

# Lavandula intermedia hidrosolünün zebra balığı larvalarında lethaliteye etkisinin araştırılması

## The study of effect of Lavandula intermedia hydrosol on lethality in zebrafish larvae

Elanur Yılmaz<sup>1</sup>, Aynur Genç<sup>2</sup>, Esra Sağlam<sup>3</sup>, Zeynep Güneş Özunal<sup>3</sup>  
<sup>1</sup>Koç Üniversitesi Tıp Fakültesi, Translasyonel Tıp Uygulama ve Araştırma Merkezi, İstanbul, Türkiye  
<sup>2</sup>Maltepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, İstanbul, Türkiye  
<sup>3</sup>Maltepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Medikal Farmakoloji Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

**İletişim:** Aynur Genç  
 Maltepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, İstanbul, Türkiye  
 e-mail: 190102009@st.maltepe.edu.tr

**ORCID ID:**  
 EY 0000-0001-7045-5068  
 AG 0000-0003-3320-3384  
 ES 0000-0002-6462-0618  
 ZGÖ 0000-0002-3060-1507

**Gönderim Tarihi:** 26 Aralık 2022, **Kabul Tarihi:** 30 Aralık 2022

### ÖZET

**Amaç:** Lavandula intermedia, esansiyel yağ olarak birçok alanda kullanılmakta ve araştırılmaktadır. Üretimi sırasında elde edilen hidrosolü de benzer amaçlar doğrultusunda kullanılmak üzere araştırılmaya elverişli bir kimyasaldır. Zebra balığı (*Danio rerio*), son yıllarda deney hayvanı olarak kullanımı artan omurgalı bir model organizmadır. Bu model organizma, sağladığı birçok avantajdan dolayı toksisite çalışmalarında da tercih edilmektedir. Bu çalışmada, lavanta intermedia hidrosolünün lethaliteye etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

**Materyal ve Metotlar:** Çalışmada beş günlük zebra balığı larvaları 24 kuyucuklu plaklara yerleştirilmiş ve %50'den %6.25'e (v/v) ardışık dilüsyonel konsantrasyondaki L. intermedia hidrosolü uygulanmıştır. Bir saat boyunca sağkalımları değerlendirilmiştir.

**Sonuç:** Lavandula intermedia hidrosolü %50 v/v konsantrasyonunda larvalarda %100 lethaliteye neden olmuştur. Ardışık dilüsyonel dozlarda ise sağkalım %100 tespit edilmiştir. Lavandula intermedia hidrosolünün kozmetik ve sağlık alanında kullanımının etki ve toksisite açısından farklı doz ve sürelerde değerlendirilmesi uygundur.

**Anahtar Kelimeler:** Danio rerio, L. intermedia, toksisite, zebra balığı

### SUMMARY

**Aim:** Lavandula intermedia is used and researched in many fields as an essential oil. The hydrosol obtained during its production is a suitable chemical to be used for similar purposes. Zebrafish (*Danio rerio*) is a vertebrate model organism whose use as an experimental animal has increased in recent years. This model organism is also preferred in toxicity studies due to its many advantages. In this study, it was aimed to investigate the effect of lavender intermedia hydrosol on lethality.

**Material and Methods:** In the study, 5 days post fertilization (dpf) zebrafish larvae were placed in 24-well plates and L. intermedia hydrosol was applied at sequential dilution concentrations from 50% to 6.25% (v/v). Their survival over one hour was evaluated.

**Conclusion:** Lavandula intermedia hydrosol caused 100% lethality in larvae at 50% v/v concentration. Survival at consecutive dilutional doses was 100%. It is appropriate to evaluate the use of Lavandula intermedia hydrosol in the field of cosmetics and health in terms of effect and toxicity at different doses and duration.

**Keywords:** Danio rerio, L. intermedia, toxicity, zebrafish

## GİRİŞ

Bitkiler, yüzyıllardır hastalıkların önlenmesi ve tedavisinde kullanılmaktadır. Günümüzde modern ilaçların da önemli bir bölümü doğadan kaynaklanmaktadır. Bitkiler sahip oldukları sekonder metabolitler nedeniyle kimyasal çeşitliliğe sahiptir. İlaç geliştirmesi için önemli bir kaynak olan bitkiler, klinik öncesi ve klinik olarak çok sayıda araştırmaya tabi tutulurlar (1).

Klinik öncesi çalışmalarda bu amaçla genellikle kemirgenler gibi memeli hayvanlar kullanılır. Bunun yanı sıra, bilimsel araştırmalarda deney hayvanı kullanımına yönelik 3R (replacement, reduction, refinement) felsefesine göre memeli hayvan modellerine alternatif olarak sunulan model organizmalar da bulunmaktadır. Hücre kültürleri, in silico modeller olan *Caenorhabditis elegans* ve *Danio rerio* (zebra balığı) gibi memeli olmayan hayvan modelleri, ilaç etkisi ve güvenliliğini değerlendirmek için kullanılmaktadır (2).

Zebra balıklarını toksisite çalışmaları için avantajlı kılan özellikleri; kısa sürede toksisite analizlerinin yapılabilmesi, embriyolarının transparan olması, yüksek üreme verimleri ve insanlara genetik açıdan benzerlikleridir (3).

Lavanta (*Lavandula angustifolia* Miller veya *Lavandula officinalis* Chaix), geleneksel kullanım açısından uzun bir geçmişe ve esansiyel yağı geniş spektrumlu biyolojik etkilere sahip olan bir bitkidir (4). Lavanta esansiyel yağının mental bozuklukların farmakoterapisinde etkileri olduğuna dair bulgular, *L. angustifolia* esansiyel yağından damıtılan Silexan adlı bir ilacın geliştirilmesine kaynaklık etmiştir. Ticari adı LASEA olan Silexan, anksiyeteye bağlı huzursuzluğun tedavisi için onaylanmıştır (4). Lavanta hidrosolü ise bilinen antioksidan ve antimikrobiyal özellikleri nedeniyle kozmetik ürünlere kullanılmaktadır (5).

Bitki özlerinin esansiyel yağ olarak kullanımı yaygındır, bu yağların etkileri ve mekanizmaları üzerinde de birçok araştırma yapılmıştır. Ancak aynı durum bu bitkilerin hidrosolleri için geçerli değildir. Bu nedenle bitkilerin terapötik etkilerinin tam anlamıyla anlaşılabilmesi için hidrosolleri ile yapılacak çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır. Bu sayede bu bitki özlerinin terapötik kullanımları da optimize edilmiş olacaktır (6).

Bu çalışmanın amacı, lavandula intermedia hidrosolüne maruz kalan 5 günlük zebra balığı larvalarında oluşan lethaliteyi değerlendirmektir. Zebra balığı larvaları ile çalışma, fertilizasyondan sonraki beş gün boyunca, mevzuata göre etik kurul onayı gerektirmemektedir.

## MATERYAL VE METOTLAR

Lavandula intermedia çiçekleri Kandıra, Kocaeli, Türkiye'den toplandı. Aynı gün buhar distilasyonu yöntemi ile hidrosolü elde edildi. Hidrosol, oda ısısında karanlık

ortamda saklandı. Balık embriyo ve larvalarını yaşatılacağı *Egg water* (embriyo suyu), deniz tuzu, saf su ve metilen mavisi ile hazırlandı.

Araştırma Koç Üniversitesi Translasyonel Tıp Araştırma Merkezi, Zebra Balığı Laboratuvarında yürütüldü.

Larva eldesi için çiftleştirmeye alınacak olan dişi ve erkek balıklar standart yaşam ortamlarında, 14/10 saat aydınlık/karanlık siklusunda tutulmaktadır. Tanklara gelen suyun standart koşulları; pH değeri 7.4, su sıcaklığı 27.54 C° ve iletkenliği 800 mikrosiemens ( $\mu\text{S}$ )'dir. Embriyo eldesinden bir gün önce sağlık koşulları uygun olan dişi ve erkek balıklar, aralarında bariyer bulunacak şekilde, sistem suyu içeren çiftleştirme tanklarına alındı (7).

Ertesi gün tanka alınan dişiler ve erkekler arasındaki bariyer kaldırılarak, balıkların doğal olarak çiftleşmesi gerçekleşti ve embriyolar elde edildi. Toplanan embriyolar *egg water* ya da sistem suyuyla birkaç kez yıkayıp dışkılarından arındırıldıktan sonra birkaç kez yıkandıktan sonra 28.5 C° 'deki inkübatörde yetiştirilmeye başlandı.

Fertilizasyondan sonraki beş gün boyunca embriyoların larva evresine geçişi takip edildi. Bu süre boyunca sağkalım, hücre bölünmesi, gelişme seviyesi ve pigmentasyon gibi parametreler değerlendirildi. Embriyoların suyu her gün düzenli olarak yenilendi.

Fertilizasyondan sonraki 5. günde içinde inkübatördeki larvalar, stereomikroskop (Leica DFC7000T, Almanya) altında incelendi. Larvaların kalp atışı, yüzme keselerinin oluşumu, pigmentasyon ve anatomileri değerlendirildi. Gelişimi sağlıklı olan larvalar, 24 kuyucuklu plakaya, kuyucuk başına bir larva olmak üzere 1 mililitre (ml) *Egg Water* içinde yerleştirildi.

Kuyucuklara yerleştirilen larvaların gelişimi tekrar mikroskop altında incelendi ve genel durumlarının iyi olduğu belirlendi. %50 v/v ten %6,25'a ardışık konsantrasyonlarda, bir tane de kontrol olmak üzere gruplar oluşturuldu (her grup için n=6). Deney üç kere tekrarlandı. Kuyucuklara yerleştirilen larvalar kalp atışı, solunum ve sağkalım açısından mikroskop altında 1 saat boyunca değerlendirildi. Embriyoların 1. saatlerinde ve larvaların 5. günlerinde fotoğrafları çekildi. Sağkalım oranları ile ilgili SPSS 25 programı ile tanımlayıcı istatistik yapıldı.

## BULGULAR

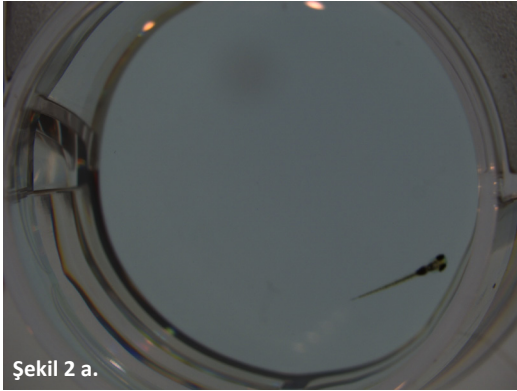
Yabanıl tip (*Wild Type*) zebra balıkları (*Danio rerio*) embriyoları toplandı. Fertilizasyondan sonraki ilk iki saat içinde incelendi (Şekil 1).

Beşinci güne ulaşan larvalar deneye alındı. Deneye alınmadan önce kontrol ve deney grupları çıplak gözle ve mikroskop altında incelendi. Ardışık konsantrasyonlarda lavandula intermedia hidrosolü uygulandı.

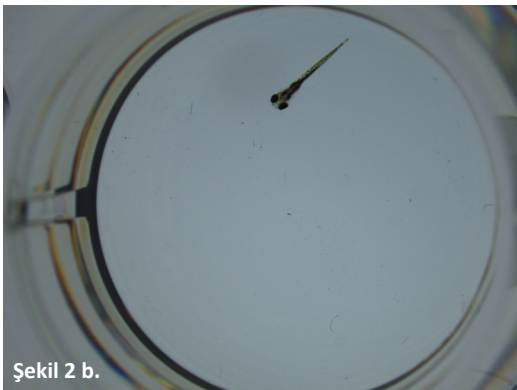
Maksimum konsantrasyona (%50 v/v) maruz bırakılmış grup, mikroskop altında 1 saat boyunca sağkalım açısından incelendi. Maruziyetten yaklaşık 10 dakika sonra larvaların hareketlerinde kontrol grubuna kıyasla belirgin bir artış gözlemlendi. Maruziyetten 15 dakika sonra larvalardan biri hariç hepsinin hareketsiz olduğu ve yan yattığı belirlendi. Maruziyetten 35 dakika sonra larvaların hepsinin hareketsiz olduğu belirlendi. Maruziyetten 1 saat sonra ise hiçbir larvada kalp atımı, dolayısıyla sağkalım tespit edilemedi.



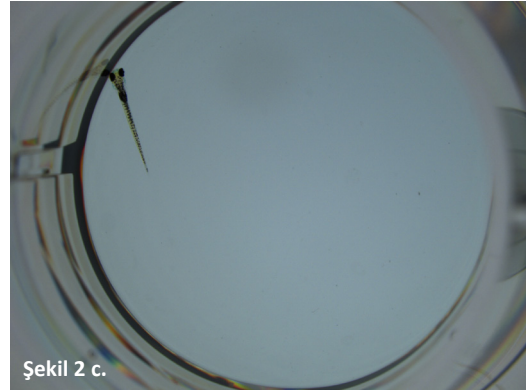
Şekil 1. Fertilizasyon sonrası ilk inceleme



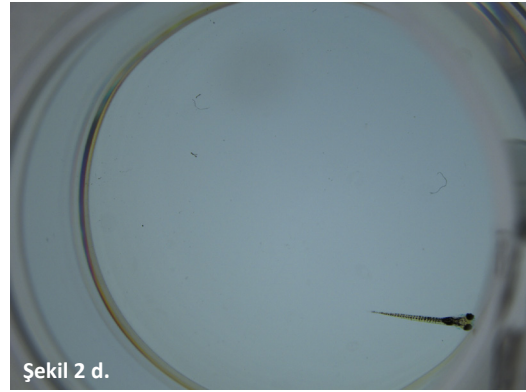
Şekil 2 a.



Şekil 2 b.



Şekil 2 c.



Şekil 2 d.

**Şekil 2.** Bir saatin sonunda **a)** Kontrol grubu **b)** %50 v/v **c)** %12,5 v/v **d)** %6,5 v/v lavandula intermedia hidrosolü uygulanmış 5 günlük zebra balığı larvaları.

(%12,5 ve %6,25 v/v) konsantrasyona maruz bırakılan larvalarda maruziyetten bir saat sonra mikroskop altında yapılan değerlendirmede bu gruplardaki tüm larvaların (%100) hayatta kaldığı belirlendi. %6,25 v/v konsantrasyona maruz kalan grupta kuyucuğun köşelerine göç ve hareket azalmasıyla sedasyon, %12,5 v/v grupta ise sedasyon görülmeden önce hareketlerde kontrol grubuna kıyasla bir süre artış gözlemlendi.

## TARTIŞMA

Geleneksel olarak kullanılan bitkisel kaynaklı biyoaktif maddelerin etkilerinin kanıta dayalı yöntemlerle açıklanması gereklidir. Bu ekstratların klinik düzeyde kullanımının değerlendirilmesi için aktif maddeleri hızlı ve efektif biçimde tarayabilecek ve mekanizmalarını açıklayabilecek yöntemlere ihtiyaç vardır. Bu çalışmada kullanılan zebra balıkları, bu gibi amaçlar için ideal sayılan model organizmalardan biridir (8).

Lavanta hidrosolü %50 v/v konsantrasyonda zebra balığı larvalarında letaliteye neden olmuştur. Ayrıca, hidrosolün eklendiği ilk on dakika içinde tüm gruplarda, kimyasal maruziyetinin yol açtığı strese bağlı olduğu düşünülen bir hareket artışı gözlemlenmiştir. Bunu takiben maksimum

konsantrasyona (%50 v/v) maruz kalmış larvalar akut toksisite sonucu ölmüştür. Orta derecede konsantrasyona (%12,5 v/v) maruz kalmış larvaların hareketi ise ilk karşılaşmadaki kadar fazla olmasa da sedasyondan uzak bir durumda seyretmiştir, hareket hızlarının kontrol grubu larvalarına yakın olduğu gözlemlenmiştir. Düşük konsantrasyona (%6,25 v/v) maruz kalmış larvalarda subjektif olarak değerlendirilen hareketliliklerinde azalma, sedasyonda artış olarak yorumlanmıştır. Ara dozda gözlemlenen bu hareketliliğin deney koşulları dahil birçok sebebi olabilir. Yüksek doza maruz kalmış larvaların kalpleri durmadan önce gösterdikleri stres davranışları, bu davranışın daha hafif bir halinin ara doza maruz kalmış larvalarda letaliteye ulaşmadan seyrettiğini düşündürülebilir. Buna göre, düşük doza yakın olduğu tahmin edilen bir optimal doz karşısında larvaların sedate olması beklenebilir. Bu doz arttırıldığında ise larvaların stres davranışı göstermesi, doz belli bir noktaya-bu çalışma için %50 v/v-ulaştığında ise toksisite nedeniyle kalplerinin durması beklenebilir. Hareketin subjektif olarak değerlendirildiği çalışmamızda iki araştırmacı aynı anda gözlem yapmıştır. Zebra balığında hareketin bilgisayar görüntüleme ve kayıt sistemleriyle yapıldığı çalışmalar zebra balığında davranış konusunda daha kesin sonuçlar vermektedir.

Bitkilerden elde edilen gerek kozmetik gerek sağlık alanında kullanılan biyoaktif maddeler ile ilgili veriler oldukça önemlidir. Bu kullanımların optimize edilmesi ve doz etki ve toksisite açısından değerlendirilmesi gerekmektedir. Bu çalışmada kullanılan zebra balığı, bu tür değerlendirmeler için uygun bir organizmadır. Bu maddelerin yeraltı sularına karışmasının sonucunda ve sucul canlılarda etkilerini de öngördürücü olabilir.

Zebra balığı araştırmalarında araştırılan maddenin embriyo döneminde etkisi, larvada ve erişkin zebra balığında uzun dönem maruziyeti farklı yanıt ve toksisiteye neden olabilir. Zebra balığının insanla olan genom benzerliğinin %70 olması ve zebra balığının davranışları iyi şekilde tanımlandığı için otomatize sistemlerde kantitatif araştırmalar yapılabilir (9).

İleride yapılacak çalışmalarda subjektif olarak zebra balığının hareketlilik değişiklikleri bilgisayarlı sistemlerle daha objektif değerlendirilebilir.

Lavanta yağı geleneksel olarak güvenli bulunsa da hücre kültürü çalışmaları deride toksik etkilerin olabileceğine işaret etmekte ve klinik olarak nadiren de olsa kontakt dermatite neden olabilmektedir (10). Bu çalışmanın sonuçları da lavanta intermedia hidrosolünün yüksek dozlarda toksik olabileceğini düşündürmektedir. Literatürde 18 aylık bir çocuğun oda kokusu amacıyla kullanılan lavanta intermedia ekstraktından az bir miktar kazara oral alımıyla ortaya çıkan nörolojik bulguları, kan ve idrar tahlili ile kanıtlanmış ve toksisite bildirilmiştir (11). Hidrosolünün de kazara alımında klinik etki oluşabileceği göz önünde bulundurulmalıdır.

Lavanta intermedia hidrosolünün güvenliliğinin değerlendirilmesinin yanı sıra etkisinin araştırılması açısından da önemlidir. Diğer aromatik bitkilerde olduğu gibi lavanta intermediada da hidrosol esansiyel yağdan çok daha fazla hacimde elde edilmektedir (12). Yan ürün olarak değerlendirilen hidrosolün olası etkilerinin araştırılması yeni bir değer katabilecektir.

### Teşekkürler

*KUTTAM zebra balığı laboratuvarı çalışmalarında teknik yardımlarından dolayı Aziz Kaya'ya teşekkür ederiz.*

**Yazar Katkıları:** Çalışma Konsepti/Tasarımı: EY, AG, ES, ZGÖ, Veri Toplama: AG, ZGÖ, Veri Analizi/Yorumlama: EY, AG, ZGÖ, Yazı Taslağı: EY, AG, ZGÖ, İçeriğin Eleştirel İncelemesi: AG, ES, ZGÖ, Son Onay ve Sorumluluk: EY, AG, ES, Malzeme ve teknik destek: EY, ZGÖ, Süpervizyon: EY.

**Çıkar Çatışması:** Yazarlar çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

**Finansal Destek:** Yazarlar bu çalışma için finansal destek almadıklarını beyan etmişlerdir.

### KAYNAKLAR

1. Bergonzi MC, Heard CM, Garcia-Pardo J. Bioactive Molecules from Plants: Discovery and Pharmaceutical Applications. *Pharmaceutics*. 2022;14(10):2116. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14102116>.
2. Cassar S, Adatto I, Freeman JL, Gamse JT, Iturria I, Lawrence C, et al. Use of zebrafish in drug discovery toxicology. *Chemical research in toxicology*. 2020;33(1):95-118.
3. Modarresi CA, Arsad H, Lim V. Zebrafish as a Successful Animal Model for Screening Toxicity of Medicinal Plants. *Plants*. 2020;9:1345. doi:10.3390/plants9101345.
4. Yap WS, Dolzhenko AV, Jalal Z, Hadi MA, Khan TM. Efficacy and safety of lavender essential oil (Silexan) capsules among patients suffering from anxiety disorders: A network meta-analysis. *Scientific Reports*. 2019;9:18042. doi:10.1038/s41598-019-54529-9.
5. Al-Mansour B. Review on the medicinal properties of some aromatic hydrosols. *Zeugma Biological Science*. 2021;2(1):1-19.
6. Kunicka-Styczyńska A, Śmigielski K, Prusinowska R, Rajkowska K, Kuśmider B, Sikora M. Preservative activity of lavender hydrosols in moisturizing body gels. *Lett Appl Microbiol*. 2015;60:27-32. doi:10.1111/lam.12346.
7. Aleström P, D'Angelo L, Midtlyng PJ, Schorderet DF, Schulte-Merker S, Sohm F, et al. Zebrafish: Housing and husbandry recommendations. *Laboratory Animals*. 2020;54(3):213-224. doi:10.1177/0023677219869037.
8. Li M, Cao X, Yan H, Wang M, Tashibolati A, Maiwulanjiang M. *Chemistry Select*. 2022;7, e202201364P.
9. Fontana BD, Gibbon AJ, Cleal M, Norton WH, Parker MO. Chronic unpredictable early-life stress (CUELS) protocol: Early-life stress changes anxiety levels of adult

- zebrafish. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*. 2021;8:108,110087. doi:10.1016/j.pnpbp.2020.110087.
10. Cavanagh, HMA, Wilkinson JM. Lavender essential oil: a review. *Australian Infection Control*. 2005;10(1):35-37. doi:10.1071/hi05035.
11. Landelle C, Francony G, Sam-Laï NF, Gaillard Y, Vincent F, Wroblewski I, et al. Poisoning by lavender extract in a 18-month-old boy. *Clinical Toxicology*. 2008;46(4):279-281. doi:10.1080/15563650701281098.
12. Politi M, Menghini L, Conti B, Bedini S, Farina P, Cioni PL, et al. Reconsidering hydrosols as main products of aromatic plants manufactory: The lavender (Lavandula intermedia) case study in Tuscany. *Molecules*. 2020;25(9):2225.