maria Pagano, M. Tracie Shea, and Martin B. Keller. 2005. “Influence of Psychiatric Comorbidity on Recovery and Recurrence in Generalized Anxiety Disorder, Social Phobia, and Panic Disorder: A 12-Year Prospective Study.” *American Journal of Psychiatry* 162(6):1179–87.
- Buenhombre, J., Daza-Cardona, E. A., Sousa, P., & Gouveia Jr, A. 2021. “Different influences of anxiety models, environmental enrichment, standard conditions and intraspecies variation (sex, personality and strain) on stress and quality of life in adult and juvenile zebrafish: A systematic review.” *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 131, 765-791.
- Cachat, Jonathan M., Peter R. Canavella, Marco F. Elegante, Brett K. Bartels, Salem I. Elkhayat, Peter C. Hart, Anna K. Tien, David H. Tien, Esther Beeson, Sopan Mohnot, Autumn L. Laffoon, Adam M. Stewart, Siddharth Gaikwad, Keith Wong, Whitlee Haymore, and Allan v. Kalueff. 2011. “Modeling Stress and Anxiety in Zebrafish.” *Neuromethods* 52:73–88.
- Cachat, J., Stewart, A., Utterback, E., Hart, P., Gaikwad, S., Wong, K., ... & Kalueff, A. V. (2011). Three-dimensional neurophenotyping of adult zebrafish behavior. *PloS one*, 6(3), e17597.
- Campos, A. C., Fogaça, M. V., Aguiar, D. C., & Guimaraes, F. S. 2013. “Animal models of anxiety disorders and stress.” *Brazilian Journal of Psychiatry*, 35, S101-S111.
- Chen, X., C. Wang, Q. He, J. Feng, D. Chen, J. Wei, Y. Liu. 2022. “Chemical Composition and Potential Properties in Mental Illness (Anxiety, Depression and Insomnia) of Agarwood Essential Oil: A Review.” *Molecules*, 27(14), 4528.
- Chen, C. H., Kuo, T. C. Y., Yang, M. H., Chien, T. Y., Chu, M. J., Huang, L. C., ... & Chen, L. F. O. (2014). Identification of cucurbitacins and assembly of a draft genome for *Aquilaria agallocha*. *BMC genomics*, 15(1), 1-11.
- Chen, JC, Chiu, MH, Nie, RL, Cordell, GA, and Qiu, SX (2005). Cucurbitacins and cucurbitane glycosides: structures and life activities. *Natural product reports* , 22 (3), 386-399.

- Chiavaroli, Annalisa, Simonetta Cristina di Simone, Alessandra Acquaviva, Nilofar, Maria Loreta Libero, Luigi Brunetti, Lucia Recinella, Sheila Leone, Giustino Orlando, Gokhan Zengin, Antonella Mazzone, Luigi Menghini, and Claudio Ferrante. 2022. "Neuromodulatory and Protective Effects Induced by the Association of Herbal Extracts from Valeriana Officinalis, Ziziphus Jujuba, and Humulus Lupulus with Melatonin: An Innovative Formulation for Counteracting Sleep Disorders." *Processes* 10(8):1609.
- Collier, Adam D., Allan v. Kalueff, and David J. Echevarria. 2017. "Zebrafish Models of Anxiety-like Behaviors." *The Rights and Wrongs of Zebrafish: Behavioral Phenotyping of Zebrafish* 45–72.
- Dalvie, S., Koen, N., & Stein, D. J. 2020. "Genomic contributions to anxiety disorders." In *Personalized psychiatry* (pp. 297-306). Academic Press.
- Daviu, N., Bruchas, M. R., Moghaddam, B., Sandi, C., Beyeler, A. 2019. "Neurobiological links between stress and anxiety." *Neurobiology of stress*, 11, 100191.
- Del Valle-Mojica, L. M., & Ortíz, J. (2012). Anxiolytic properties of Valeriana officinalis in the zebrafish: A possible role for metabotropic glutamate receptors. *Planta Medica*, 78(16), 1719–1724.
- Demin, Konstantin A., Alexander S. Taranov, Nikita P. Ilyin, Anton M. Lakstygai, Andrey D. Volgin, Murilo S. de Abreu, Tatyana Strekalova, and Allan v Kalueff. 2020. "Understanding Neurobehavioral Effects of Acute and Chronic Stress in Zebrafish." *Taylor & Francis* 24(1):1–18.
- Dos Santos Sampaio, T. I., de Melo, N. C., de Freitas Paiva, B. T., da Silva Aleluia, G. A., da Silva Neto, F. L. P., da Silva, H. R., Keita, H., Cruz, R. A. S., Sánchez-Ortiz, B. L., Pineda-Peña, E. A., Balderas, J. L., Navarrete, A., Carvalho, J. C. T. 2018. "Leaves of Spondias mombin L. a traditional anxiolytic and antidepressant: Pharmacological evaluation on zebrafish (Danio rerio)." *Journal of Ethnopharmacology*, 224, 563–578.
- Egan, R. J., Bergner, C. L., Hart, P. C., Cachat, J. M., Canavella, P. R., Elegante, M. F., ... & Kalueff, A. V. 2009. "Understanding behavioral and physiological phenotypes of stress and anxiety in zebrafish." *Behavioural brain research*, 205(1), 38-44.
- Eriksen, M. S., M. Bakken, A. °. Espmark, B. O. Braastad, R. Salte, and + S ‡akvaforsk. 2006. "Prespawning Stress in Farmed Atlantic Salmon Salmo Salar: Maternal Cortisol Exposure and Hyperthermia during Embryonic Development Affect Offspring Survival." *Wiley Online Library* 69(1):114–29.
- Evrensel, Alper, Barış Önen Ünsalver, and Mehmet Emin Ceylan. 2020. "Immune-Kynurenine Pathways and the Gut Microbiota-Brain Axis in Anxiety Disorders." *Advances in Experimental Medicine and Biology* 1191:155–67.
- Faught, E., MM Vijayan-Fish and Fisheries, and undefined 2018. 2018. "Maternal Stress and Fish Reproduction: The Role of Cortisol Revisited." *Wiley Online Library* 19(6):1016–30.
- Faustino, T. T., Almeida, R. B. D., & Andreatini, R. 2010. "Medicinal plants for the treatment of generalized anxiety disorder: a review of controlled clinical studies." *Brazilian Journal of Psychiatry*, 32, 429-436.
- Figueiredo, H. F., Bodie, B. L., Tauchi, M., Dolgas, C. M., & Herman, J. P. 2003. "Stress integration after acute and chronic predator stress: differential activation of central stress circuitry and sensitization of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis." *Endocrinology*, 144(12), 5249-5258.

- Fonseca, L. R. D., Rodrigues, R. D. A., Ramos, A. D. S., da Cruz, J. D., Ferreira, J. L. P., Silva, J. R. D. A., Amaral, A. C. F. 2020. "Herbal medicinal products from *Passiflora* for anxiety: An unexploited potential." *The Scientific World Journal*, 2020.
- Gądek-Michalska, A., J. Tadeusz, ... P. Rachwalska. 2013. "Cytokines, Prostaglandins and Nitric Oxide in the Regulation of Stress-Response Systems." *Pharmacological*, 65:1655–62.
- Gagliano, Monica, and Mark I. McCormick. 2009. "Hormonally Mediated Maternal Effects Shape Offspring Survival Potential in Stressful Environments." *Oecologia* 160(4):657–65.
- Giacomini, ACVV, N. Scolari, ... L. Marcon. 2021. "Putative Anxiolytic-like Behavioral Effects of Acute Paracetamol in Adult Zebrafish." *Behavioural Brain Research*, 409, 113293
- Gray, Jeffrey A. 2019. "Issues in the Neuropsychology of Anxiety." *Anxiety and the Anxiety Disorders* 5–26.
- Hacke, ACM, E. Miyoshi, ... JA Marques. 2020. "Anxiolytic Properties of *Cymbopogon Citratus* (DC.) Stapf Extract, Essential Oil and Its Constituents in Zebrafish (*Danio Rerio*)." *Journal of Ethnopharmacology*, 260, 113036.
- Hashim, YZHY, PG Kerr, P. Abbas, HM Salleh. 2016. "*Aquilaria* Spp. (Agarwood) as Source of Health Beneficial Compounds: A Review of Traditional Use, Phytochemistry and Pharmacology." *Journal of Ethnopharmacology*, 189, 331-360.
- Hausmann, Mark F., Andrew S. Longenecker, Nicole M. Marchetto, Steven A. Juliano, and Rachel M. Bowden. 2012. "Embryonic Exposure to Corticosterone Modifies the Juvenile Stress Response, Oxidative Stress and Telomere Length." *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 279(1732):1447–56.
- He, Q., DB Hu, L. Zhang, MY Xia, H. Yan, XN Li, JF Luo. 2021. "Neuroprotective Compounds from the Resinous Heartwood of *Aquilaria Sinensis*." *Phytochemistry*, 181, 112554.
- Hood, Sean David, Amanda Norman, Dana Adelle Hince, Jan Krzysztof Melichar, and Gary Kenneth Hulse. 2012. "Benzodiazepine Dependence and Its Treatment with Low Dose Flumazenil." *Wiley Online Library* 77(2):285–94.
- Hou, D. 1964. "Notes on some Asiatic species of *Aquilaria* (Thymelaceae)." *Blumea*, 12(2), 285-8.
- Huang, Yeen, and Ning Zhao. 2020. "Generalized Anxiety Disorder, Depressive Symptoms and Sleep Quality during COVID-19 Outbreak in China: A Web-Based Cross-Sectional Survey." *Psychiatry Research* 288:112954.
- Jones, Kevin S., Alexander P. Alimov, Horacio L. Rilo, Ronald J. Jandacek, Laura A. Woollett, and W. Todd Penberthy. 2008. "A High Throughput Live Transparent Animal Bioassay to Identify Non-Toxic Small Molecules or Genes That Regulate Vertebrate Fat Metabolism for Obesity Drug Development." *Nutrition and Metabolism* 5(1).
- Ju, H., Liu, C., Zhang, G., Xu, C., Wang, H., & Fan, H. 2022. Neuroprotective potential of nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2)/antioxidant response element signaling modulator cucurbitacin I upon glucose and oxygen deprivation/reperfusion (OGD/RP). *Human & Experimental Toxicology*, 41, 09603271221104450.
- Kalueff, AV, and JM Cachat. 2011. "Zebrafish Models in Neurobehavioral Research." New York, NY: Humana Press.

- Kalueff, A. V., Gebhardt, M., Stewart, A. M., Cachat, J. M., Brimmer, M., Chawla, J. S., ... & Schneider, and the Zebrafish Neuroscience Research Consortium, H. (2013). Towards a comprehensive catalog of zebrafish behavior 1.0 and beyond. *Zebrafish*, 10(1), 70-86.
- Kao, WY, CY Hsiang, SC Ho, TY Ho, KT Lee. 2021. "Novel Serotonin-Boosting Effect of Incense Smoke from Kynam Agarwood in Mice: The Involvement of Multiple Neuroactive Pathways." *Journal of Ethnopharmacology*, 275, 114069.
- Karaytuğ, MO, L. Tamam, ... ME Demirkol. 2021. "Yetişkin Ayrılma Anksiyetesi Bozukluğu Tanılı Hastalarda Komorbidite ve İşlevsellik İle İlişkili Faktörler." *Klinik Psikiyatri Dergisi*, 24(4), 481-490.
- Kim, EJ, JE Dimsdale-Behavioral sleep medicine, and undefined 2007. 2007. "The Effect of Psychosocial Stress on Sleep: A Review of Polysomnographic Evidence." *Taylor & Francis* 5(4):256–78.
- Kuang, H., Sun, M., Lv, J., Li, J., Wu, C., Chen, N., ... & Xu, Z. 2014. "Hippocampal apoptosis involved in learning deficits in the offspring exposed to maternal high sucrose diets." *The Journal of nutritional biochemistry*, 25(9), 985-990.
- Kysil, E. V., Meshalkina, D. A., Frick, E. E., Echevarria, D. J., Rosemberg, D. B., Maximino, C., ... & Kalueff, A. V. 2017. "Comparative analyses of zebrafish anxiety-like behavior using conflict-based novelty tests." *Zebrafish*, 14(3), 197-208.
- Lader, M. 2016. "Sleep and Anxiety Disorders." In *Synopsis of Sleep Medicine* (pp. 225-236). Apple Academic Press.
- Ladu, Fabrizio, Tiziana Bartolini, Sarah G. Panitz, Flavia Chiarotti, Sachit Butail, Simone Macri, and Maurizio Porfiri. 2015. "Live Predators, Robots, and Computer-Animated Images Elicit Differential Avoidance Responses in Zebrafish." *Zebrafish* 12(3):205–14.
- Lakhan, Shaheen E., and Karen F. Vieira. 2010. "Nutritional and Herbal Supplements for Anxiety and Anxiety-Related Disorders: Systematic Review." *Nutrition Journal* 9(1):1–14.
- Lawrence, P. J., Murayama, K., & Creswell, C. 2019. "Systematic review and meta-analysis: anxiety and depressive disorders in offspring of parents with anxiety disorders." *Journal of the American Academy of Child & Adolescent Psychiatry*, 58(1), 46-60.
- Lira, S. M., Dionísio, A. P., Holanda, M. O., Marques, C. G., da Silva, G. S., Correa, L. C., ... & Zocolo, G. J. 2020. "Metabolic profile of pitaya (*Hylocereus polyrhizus* (FAC Weber) Britton & Rose) by UPLC-QTOF-MSE and assessment of its toxicity and anxiolytic-like effect in adult zebrafish." *Food Research International*, 127, 108701.
- Liu, Z., Kumar, M., & Kabra, A. (2022). Cucurbitacin B exerts neuroprotection in a murine Alzheimer's disease model by modulating oxidative stress, inflammation, and neurotransmitter levels. *Frontiers in Bioscience-Landmark*, 27(2), 71.
- Luyten, Laura, Debora Vansteenwegen, Kris van Kuyck, Loes Gabriëls, and Bart Nuttin. 2011. "Contextual Conditioning in Rats as an Animal Model for Generalized Anxiety Disorder." *Cognitive, Affective and Behavioral Neuroscience* 11(2):228–44.
- Magno, L. D. P., Fontes, A., Gonçalves, B. M. N., & Gouveia Jr, A. 2015. "Pharmacological study of the light/dark preference test in zebrafish (*Danio rerio*): Waterborne administration." *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 135, 169-176.
- Maphanga, Veronica B., Krystyna Skalicka-Woźniak, Barbara Budzynska, Gill M. Enslin, and Alvaro M. Viljoen. 2020. "Screening Selected Medicinal Plants for Potential Anxiolytic Activity Using an in Vivo Zebrafish Model." *Psychopharmacology* 237(12):3641–52.

- Martin, Patrick. 2022. "The Epidemiology of Anxiety Disorders: A Review." *Dialogues in clinical neuroscience*. 5(3):281–98.
- Mathew, SJ, ... RB Price. 2008. "Recent Advances in the Neurobiology of Anxiety Disorders: Implications for Novel Therapeutics." *Wiley Online Library* 148(2):89–98.
- Maximino, C., de Brito, T. M., da Silva Batista, A. W., Herculano, A. M., Morato, S., & Gouveia Jr, A. (2010). Measuring anxiety in zebrafish: a critical review. *Behavioural brain research*, 214(2), 157-171.
- Mccormick, MI, IV Nechaev. 2002. "Influence of Cortisol on Developmental Rhythms during Embryogenesis in a Tropical Damsel fish." *Journal of Experimental Zoology* 293(5):456–66.
- McGuinn, LA, M. Tamayo-Ortiz, ... MJ Rosa. 2022. "The Influence of Maternal Anxiety and Cortisol during Pregnancy on Childhood Anxiety Symptoms." *Psychoneuroendocrinology*, 139, 105704.
- Meo, F. di, S. Margarucci, U. Galderisi, S. Crispi, G. Peluso. 2019. "Curcumin, Gut Microbiota, and Neuroprotection." *Nutrients*, 11(10), 2426.
- Miyoshi, T., M. Ito, T. Kitayama, ... S. Isomori. 2013. "Sedative Effects of Inhaled Benzylacetone and Structural Features Contributing to Its Activity." *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 36(9), 1474-1481.
- Momma, K., Masuzawa, Y., Nakai, N., Chujo, M., Murakami, A., Kioka, N., ... & Nagao, M. (2008). Direct interaction of Cucurbitacin E isolated from *Alsomitra macrocarpa* to actin filament. *Cytotechnology*, 56(1), 33-39.
- Murphy, Susannah E., Angharad N. de Cates, Amy L. Gillespie, Beata R. Godlewska, Jessica C. Scaife, Lucy C. Wright, Philip J. Cowen, Catherine J. Harmer. 2021. "Translating the Promise of 5HT4 Receptor Agonists for the Treatment of Depression." *Psychological Medicine*, 51(7), 1111-1120.
- Nadaroğlu, H., Y. Demir, and N. Demir. 2007. "Antioxidant and Radical Scavenging Properties of *Iris Germanica*." *Pharmaceutical Chemistry Journal* 41(8):409–15.
- Neri, Daniele, Tommaso Ruberto, Gabrielle Cord-Cruz, and Maurizio Porfiri. 2017. "Information Theory and Robotics Meet to Study Predator-Prey Interactions." *Chaos: An Interdisciplinary Journal of Nonlinear Science* 27(7):073111.
- Nesan, D., & Vijayan, M. M. (2013). Role of glucocorticoid in developmental programming: evidence from zebrafish. *General and comparative endocrinology*, 181, 35-44.
- Neumark, J., Hammerle, A. F., & Bieglmayer, C. H. (1985). Effects of epidural analgesia on plasma catecholamines and cortisol in parturition. *Acta Anaesthesiologica Scandinavica*, 29(6), 555-559.
- Nguyen, Michael, Adam Michael Stewart, and Allan v. Kalueff. 2014. "Aquatic Blues: Modeling Depression and Antidepressant Action in Zebrafish." *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry* 55:26–39.
- Norwitz, Nicholas G., and Uma Naidoo. 2021. "Nutrition as Metabolic Treatment for Anxiety." *Frontiers in Psychiatry* 12.
- Okugawa, H., R. Ueda, K. Matsumoto, K. Kawanishi, and A. Kato. 1993. "Effects of Agarwood Extracts on the Central Nervous System in Mice." *Planta Medica* 59(1):32–36.
- Parsaik, AK, ... SS Mascarenhas. 2016. "Mortality Associated with Anxiolytic and Hypnotic Drugs—A Systematic Review and Meta-Analysis." *Australian and New* 50(6):520–33.

- Peeraphong, L. 2021. "Medicinal uses of agarwood." *Chinese Medicine and Culture*, 4(4), 260-265.
- Phan, TX, RG Malkani. 2019. "Sleep and Circadian Rhythm Disruption and Stress Intersect in Alzheimer's Disease." *Neurobiology of stress*, 10, 100133.
- Radi, E., Formichi, P., Battisti, C., & Federico, A. (2014). Apoptosis and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Journal of Alzheimer's disease*, 42(s3), S125-S152.
- Rammal, H., J. Bouayed, C. Younos. 2008. "Evidence That Oxidative Stress Is Linked to Anxiety-Related Behaviour in Mice." *Brain, behavior, and immunity*, 22(8), 1156-1159.
- Redfern, Julia C., Steven J. Cooke, Robert J. Lennox, Michael A. Nannini, David H. Wahl, and Kathleen M. Gilmour. 2017. "Effects of Maternal Cortisol Treatment on Offspring Size, Responses to Stress, and Anxiety-Related Behavior in Wild Largemouth Bass (*Micropterus Salmoides*)." *Physiology & Behavior* 180:15–24.
- Rico, E. P., Rosemberg, D. B., Seibt, K. J., Capiotti, K. M., Da Silva, R. S., & Bonan, C. D. 2011. Zebrafish neurotransmitter systems as potential pharmacological and toxicological targets. *Neurotoxicology and teratology*, 33(6), 608-617.
- Roseboom, PH, SA Nanda, ... VP Bakshi. 2007. "Predator Threat Induces Behavioral Inhibition, Pituitary-Adrenal Activation and Changes in Amygdala CRF-Binding Protein Gene Expression." *Psychoneuroendocrinology*, 32(1), 44-55.
- Rosen, J. B., & Schulkin, J. 1998. "From normal fear to pathological anxiety." *Psychological review*, 105(2), 325.
- Roy-Byrne, Peter. 2015. "Treatment-Refractory Anxiety; Definition, Risk Factors, and Treatment Challenges." *Dialogues in Clinical Neuroscience* 17(2):191–206.
- Sanches, Marsal, João Quevedo, and Jair C. Soares. 2018. "Treatment Resistance in Bipolar Disorders." *Treatment Resistance in Psychiatry: Risk Factors, Biology, and Management* 139–50.
- Santomauro, DF, AMM Herrera, J. Shadid, P. Zheng. 2021. "Global Prevalence and Burden of Depressive and Anxiety Disorders in 204 Countries and Territories in 2020 Due to the COVID-19 Pandemic." *The Lancet*, 398(10312), 1700-1712.
- Schafer, KM, A. Lieberman, AC Sever, T. Joiner. 2022. "Prevalence Rates of Anxiety, Depressive, and Eating Pathology Symptoms between the Pre-and Peri-COVID-19 Eras: A Meta-Analysis." *Journal of affective disorders*, 298, 364-372.
- Schnörr, S. J., P. J. Steenbergen, M. K. Richardson, and D. L. Champagne. 2012. "Measuring Thigmotaxis in Larval Zebrafish." *Behavioural Brain Research* 228(2):367–74.
- Selmaoui, Brahim, and Yvan Touitou. 2021. "Association Between Mobile Phone Radiation Exposure and the Secretion of Melatonin and Cortisol, Two Markers of the Circadian System: A Review." *Bioelectromagnetics* 42(1):5–17.
- Selye, H. (1976). The stress concept. *Canadian Medical Association Journal*, 115(8), 718.
- Serikuly, Nazar, Erik T. Alpyshov, Dong Mei Wang, Jing Tao Wang, Long En Yang, Guo Jun Hu, Dong Ni Yan, Konstantin A. Demin, Tatyana O. Kolesnikova, David Galstyan, Tamara G. Amstislavskaya, Abdrazak M. Babashev, Mikael S. Mor, Evgeniya v. Efimova, Raul R. Gainetdinov, Tatyana Strekalova, Murilo S. de Abreu, Cai Song, and Allan v. Kalueff. 2021. "Effects of Acute and Chronic Arecoline in Adult Zebrafish: Anxiolytic-like Activity, Elevated Brain Monoamines and the Potential Role of Microglia." *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry* 104:109977.

- Simon Yeung, K., Marisol Hernandez, Jun J. Mao, Ingrid Haviland, Jyothirmai Gubili, Correspondence Jyothirmai Gubili, and Memorial Sloan Kettering. 2018. "Herbal Medicine for Depression and Anxiety: A Systematic Review with Assessment of Potential Psycho-oncologic Relevance." *Wiley Online Library* 32(5):865–91.
- Spinello, Chiara, Yanpeng Yang, Simone Macrì, and Maurizio Porfiri. 2019. "Zebrafish Adjust Their Behavior in Response to an Interactive Robotic Predator." *Frontiers Robotics AI* 6(MAY):38.
- St-Cyr, Sophie, and Patrick O. McGowan. 2015. "Programming of Stress-Related Behavior and Epigenetic Neural Gene Regulation in Mice Offspring through Maternal Exposure to Predator Odor." *Frontiers in Behavioral Neuroscience* 9(JUNE).
- Steimer, Thierry. 2022. "Animal Models of Anxiety Disorders in Rats and Mice: Some Conceptual Issues." *Tsteimer* 13(4):495–506.
- Stewart, Adam, Siddharth Gaikwad, Evan Kyzar, Jeremy Green, Andrew Roth, and Allan v. Kalueff. 2012. "Modeling Anxiety Using Adult Zebrafish: A Conceptual Review." *Neuropharmacology* 62(1):135–43.
- Stewart, AM, O. Braubach, J. Spitsbergen, ... R. Gerlai. 2014. "Zebrafish Models for Translational Neuroscience Research: From Tank to Bedside." *Trends in neurosciences*, 37(5), 264-278.
- Sulukan, E., A. Baran, M. Kankaynar, ... T. Kızıltan. 2023. n.d. "Global Warming and Glyphosate Toxicity (II): Offspring Zebrafish Modelling with Behavioral, Morphological and Immunohistochemical Approaches." *Science of The Total Environment*, 856, 158903.
- Sulukan, E., A. Ghosigharehagaji, A. Baran, S. Yildirim. 2021. "A Versatile Toxicity Evaluation of Ethyl Carbamate (Urethane) on Zebrafish Embryos: Morphological, Physiological, Histopathological, Immunohistochemical transcriptional and behavioral approaches." *Toxicology Letters*, 353, 71-78.
- Şahin, M. 2019. "Korku, Kaygı ve Kaygı (Anksiyete) Bozuklukları. Avrasya Sosyal ve Ekonomi Araştırmaları Dergisi, 6(10), 117-135.
- Thibaut, Florence. 2022. "Anxiety Disorders: A Review of Current Literature." *Fthibaut* 19(2):87–88.
- Thompson, WA, MM Vijayan. 2020. "Environmental Levels of Venlafaxine Impact Larval Behavioural Performance in Fathead Minnows." *Chemosphere*, 259, 127437
- Toumi, ML, S. Merzoug, B. Baudin, A. Tahraoui. 2013. "Quercetin Alleviates Predator Stress-Induced Anxiety-like and Brain Oxidative Signs in Pregnant Rats and Immune Count Disturbance in Their Offspring." *Biochemistry and Behavior Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 107, 1-10.
- Türkoğlu, Medine, Alper Baran, Ekrem Sulukan, Atena Ghosigharehagaji, Serkan Yildirim, Hacer Akgül Ceyhun, İsmail Bolat, Murat Arslan, and Saltuk Buğrahan Ceyhun. 2022. "The Potential Effect Mechanism of High-Fat and High-Carbohydrate Diet-Induced Obesity on Anxiety and Offspring of Zebrafish." *Eating and Weight Disorders* 27(1):163–77.
- Uzbay, İ. T. (2002). Anksiyetenin nörobiyolojisi. *Klinik Psikiyatri Dergisi*, 5(1), 5-13.
- Valle-Mojica, Lisa M., and José Ortiz. 2012. "Anxiolytic Properties of Valeriana Officinalis in the Zebrafish: A Possible Role for Metabotropic Glutamate Receptors." *Planta Medica* 78(16):1719–24.

- Vatine, G., D. Vallone, Y. Gothilf, NS Foulkes. 2011. "It's Time to Swim! Zebrafish and the Circadian Clock." *FEBS letters*, 585(10), 1485-1494.
- Wang, Dongmei, Long En Yang, Jingtao Wang, Guojun Hu, Zi Yuan Liu, Dongni Yan, Nazar Serikuly, Erik T. Alpyshov, Konstantin A. Demin, David S. Galstyan, Tatiana Strekalova, Murilo S. de Abreu, Tamara G. Amstislavskaya, and Allan v. Kalueff. 2020. "Behavioral and Physiological Effects of Acute and Chronic Kava Exposure in Adult Zebrafish." *Neurotoxicology and Teratology* 79:106881.
- Wang, S, C. Wang, Z. Yu, C. Wu, D. Peng, ... X. Liu. 2018. "Agarwood Essential Oil Ameliorates Restrain Stress-Induced Anxiety and Depression by Inhibiting HPA Axis Hyperactivity." *International journal of molecular sciences*, 19(11), 3468.
- Wang, S, Y. Zhou, F. MA, Q. Zhang, ... Y. Liu. 2016. "Effect of Agarwood Produced by Whole-Tree Agarwood-Inducing Technique on Hypnotic and Spontaneous Activity Inhibition of Mice." *Journal of International Pharmaceutical Research*, 1082-1087.
- Wang, S., Yu, Z., Wang, C., Wu, C., Guo, P., & Wei, J. 2018. "Chemical constituents and pharmacological activity of agarwood and Aquilaria plants." *Molecules*, 23(2), 342.
- Wang, Shuai, Canhong Wang, Deqian Peng, Xinmin Liu, Chongming Wu, Peng Guo, and Jianhe Wei. 2017. "Agarwood Essential Oil Displays Sedative-Hypnotic Effects through the GABAergic System." *Molecules* 2017, Vol. 22, Page 2190 22(12):2190.
- Winberg, Svante, Arthur A. Myrberg, and Göran E. Nilsson. 1993. "Predator Exposure Alters Brain Serotonin Metabolism in Bicolour Damselfish." *NeuroReport* 4(4):399–402.
- Yang, Lin, Lirui Qiao, Dan Xie, Yuhe Yuan, Naihong Chen, Jungui Dai, and Shunxing Guo. 2012. "2-(2-Phenylethyl) Chromones from Chinese Eaglewood." *Phytochemistry* 76:92–97.
- Zhao, Hu, Hong Xu, Xiaohu Xu, and Derson Young. 2007. "Predatory Stress Induces Hippocampal Cell Death by Apoptosis in Rats." *Neuroscience Letters* 421(2):115–20.



ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı:	Meryem KANKAYNAR
Doğum tarihi:	
Doğum Yeri:	
Uyruğu:	
Adres:	
Tel:	
E-mail:	
Eğitim	
Lise:	Mecidiye Anadolu Lisesi
Lisans:	Erzincan Binali Yıldırım Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Fakültesi
Yüksek lisans:	Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Nanobilim ve Nanomühendislik Anabilim Dalı
Yabancı Dil Bilgisi	
İngilizce:	İyi
Üye Olunan Mesleki Kuruluşlar	
Tezden Üretilmiş Yayınlar	